UNIVERSITE BLAISE PASCAL UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° D.U. 2078 ANNEE 2010

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,

SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre 531

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires

(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Soutenue le 30 Novembre 2010

Aurélien POMMIER

Rôle du cholestérol et des récepteurs nucléaires LXRs dans le cancer de la prostate

Directeur de thèse : Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO, UMR CNRS GReD 6247, Clermont-Ferrand

JURY

Présidente :	**Pr. Florence CALDEFIE-CHEZET, EA 4233, Clermont-Ferrand**
Rapporteurs :	**Dr. Philippe ARNAUD, CNRS UMR 5535, Montpellier**
	Dr. Catherine POSTIC, CNRS UMR 8104, Paris
Examinateurs :	**Pr. Johannes SWINNEN, Université de Louvain, Louvain, Belgique**
	Dr. Silvère BARON, UMR CNRS GReD 6247, Clermont-Ferrand

UMR CNRS 6247-Clermont Université-INSERM U931 et CRNH d'Auvergne

UNIVERSITE BLAISE PASCAL UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° D.U. 2078 ANNEE 2010

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,

SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre 531

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires

(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Soutenue le 30 Novembre 2010

Aurélien POMMIER

Rôle du cholestérol et des récepteurs nucléaires LXRs dans le cancer de la prostate

Directeur de thèse : Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO, UMR CNRS GReD 6247, Clermont-Ferrand

JURY

Présidente :	**Pr. Florence CALDEFIE-CHEZET, EA 4233, Clermont-Ferrand**
Rapporteurs :	**Dr. Philippe ARNAUD, CNRS UMR 5535, Montpellier**
	Dr. Catherine POSTIC, CNRS UMR 8104, Paris
Examinateurs :	**Pr. Johannes SWINNEN, Université de Louvain, Louvain, Belgique**
	Dr. Silvère BARON, UMR CNRS GReD 6247, Clermont-Ferrand

UMR CNRS 6247-Clermont Université-INSERM U931 et CRNH d'Auvergne

Remerciements

Je tiens à remercier :

Le Docteur Philippe Arnaud, le Docteur Florence Chezet-Caldefie, le Docteur Catherine Postic et le Docteur Johan Swinnen d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Le Professeur Jean-Marc A. Lobaccaro et le Docteur Silvère Baron de m'avoir fait confiance pour la réalisation de cette thèse.

Jean Marc, partager ton bureau au cours de ces 3 dernières années fut un réel plaisir. Merci pour tes précieux conseils, entre autre en matière de présentation orale qui m'ont grandement aidé à plusieurs reprises. Je te remercie également de m'avoir laissé l'autonomie nécessaire à l'appropriation de ce sujet de thèse qui m'a passionné. Enfin, merci pour ta bonne humeur et pour les agréables moments partagés lors des réunions LXR/resvératrol rue du Luc.

Silvère, merci pour l'investissement que tu as consacré à ma formation technique et « spirituelle » à la recherche. Ta rigueur, ta curiosité, ta culture scientifique et de manière générale ton intérêt pour la recherche, sont autant de qualités qui ont motivé nos discussions quasi quotidiennes au cours desquelles tu m'as beaucoup appris. J'ai énormément apprécié cette disponibilité. Tu as grandement participé à la réalisation, dans les meilleures conditions, de cette thèse, je t'en suis infiniment reconnaissant. Aussi, je tiens à te remercie pour l'amitié que nous avons entretenue en dehors du laboratoire, avec une pensée toute particulière pour les bons moments passés à Aussois et à Super Besse.

Le Docteur Georges Alvès pour son importante implication dans ce projet de recherche. Merci de ton aide à l'animalerie pour l'entretien de la colonie et ta participation à la gestion du WD. Je te remercie également pour ton aide en culture cellulaire et notamment l'établissement des MPE ainsi que pour tous tes précieux conseils tout au long de ma thèse.

Le Docteur Françoise Caira qui a su répondre présente aux multiples sollicitations concernant la relecture attentive de mes différents écrits dont ce manuscrit. Je te remercie également pour ta gestion des commandes qui nous facilite beaucoup la vie. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, ce fut un vrai plaisir d'interagir avec toi.

Le professeur Georges Veyssiere pour ses conseils avisés, ses discussions scientifiques, son soutien au cours de ces 4 années passées au laboratoire et la relecture critique de ce manuscrit.

Les Docteurs Kevin Mouzat et David Volle avec qui je n'ai pas eu la chance de passer plus de temps.

Kévin, merci de m'avoir guidé lors de mes premiers pas dans le laboratoire et en particulier pour les précieux conseils en matière de q-PCR et merci pour ton humour légendaire. Ton départ à Nîmes a crée un vide au sein du labo.

David, tu es revenu trop tard, j'aurais aimé partager nos nombreuses discussions scientifiques agrémentées de caféine dès le début de ma thèse, elles sont très enrichissantes. Merci de m'avoir fait part de ta créativité scientifique, de ton admirable passion pour la recherche et enfin de tes critiques affutées.

Le Professeur Laurent Morel et le Docteur Pierre Val pour leurs conseils divers et variés. Laurent, tu fais partie avec Jean Marc, des enseignants de Master qui savent susciter l'intérêt des étudiants pour la recherche. Tu as su répondre à mes interrogations de l'époque à ce sujet et ainsi participer à mon orientation que je ne regrette en rien. Pour cela je te remercie. Merci aussi pour tes conseils avisés et ton avis scientifique à l'égard de mes projets tout au long de ma thèse.

Pierre, je te remercie pour ton aide en général et particulièrement pour tes conseils en histologie, tes remarques scientifiques et tes critiques toujours très pertinentes concernant mes écrits dans la langue de Shakespeare.

Jean-Paul Saru pour son aide précieuse au Western-blot, Angélique De Haze pour son aide au clonage, Christelle Damon pour son aide en immuno-histologie. Merci également pour votre bonne humeur permanente.

Christine Puchol, Sandrine Plantade et Sophie Monceau pour avoir toujours su répondre à nos besoins à l'animalerie.

Tous les étudiants et les stagiaires du laboratoire, passés et actuels : Jérôme Allemand, Annabel Berthon, Eléonore Chabory, Julie Dufour, Fatim-Zora El Hajjaji, JeanJo Hoang, Marion Jenty, Gaëlle Loubeau, Sabrina Maquaire, Abdelkader Oumedour, Aurélia Ouvrier, Emilie Pastel, Thomas Pihen, Jean-André Tourette, Emilie Viennois et Fanny Volat pour tous les moments agréables que j'ai passés en votre compagnie. Merci également aux filles du GDEC : Aurélia, Delphine, Julie et Senda pour les pauses café « Senseo » et le partage de culture musicale.

Je vous souhaite à tous une grande réussite personnelle et professionnelle.

Les autres membres du laboratoire qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse. Merci à tous.

Ce travail de thèse a été le fruit de collaborations multiples, c'est pourquoi je tiens à remercier :

Le Docteur Benoît Sion pour m'avoir initié aux techniques des dosages cellulaire et intra-tissulaires des lipides.

Le Docteur Geoffroy Marceau pour les dosages de lipides plasmatiques.

Le Docteur Sophie Bernard pour l'analyse des *rafts* au microscope à force atomique.

Le Docteur Philippe Arnaud pour ses précieux conseils lors de mon initiation au ChIP.

Yves Communal pour les plusieurs centaines de tubes « facsés » aux cours de ces 3 années.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu à l'extérieur du laboratoire :

Les amis avec qui tout à commencé : Clément, David, Didier, Fabien, Laudine, Nicolas, Pauline, Pierre, Vanessa. Merci pour votre soutien depuis l'IUT et pour l'ensemble des moments inoubliables que nous avons partagés. Je vous souhaite à tous la grande réussite personnelle et professionnelle que vous méritez.

Les amis « du Bost » : Aurélie, Chrystelle, Florian, Loic, Mathieu, Mélanie, Mélodie, Romain, Renaud, Yoann et leurs conjoint(e)s. Merci à tous pour les purs moments que nous avons partagés depuis le lycée et avant pour certains.

Mes parents qui m'ont toujours accompagné dans les moments de ma vie personnelle et professionnelle. Je vous témoigne ma plus profonde reconnaissance pour votre soutient tout au long de mon parcours universitaire et particulièrement tout au long de cette période de thèse. Pour cela et bien plus encore, je vous remercie très sincèrement.

A tous, si nous n'avons pas partagé autant de moments que vous l'auriez souhaité, ce sentiment est largement réciproque. Je vous témoigne mes plus sincères regrets et vous exprime toute mon affection.

Ma compagne, Eloïse qui partage ma vie. Face à mon investissement pour mener à bien ce travail, parfois très pesant pour une relation de couple, tu as toujours su faire preuve de compréhension et de soutien. Je te remercie pour cela et pour ta présence quotidienne qui m'est très chère et m'a beaucoup aidée à réaliser ce travail. Je souhaite ainsi partager avec toi le plaisir d'avoir réalisé cette thèse.

A Eloïse, ma compagne.

Une partie des travaux a été présentée dans les congrès suivants :

Communications orales à des congrès et conférences avec comité de sélection :

- **4ème journée scientifique du CLARA, Archamps, 2009.**

« Liver X receptors modulate lipid raft signaling in prostate cancer cells and xenograft.»

- **Journée de l'école doctorale, Clermont-Ferrand, 2009.**

« LXR vs Cholesterol »

- **1ère journée du CRNH auvergne, Clermont-Ferrand, 2008.**

« LXR, Cholestérol et Cancer de la prostate. »

- **4ème journée de la recherche de l'IFR santé 79, Clermont Ferrand, 2007.**

« Rôle des lipides et des récepteurs nucléaires des oxystérols LXRs dans la carcinogénèse prostatique. »

Autres communications :

- **Keystone symposia Nuclear Receptors : Signaling, Gene Regulation and cancer. Keystone, Colorado, USA, 2010.**

LXR activation blocks prostate cancer progression

AJC. Pommier, G. Alves, E. Viennois, P. Déchelotte, Y. Communal, JM. Chardigny, F. Caira, J-M.A. Lobaccaro, S. Baron

- **Embo conference on nuclear receptors: From molecular mechanisms to molecular medicine, Dubrovnik, Croatie, 2009.**

LXR activation induces apoptosis of cancer prostate cells by reduction of AKT survival signaling in lipid rafts

AJC. Pommier, G. Alves, E. Viennois, P. Déchelotte, Y. Communal, JM. Chardigny, F. Caira, J-M.A. Lobaccaro, S. Baron

- **Androgen, Rotterdam, Pays-Bas, 2008.**

LXRs control cell survival through cholesterol export in prostate cancer

AJC. Pommier, G. Alves, E. Viennois, P. Déchelotte, Y. Communal, JM. Chardigny, F. Caira, J-M.A. Lobaccaro, S. Baron

- **3ème journée scientifique du CLARA, Lyon, 2008.**

Les récepteurs LXRs contrôlent la balance prolifération / apoptose dans la prostate

AJC. Pommier, G.Alves, E. Viennois, P. Déchelotte, Y. Communal, JM. Chardigny, F. Caira, J-M.A. Lobaccaro, S. Baron

Une partie des travaux a fait l'objet d'articles publiés ou en cours de soumission :

Articles originaux :

Pommier AJC *et al.*

Intracellular cholesterol overload induced by diet upregulates *ezh2* expression and initates prostate cancer development. En préparation. (Article1)

Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S & Lobaccaro JM. (2010)

Liver X Receptor activation induces apoptosis of cancer prostate cells by reduction of AKT survival signaling in lipid rafts, ***Oncogene*** 29:2712-2723. (Article 2)

Mouzat K, Volat F, Baron S, Alves G, Pommier AJ, Volle DH, Marceau G, DeHaze A, Déchelotte P, Duggavathi R, Caira F & Lobaccaro JM (2009)

Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. ***Endocrinology*** 150(7):3369-75. (Article 3)

Revue générale:

Aurélien J. C. Pommier, Julie Dujour, Emilie Viennois, David H. Volle, Françoise Caira, Silvère Baron and Jean-Marc A. Lobaccaro

Cholestérol et cancer de la prostate : données épidémiologiques Article en cours de publication dans Médecine Clinique. (Article 4)

Emilie Viennois, Aurélien J. C. Pommier, Kevin Mouzat, Abdelkader Oumedour, Fatim-Zora El Hajjaji, Julie Dujour, Françoise Caira, David H. Volle, Silvère Baron and Jean-Marc A. Lobaccaro

Targeting Liver X Receptors in human health: deadlock or promising trail? Article en cours de publication dans ***Expert opinion of therapeutical target.*** (Article 5)

Mouzat K, Alves G, Pommier A, Viennois E, Pihen T, Caira F, Baron S, Lobaccaro JMA (2009) Rôles des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction (revue générale). ***Médecine Sciences*** 25 (2) : 141-144. (Article 6)

Résumé

Résumé

Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation de la consommation de glucides, d'acides gras et de cholestérol liée aux changements des habitudes alimentaires dans la plupart des pays industrialisés est à l'origine de nombreuses pathologies telles que l'obésité, les troubles cardio-vasculaires, le développement du diabète de type II et la survenue de cancers. Plusieurs arguments bibliographiques suggèrent notamment que le cholestérol puisse être un élément à risque dans la survenue du cancer de la prostate. D'une part, l'hypercholestérolémie est associée à une augmentation des cas de cancer de la prostate et, d'autre part, les cellules cancéreuses présentent des dérèglements du métabolisme des lipides associés à l'accumulation de cholestérol dans les tumeurs solides.

Les objectifs de ces travaux ont été d'analyser le rôle du cholestérol dans le développement du cancer de la prostate et d'étudier le rôle des récepteurs nucléaires LXRs (*liver X receptors*), régulateurs fondamentaux de l'homéostasie du cholestérol, dans les mécanismes associés à l'initiation et à la progression tumorale.

Nos résultats montrent qu'une accumulation de cholestérol, induite par un régime chez les souris déficientes en LXRs, peut initier les premières étapes du développement tumoral par des mécanismes épigénétiques mettant en jeu l'action répressive de l'histone méthyltransférase EZH2 sur des gènes suppresseurs de tumeur. En parallèle, l'activation pharmacologique des LXRs dans des cellules cancéreuses humaines réduit la croissance tumorale en augmentant la mort des cellules par des mécanismes faisant intervenir les *rafts* lipidiques.

Au total, nos travaux révèlent l'existence d'une relation entre la consommation excessive de cholestérol et la modification d'empreintes épigénétiques, mécanisme de plus en plus associé aux processus carcinogéniques. Nos données indiquent également que les LXRs, en s'opposant à l'accumulation de cholestérol intracellulaire, ralentissent l'initiation et la progression du cancer de la prostate. Ainsi, toute stratégie thérapeutique visant à diminuer le cholestérol intra-tumoral, telle que l'activation pharmacologique des LXRs, peut être considérée comme une piste thérapeutique dans le cadre du cancer de la prostate.

Mots clés : Cancer, Prostate, Cholestérol, LXR, *Rafts*, EZH2.

Abstract

Abstract

In the recent decades, increased consumption of carbohydrates, fatty acids and cholesterol, linked to changes in dietary habits in most industrialized countries, is the cause of various diseases such as obesity, cardio-vascular troubles, development of type II diabetes and the onset of cancer. Literature reveals several arguments suggesting that cholesterol may be a risk factor in the occurrence of prostate cancer. First, hypercholesterolemia has been associated with an increased incidence of prostate cancer and, second, cancer cells exhibit deregulations of lipid metabolism associated with cholesterol accumulation in solid tumors.

The objectives of this work were to analyze the role of cholesterol in the development of prostate cancer and to study the role of nuclear receptors LXRs (liver X receptors), fundamental regulators of cholesterol homeostasis, in the mechanisms associated with tumor initiation and progression.

Our results show that cholesterol overload induced by a diet in *lxr* knockout mice may initiate the early stages of tumor development by epigenetic mechanisms involving the repressive action of histone methyltransferase EZH2 on tumor suppressor genes. In parallel, the pharmacological activation of LXRs in human cancer cells reduced tumor growth by increasing cell death through mechanisms involving lipid rafts.

Taken together, our data reveal the existence of a relationship between environmental factors such as diet consumption of cholesterol and changes of epigenetic imprinting, a mechanism increasingly associated with carcinogenic process. Our data also indicate that LXRs protect from the initiation and progression of prostate cancer by blocking the accumulation of intracellular cholesterol. Thus, all therapeutic strategies leading to intra-tumoral cholesterol lowering, such as pharmacological activation of LXRs, may be relevant treatments of prostate cancer.

Key words : Cancer, Prostate, Cholesterol, LXR, Rafts, EZH2.

Préambule

Le cancer la prostate est un carcinome d'apparition tardive qui émerge sous la forme de petits foyers disséminés dans la glande. Cette pathologie qui touche en France un homme sur sept est d'origine multifactorielle. L'attention est très généralement focalisée sur la perte de l'androgéno-dépendance de ce cancer lorsque la tumeur évolue vers des stades agressifs suite à un traitement antihormonal. Dans ce manuscrit, notre propos sera plus orienté vers la mise en évidence de perturbations épigénétiques qui pourraient être liées directement à des déséquilibres métaboliques. Ainsi, les récepteurs nucléaires des oxystérols (LXRs) et leurs cibles moléculaires pourraient constituer des acteurs importants de la pathologie prostatique permettant d'envisager leur activation pharmacologique comme nouvelle stratégie thérapeutique.

Après avoir présenté la glande prostatique, la recherche bibliographique présentée dans ce manuscrit décrit les différents traitements du cancer de la prostate actuellement disponibles et met en évidence, face à la progression inéluctable de la maladie et aux multiples échecs thérapeutiques rencontrés, la nécessité 1) d'approfondir les connaissances quant aux facteurs impliqués dans la mise en place de ce cancer afin de mieux en prévenir les risques et 2) d'améliorer les moyens thérapeutiques en proposant de nouvelles stratégies. Ensuite sont développés les différents facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux capables d'influencer le développement du cancer de la prostate. Ces données révèlent la complexité de l'étiologie de cette pathologie et témoignent de l'existence d'interaction entre ces différentes composantes. L'accent est tout particulièrement porté sur l'incidence du cancer de la prostate en relation avec la consommation, de plus en plus importante dans les pays occidentaux, de lipides tels que le cholestérol. Enfin, nous aborderons la place des LXRs dans le maintien de l'homéostasie lipidique.

La recherche expérimentale menée au cours de cette thèse permet de mettre en évidence le rôle du cholestérol dans les mécanismes qui conduisent à l'initiation et à la progression tumorale. D'un coté nous montrons que l'accumulation de cholestérol dans les cellules prostatiques entraîne la répression d'expression de gènes suppresseurs de tumeur *via* des mécanismes épigénétiques associés au développement tumoral. D'un autre coté, nos travaux indiquent que la diminution de la quantité de cholestérol intracellulaire induite par l'activation pharmacologique des LXRs est responsable du ralentissement de la croissance tumorale.

Abréviations

ABC	*ATP binding cassettes*
ACAT	*acyl cholesterol acyltranferase*
ACC	*acetyl CoA carboxylase*
ACTH	adrénocorticotrophine
ADN	acide désoxyribonucléique
AF	*activating function*
AG	acides gras
AKR	*aldo-keto-reductase*
AMACR	α-methylacyl-CoA-racémase
APO	*apoplipoprotéine*
AR	*androgen receptor*
ATP	adénosine triphosphate
bHLHZ	*basic helix-loop-helix-leucine zipper*
BPH	*benign prostate hypertrophy*
CBP	*c-AMP response element binding protein*
CDK	*cyclin dependent kinase*
CDKN	*cyclin-dependent kinase inhibitor*
ChREBP	*carbohydrate response element binding protein*
CK	cytokératine
COP-II	*coat Protein complex-II*
COX	*cyclo-oxygenase*
CPA	acétate de cyprotérone
CRAds	*conditionally replicative adenoviruses*
CRIP1	*cysteine-rich protein1*
CRPC	*castrate-resistant prostate cancer*
CYP7A1	*cholesterol-7α-hydroxylase*
DAB2IP	*DAB2 interacting protein*
DBD	*DNA Binding Domain*
DHEA	déhydroépiandrostérone
DHT	dihydro-testostérone
DIG	*detergent-insoluble, glycolipid-enriched complexes*
DLL	*delta-like ligand*
DNMT	*DNA methyltransferase*
DR	*direct repeat*
DRM	*detergent-resistant membrane domains*
DTT	dithiothréitol
DZNep	3-deazaneplanocin A
EGF	*epidermal growth factor*
EMT	*epithelial-to-mesenchymal transition*
EOR	espèces oxygénées réactive
ER	*everted repeat*
ERG	*ETS related gene*
ESR1	*oestrogen receptor alpha*
ETS	*e-twenty six*
EZH2	*enhancer of zest 2*
FAS	*fatty acid synthase*

FGF	*fibroblast growth factor*
FGFR	*fibroblast growth factor receptor*
FOX	*forkhead box*
FZL	*frizzled*
GDEPT	*gene-derived pro-drug therapy*
GRIP-1	*glucocorticoid receptor-interacting protein 1*
GSTP	*glutathione S-transferase 1*
HAT	*acetyltransferases*
HBP	hyperplasie bénigne de la prostate
HDAC	*histone deacetylase*
HDL	*high density lipoprotein*
HES	*hairy-enhancer of spli*
HIF	*hypoxia inducible factor*
HMG	hydroxy-méthyl-glutarate
HMGCoA reductase	*hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase*
HMGCoA synthase	*hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A synthase*
HSP	*heat Shock Protein*
HSV-tk	thymidine kinase du virus herpes simplex
HTGL	*hepatic triglyceride lipase*
ICR	*imprinting control region*
IDL	*intermediate density lipoprotein*
IDOL	*inducible degrader of LDLR*
IGF	*insulin growth factor*
IHH	*indian hedgehog*
IMC	index de masse corporel
INISG	*rnsulin induced gene*
iPReCs	*immortalized prostate epithelial cells*
IR	*indirect repeat*
IRM	imagerie par résonnance magnétique
JMJD3	*jumanji D3*
KLK3	*kallikrein 3*
LBD	*ligand binding domain*
LCAT	*lecithine-cholesterol-acyl-transferase*
LDL	*low density lipoprotein*
LDLR	*low density lipoprotein receptor*
LHRH	*luteinizing hormone releasing hormone*
LNCaP	*lymph node cancer prostate*
LO	lipooxygénase
LPL	*lipoprotein lipase*
LXR	*liver X receptor*
LXRE	*LXR response element*
MAX	*max MYC associated factor X*
MEK	*mitogen-activated protein kinase*
miR	*microRNA*
MSMB	*microseminoprotein-beta*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*

MβCD	méthyl-β-cyclodextrine
N-Cor	*nuclear receptor Co-repressor*
NIH	*national institute of health*
NLS	*nuclear localization signal*
ORF	*open reading frame*
P/CAF	*P300/CBP associated factor*
PCNA	*proliferation cell nuclear antigen*
PG	prostaglandine
PGC1a	*PPAR-Gamma, Coactivator-1*
PI3K	*phospho-inositid-3-OH kinase*
PIN	*prostatic intra-neoplasia*
PPARE	*peroxisome proliferator-activated receptor response element*
pRB	*retinoblastoma protein*
PSA	*prostatic specific antigen*
PSP94	*prostatic secretory protein of 94 amino acid*
PTC	*patched*
PTEN	*phosphatase and tensin homologue*
PXR	*pregnane X receptor*
Rap250	*nuclear receptor-activating protein*
RNAi	*RNA interference*
ROR	*retinoic acid receptor-related orphan receptor*
RXR	*retinoid X receptor*
S100P	*s100 calcium-binding protein p*
S1P	*srite 1 protease*
SAH	S-adenosylhomocystéine
SAM	S-adénosylméthionine
SCAP	*srebp cleavage activating protein*
SCD	*stearoyl-CoA desaturases*
SHH	*sonic hedgehog*
SMO	*smoothened*
SMRT	*silencing mediator for RAR and TR*
SOD	superoxide dismutase
SQS	*squalene synthase*
SR	*scavanger receptor*
SRC-1	*nuclear receptor Coactivator 1*
SRD5A	5α-réductase de type 2
SREBP	*sterol response element binding protein*
STAR	*steroidogenic acute regulatory protein*
STAT5	*signal transductor activator of transcription 5*
SWI/SNF	*mating type switching/sucrose nonfermenting*
TGF	*transforming growth factor*
TGFR	*transforming growth factor receptor*
TIP60	*tat-interactive protein 60 kDa*
TLR	*toll-like receptor*
TMPRSS2	*trans-membrane prostease serine 2*

TRRAP	*transformation/transcription domain-associated protein*
VDR	*vitamin D receptor*
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VLDL	*very low density lipoprotein*
WHO	*world health organization*
WNT	*wingless integration site*

Sommaire

Sommaire 1

Introduction bibliographique 7

I. Cancer de la prostate 8

A. La glande prostatique 8

1. Structure et fonction 8
2. Une glande prostatique chez la femme ? 9
3. Morphogenèse de la prostate et gènes du développement 9
   a) Les gènes homéotiques (Hox) 10
   b) Facteurs de transcription 10
      (1) *NKX3.1* 10
      (2) *FOX* (*Forkhead box*) *A1-A2* 10
      (3) *NOTCH-1/ DELTA / JAGGED* 11
   c) Les molécules de signalisation sécrétées 11
      (1) *SONIC HEDGEHOG* (SHH) 11
      (2) *FIBROBLAST GROWTH FACTOR-10 (FGF-10)* 12
      (3) Les membres de la famille TGFβ 12
      (4) *WNT* 13
4. Régulation hormonale 13
5. Les pathologies de la glande prostatique 14
   a) Les prostatites 14
   b) L' hyperplasie bénigne de la prostate (BPH) 14

B. Le cancer 16

1. Stades d'évolution de la pathologie 16
2. Epidémiologie 16
   a) Les facteurs endogènes 17
      (1) L'âge 17
      (2) Les gènes 17
   b) Les facteurs exogènes 18

(1) La nutrition 18

(a) Les éléments anti-carcinogènes 18

(b) Les éléments pro-carcinogènes 20

(2) Les agents environnementaux 20

3. Diagnostic du cancer de la prostate 21

4. Classification du grade tumoral 21

a) La classification TNM 21

b) Le score de Gleason 21

5. Les traitements du cancer de la prostate 22

a) La prostatectomie 22

b) La radiothérapie et la curiethérapie 23

c) Les ultrasons focalisés de haute intensité 23

d) L'hormonothérapie 23

(1) Le diéthylstilbestrol (DES) 24

(2) Les agonistes/antagonistes LHRH 24

(3) Les inhibiteurs de la 5-alpha-réductase 24

(4) Le CPA (Acétate de cyprotérone) 24

(5) Les anti-androgènes non stéroïdiens 24

(6) Le blocage androgénique combiné 25

e) La chimiothérapie 25

(1) Le système GDEPT (*Gene-derived pro-drug therapy*) 26

(2) Le CRAds (*Conditionally replicative adenoviruses*) 26

C. Les bases moléculaires du cancer de la prostate 27

1. Les fusions TMPRSS2-ETS 27

2. Les polymorphismes associés au de cancer de la prostate 28

3. Les suppresseurs de tumeur 29

4. Les oncogènes 31

D. Epigénétique du cancer de la prostate 32

1. La méthylation de l'ADN 32

a) Hyperméthylation 33

b) Hypométhylation....33
2. Les marques « histone »....33
a) Méthylation....34
(1) EZH2....34
(a) Structure/fonction....34
(b) Implication dans le cancer....35
(2) Les déméthylases de H3K27 : JMJD3 et UTX....35
(3) Connexion entre la méthylation des histones et de l'ADN....36
(4) Connexion entre la méthylation et l'acétylation des histones....36
b) L'acétylation....36
(1) Les histones acétyltransférases (HAT)....36
(2) Les histones déacétylases (HDAC)....37
(a) Structure/fonction....37
(b) Implication dans le cancer de la prostate....37
3. La perte des empreintes parentales....38
4. Les acteurs épigénétiques comme cibles thérapeutiques....38
5. L'influence des facteurs environnementaux sur les marques épigénétiques....39
a) Les facteurs environnementaux....39
b) Les facteurs nutritionnels....39
c) Les mécanismes impliqués....40
(1) La méthylation de l'ADN....40
(2) La modification des histones....40

E. Quel rôle pour les lipides dans le cancer de la prostate? 41

1. Les acides gras et le cancer de la prostate....41
a) Généralités....41
b) Données épidémiologiques et expérimentales....42
(1) Les acides gras saturés....42
(2) Les acides gras insaturés....43
(a) ω6....44
(b) ω3....44
2. Le cholestérol....45
a) Généralités....45

b) Rôle physiologique du cholestérol 45

c) Transport 46

(1) Structure et rôle des lipoprotéines 46

(2) Métabolisme des lipoprotéines 46

d) L'homéostasie du cholestérol 47

e) Cholestérol et incidence du cancer de la prostate 48

f) Inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase et cancer de la prostate 48

g) Le cholestérol dans les cellules tumorales 49

h) Cholestérol, rafts et cancer de la prostate 49

II. Les récepteurs nucléaires des oxystérols : Liver X Receptors 51

A. Généralités sur les récepteurs nucléaires 51

B. Structure et mode d'action des LXRs. 53

1. La structure biochimique 53

2. Les gènes codant LXRα et LXRβ 54

3. Mode d'action des LXRs 55

a) Les éléments de réponse des LXRs 55

b) En l'absence de ligand : les co-répresseurs 55

c) En présence de ligand : les co-activateurs 55

C. Régulation de l'activité transcriptionnelle des LXRs 57

1. Les agonistes naturels 57

2. Les agonistes synthétiques 57

3. Les ligands inhibiteurs et antagonistes 58

D. Fonctions physiologiques régulées par les LXRs 59

1. Le métabolisme des acides gras 59

a) Les cibles directes 59

b) SREBP-1c 59

c) ChREBP 60

2. Le métabolisme du cholestérol 61

a) La synthèse des acides biliaires 61

b) La synthèse *de novo* 61

c) Le captage du cholestérol circulant 61

d) Le transport inverse 62

III. Conclusion et projet de recherche 63

Résultats *66*

Chapitre I : 67

Le cholestérol est-il un facteur impliqué dans l'initiation et la progression tumorale *via* des mécanismes épigénétiques au niveau de la prostate ? Quel rôle pour LXR ? 67

Chapitre II : 86

Les LXRs peuvent-ils moduler la croissance des cellules tumorales prostatiques ? 86

Discussion et perspectives *102*

I) Le cholestérol est-il un agent « épimutagène » ? 103

II) Quelle est la relation entre le cholestérol et EZH2 ? 108

III) L'invalidation des LXRs serait-elle suffisante pour initier des processus tumoraux? 114

IV) Les LXRs à l'origine de la carcinogenèse prostatique chez l'homme? 115

V) Existe-t-il une association entre obésité et cancer de la prostate ? 118

Annexes *120*

Références bibliographiques *155*

Introduction bibliographique

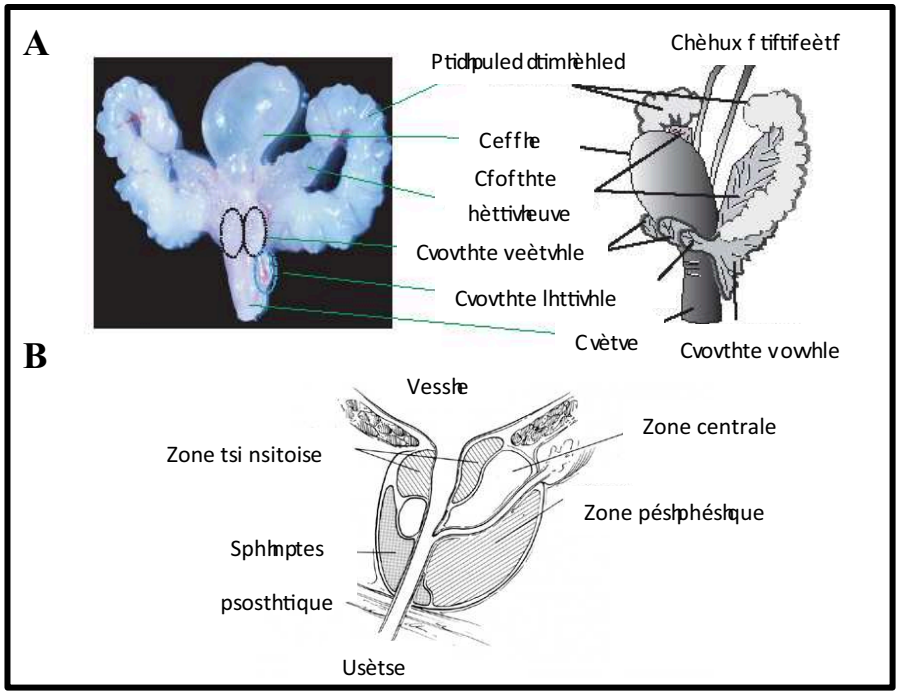


Figure 1 : Anatomie de la prostate murine et humaine. A) Photographie et schéma de la partie supérieure de l'appareil uro-génital mâle de souris. Les différents lobes prostatiques sont visualisés. B) Vue transversale de la prostate humaine et régionalisation tissulaire.

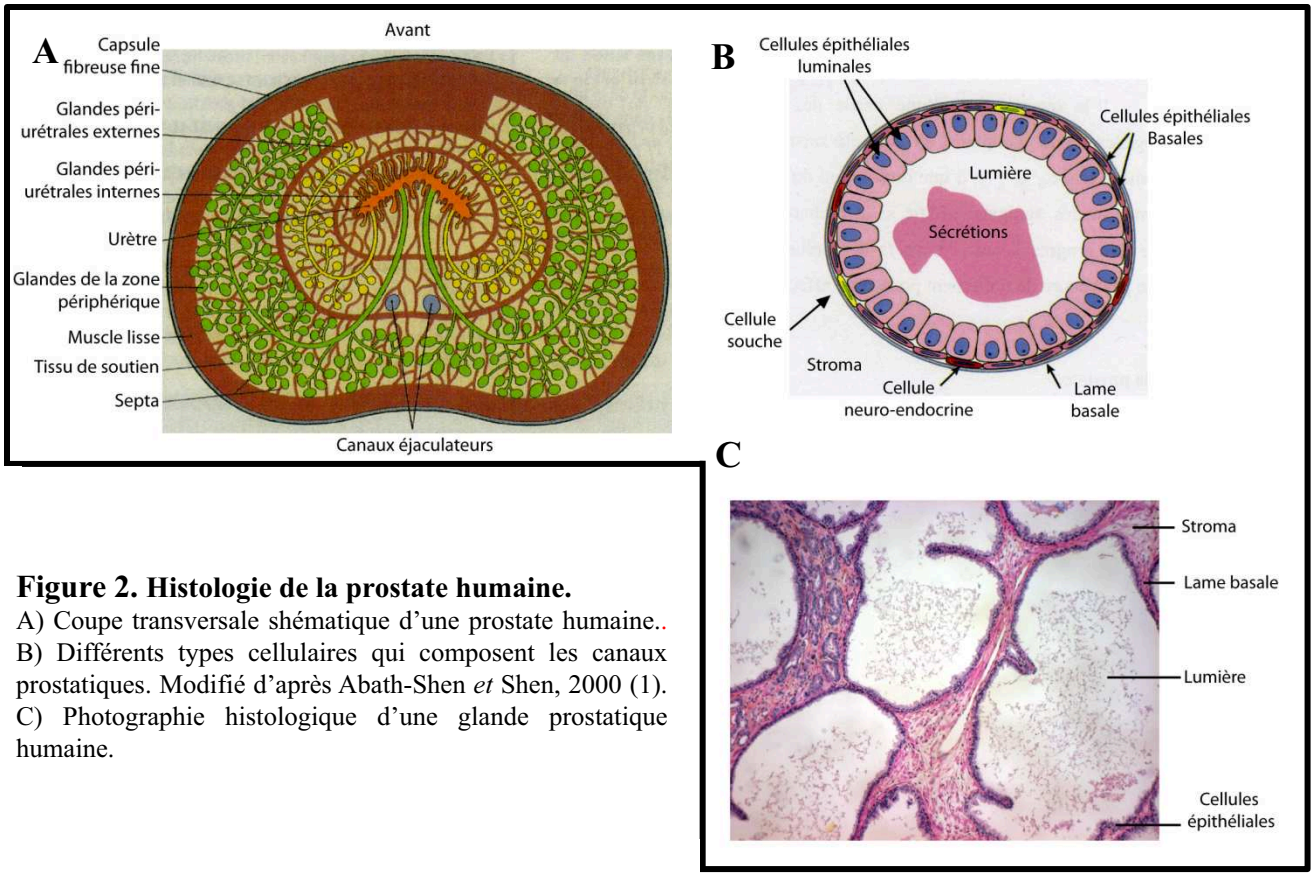


Figure 2. Histologie de la prostate humaine.
A) Coupe transversale shématique d'une prostate humaine.. B) Différents types cellulaires qui composent les canaux prostatiques. Modifié d'après Abath-Shen *et* Shen, 2000 (1). C) Photographie histologique d'une glande prostatique humaine.

I. Cancer de la prostate

A. La glande prostatique

1. Structure et fonction

La prostate est une glande exocrine de l'appareil de reproduction mâle présente chez la plupart des mammifères. Chez l'homme, la prostate est formée d'une masse unique entourant l'urètre à la base de la vessie. Il est possible de distinguer une zone périphérique, une zone centrale et une zone transitoire qui représentent respectivement environ 70, 25 et 5% de la prostate (Figure 1). En revanche, chez beaucoup de mammifères tels que la souris, la prostate comporte quatre lobes anatomiquement distincts situés autour de l'urètre et présents chacun en deux exemplaires : les lobes ventraux, latéraux, dorsaux et antérieurs, ces derniers sont aussi appelés glandes coagulantes (Figure 1). Dans tous les cas, la prostate est composée d'un ensemble de lobules exocrines dont les sécrétions sont drainées vers l'urètre par de multiples conduits. (Figure 2). D'un point de vue histologique, la prostate est un tissu composite qui présente une couche de cellules musculaires lisses permettant la contraction de la glande, des cellules stromales qui sécrètent, en réponse aux androgènes, des facteurs de croissance de type EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) ou encore TGF (*transforming growth factor*) (2) stimulant directement la prolifération et la différenciation de cellules souches et intermédiaires pour former les cellules luminales définitives qui composent l'épithélium prostatique (Figure 2 et 6).

Ce sont les cellules épithéliales luminales qui sont responsables de la production du liquide prostatique et confèrent à la prostate la capacité de stocker et de sécréter le fluide prostatique qui constitue 25 à 30 % du volume du sperme. Celui-ci est notamment composé de prostasomes (3), vésicules riches en cholestérol de 150 à 200 nm de diamètre, dont le rôle n'est pas élucidé. Le fluide prostatique est expulsé, avec le liquide séminal dans la première fraction de l'éjaculat et jouerait un rôle protecteur des spermatozoïdes en favorisant leur survie et leur pouvoir fécondant dans les voies génitales (4) ou en les protégeant contre les agents pathogènes (5). On trouve également dans les sécrétions prostatiques humaines des kallikréines, dont l'expression est contrôlée par les androgènes, telles que la KLK3 (*Kallikrein 3*) plus connue sous le nom de PSA (*prostatic specific antigen*) qui est en partie responsable de la liquéfaction du sperme grâce à une protéolyse des protéines séménogeline I et II et de la fibronectine. D'un point de vue clinique, ces protéines retrouvées aussi dans le

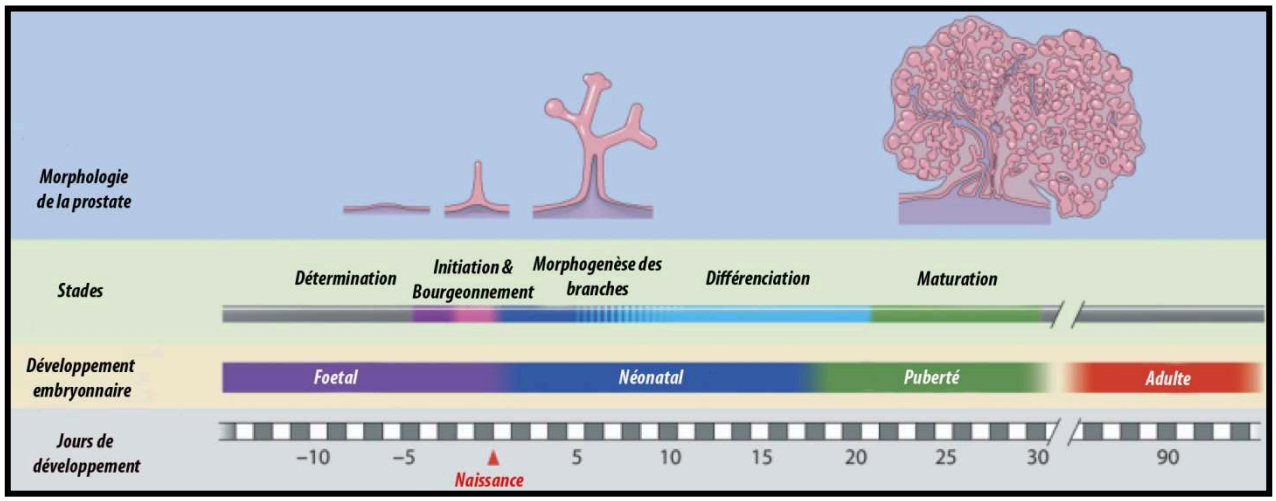


Figure 3 : Morphogenèse de la prostate. Les différents stades développementaux de la prostate sont représentés au cours de la morphogenèse de la prostate chez le rat depuis la période fœtal jusqu'à l'âge adulte. La détermination s'effectue au stade fœtal, le bourgeonnement à la naissance et la morphogenèse des branches à lieu en période néonatale. Enfin, à la puberté, la maturation de la prostate se termine avec l'augmentation des taux d'androgènes circulants.

compartiment sanguin, sont d'un intérêt majeur notamment pour le dépistage d'un dérèglement de la fonction prostatique, comme le cancer (6).

2. Une glande prostatique chez la femme ?

Au risque de surprendre, il faut noter l'existence d'une « prostate » chez la femme. En effet, depuis 2002, les glandes para-urétrales ou glandes de *Skene* ont été officiellement renommées « prostate féminine » par le *Federative International Committee on Anatomical Terminology*. Les fonctions physiologiques de cette glande chez la femme ne sont pas connues. Comme chez l'homme, elle produit du PSA dont le niveau augmente avec la présence de cancer (7). Chez certaines femmes, cette glande est parfois capable d'expulser un fluide au moment de l'orgasme féminin présentant les caractéristiques des sécrétions prostatiques (8).

3. Morphogenèse de la prostate et gènes du développement

Contrairement aux conduits génitaux et aux vésicules séminales qui ont une origine mésonéphrotique, la prostate dérive du sinus urogénital. Son développement peut être divisé en cinq étapes : la détermination, le bourgeonnement, la morphogenèse des branches, la différenciation et la maturation (9) (figure3). Chez l'homme, ce processus se déroule chez le fœtus entre le deuxième et le troisième trimestre pour être ainsi finalisé à la naissance (10). Chez les rongeurs comme la souris ou le rat, l'excroissance des bourgeons épithéliaux s'effectue entre le 16ème et le 19ème jour fœtal (11). A la naissance, les lobes ventraux, dorsaux et latéraux sont à l'état de bourgeons encore non branchés. La morphogenèse des branches se termine entre les 15 et 30 jours post-nataux. La différenciation des cellules épithéliales et mésenchymateuses est coordonnée avec la morphogenèse des branches et s'oriente de manière proximo-distale (12). Chez les rongeurs, la castration chirurgicale ou chimique visant à bloquer l'action des androgènes inhibe le développement de la prostate démontrant que le déterminisme et l'initiation du développement prostatique sont entièrement dépendants des androgènes produits par le testicule fœtal (13). Par ailleurs, la différenciation épithéliale depuis les cellules progénitrices est associée à une augmentation d'expression du gène codant le récepteur des androgènes, médiateur de l'action des androgènes. Les androgènes sont également indispensables pour la croissance terminale et la maturation des lobes prostatiques qui a lieu à la puberté (jours 25-40) lorsque les taux d'androgènes circulants augmentent (9).

Les gènes qui régulent la morphogenèse prostatique peuvent se diviser en trois catégories : 1) les gènes homéotiques, 2) les facteurs de transcription et 3) les ligands de signalisation sécrétés et codés par un petit nombre de gènes très conservés comme les gènes des familles *Hedgehogs, Fgfs, Bmps/Tgfβ* et *Wnt* (14). Dans cette partie, l'accent est mis sur certains gènes connus pour être également impliqués dans les mécanismes moléculaires associés au développement tumoral.

a) Les gènes homéotiques (Hox)

Chez les mammifères, la duplication des gènes a donné lieu à la formation de quatre *clusters* de gènes *hox* (A, B, C et D) portés par des chromosomes différents qui représentent 39 gènes connus pour déterminer le processus développemental d'organismes aussi éloignés que la drosophile et l'Homme. Chez la souris, l'invalidation de *hoxa13* ou *hoxd13* qui s'expriment majoritairement durant la vie fœtale, inhibe la croissance prostatique démontrant ainsi leur rôle fondamental dans le développement de cette glande. Contrairement à ses paralogues A et D exprimés principalement dans le mésenchyme, *hoxb13*, dont l'expression est stimulée par les androgènes, est retrouvé dans le compartiment épithélial et permet ainsi sa différenciation. On peut noter que chez l'homme, *hoxb13* est retrouvé fréquemment surexprimé dans les tumeurs prostatiques (15).

b) Facteurs de transcription

(1) *NKX3.1*

Chez la souris, le pic d'expression de *nkx3.1* a lieu entre les jours 6 et 15 postnataux lorsque l'épithélium subit la cytodifférenciation. Ensuite, les cellules épithéliales conservent une expression plus faible mais fondamentale de *nkx3.1* qui joue un rôle de suppresseur de tumeur puisque la perte de son expression est observée au cours de la carcinogenèse prostatique et de la progression tumorale (16, 17). L'invalidation prostatique de *nkx3.1* chez la souris entraîne la dérégulation de plus de 50 gènes (18) et est associée à des défauts de branchement, des perturbations dans les fonctions de différenciation mais également l'apparition de foyers de néoplasie intraépithéliale (19). Par ailleurs, il a été montré que les androgènes stimulent directement l'expression de *nkx3.1* au cours du développement ce qui représente une voie par laquelle les androgènes contrôlent le développement prostatique (20).

(2) *FOX* (*Forkhead box*) *A1-A2*

FOX A1 joue un rôle dans la morphogenèse des canaux et la maturation des cellules épithéliales (21). Son expression est restreinte aux bourgeons épithéliaux du sinus urogénital et augmente au cours du développement prostatique pour être maintenue ensuite à la vie adulte. A l'inverse, *fox A2* est uniquement exprimé dans les cellules épithéliales à l'interface avec le mésenchyme durant les stades précoces de bourgeonnement (22). Chez l'homme, la surexpression de *fox A1* est toujours corrélée au niveau d'agressivité des tumeurs alors que l'expression de *fox A2* n'est retrouvée que dans les cancers de très haut grade ou dans les carcinomes à petites cellules où il

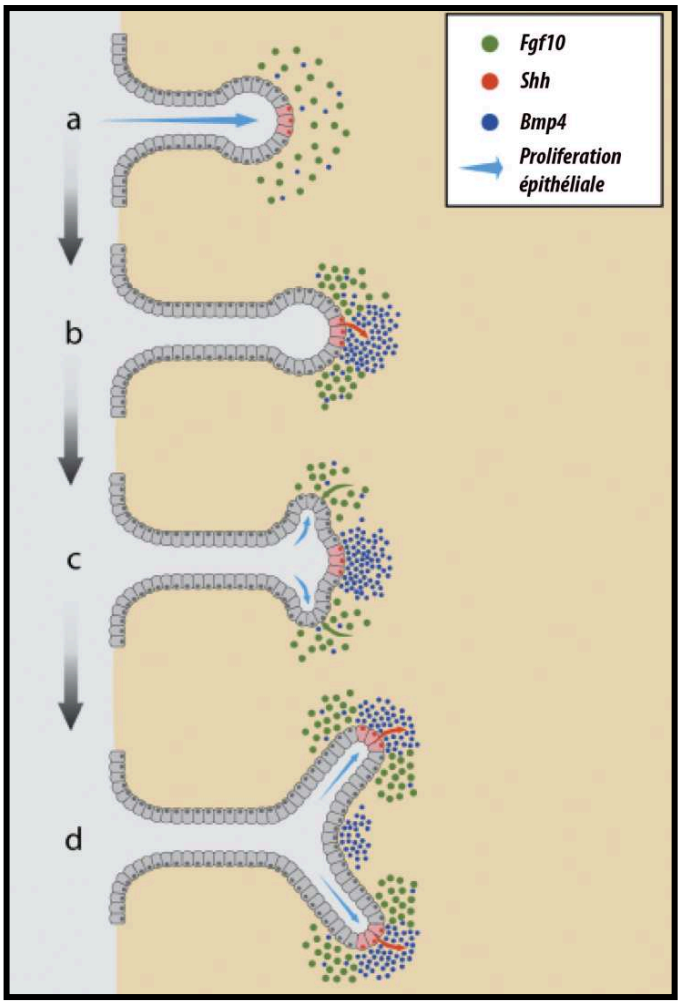


Figure 4 : Bourgeonnement et branchement des canaux : action de SHH, FGF10 et BMP4. Modèle de contrôle de la dichotomie de branchement des canaux prostatiques en développement par l'expression localisée et le « *cross-talk* » de certains morphorégulateurs. L'extrémité distale des canaux exprime SHH alors que le mésenchyme exprime FGF10 et BMP4 (a). Le contact de ces deux types cellulaires permet l'activation de PCT au niveau des cellules mésenchymateuses par SHH sécrété (b) ce qui entraîne une répression locale de FGF10 et une augmentation de l'expression de BMP4. La diminution focale de FGF10 entraine, au niveau latéral, une plus forte expression de FGF10 adjacente au foci d'expression de SHH qui, en retour, réprime BMP4 au niveau de cette région et active ainsi la prolifération des cellules épithéliales *via* le récepteur FGFR2iiib (c). Ceci permet la formation de deux canaux de part et d'autre du foci de sécrétion de SHH et permet l'initiation du branchement (d). Basé sur les travaux publiés par Huang et *al.*, 2005 (29).

favoriserait la progression tumorale vers un stade androgéno-indépendant (23). Les souris *fox A1*-/- ne montrent aucun défaut au niveau du bourgeonnement prostatique. En revanche, la croissance des prostates de ces animaux est réduite avec une formation incomplète des lumières et une absence de protéines de sécrétion (24). La production de sécrétions prostatiques est fortement régulée par les androgènes. Il faut noter que FOX A1 favorise l'action des androgènes pendant la formation de la prostate puisqu'il joue un rôle de co-facteur du récepteur des androgènes (AR). Par exemple FOXA1 est requis pour l'expression des gènes androgéno-régulés codant la probasine et le PSA (24). Ce rôle de co-facteur peut donc expliquer l'absence de sécrétions prostatiques chez les souris *foxA1-/-*.

(3) *NOTCH-1/ DELTA / JAGGED*

NOTCH-1 est un récepteur transmembranaire activé par les protéines JAGGED/DELTA présentes au niveau de la membrane des cellules. Cette activation entraîne un clivage de NOTCH et la translocation de sa partie cytoplasmique au niveau du noyau pour interagir avec des facteurs de transcription et réguler l'expression de gènes cibles tels que *hes-1 (hairy-enhancer of spli*). *Notch-1* est fortement exprimé dans le compartiment épithélial à la naissance et jusqu'à la morphogenèse puis son expression diminue à l'âge adulte (25). *Dll1* (*delta-like ligand 1*) est exprimé au niveau des cellules épithéliales adjacentes au mésenchyme, à l'endroit où les bourgeons émergent. L'autre ligand, JAGGED1 est plutôt exprimé au niveau du mésenchyme et des cellules épithéliales du sinus urogénital (26). Le blocage du clivage de NOTCH par des inhibiteurs de protéases diminue la morphogenèse des branches et la différenciation épithéliale de la prostate chez le rat (27) indiquant son rôle clé au cours de la morphogenèse prostatique. L'invalidation conditionnelle de NOTCH-1 à partir du 15ème jour post natal dans la prostate entraîne une diminution des sécrétions et une augmentation de la prolifération des cellules intermédiaires (27). Ces résultats confortent le rôle de NOTCH-1 dans l'inhibition de la prolifération des cellules progénitrices et comme acteur important dans le processus de différenciation cellulaire. Paradoxalement, NOTCH et son ligand JAGGED1 sont tous les deux retrouvés surexprimés dans les cancers de la prostate et la répression de NOTCH-1 et/ou JAGGED1 est associée à une inhibition de la croissance, migration et invasion cellulaire ainsi qu'à une induction de la mort cellulaire par apoptose par inactivation de la signalisation AKT, mTOR (*mammalian target of rapamycin*), et NF-kappaB (28).

c) Les molécules de signalisation sécrétées

(1) *SONIC HEDGEHOG* (SHH)

SHH est une glyco-protéine produite par les cellules épithéliales à l'interface avec le mésenchyme dans les stades précoces de l'induction du bourgeonnement prostatique. Chez la souris, l'expression de *patched* (*ptc*), codant le récepteur de SHH, est localisée au niveau des cellules mésenchymateuses ce qui souligne l'action paracrine de SHH (Figure 4). La liaison de SHH sur PTC entraîne une inhibition de *Smoothened* (*smo*) responsable d'une activation du facteur de transcription

GLI. Par ce mécanisme, SHH est capable de contrôler l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines sécrétées et des gènes homéotiques, ce qui fait de SHH un des plus importants régulateurs impliqués dans la morphogenèse prostatique. Par exemple, l'expression de *nkx3.1* est dépendante de l'expression épithéliale de *shh* (30). A noter également, une action autocrine de SHH puisque PTC est retrouvé, mais dans une moindre mesure, au niveau des cellules épithéliales. Le blocage de l'action de SHH par un anticorps montre que la signalisation SHH est requise pour l'initiation du bourgeonnement et l'élongation des canaux (31). Pour autant, une étude a montré la mise en place du bourgeonnement et de l'élongation dans la prostate de souris *shh*-/- ce qui prouve que *shh* n'est finalement pas indispensable pour ces phénomènes (32). Une analyse plus approfondie des souris *shh-/-* montre l'existence d'un mécanisme de compensation par la sécrétion importante de IHH (*indian hedgehog*), un autre membre de la famille *hedgehog*, normalement absente de la prostate de souris sauvage (33). On peut noter enfin que l'expression de *shh*, qui est positivement régulée par les androgènes, est augmentée dans les tumeurs prostatiques (34).

(2) *FIBROBLAST GROWTH FACTOR-10 (FGF-10)*

Chez la souris, FGF-10 est impliqué dans l'initiation et l'orientation des excroissances des bourgeons mais aussi dans le branchement des canaux. En effet, les souris *fgf-10*-/- présentent un nombre de bourgeons très limité ainsi qu'une croissance prostatique restreinte (35). L'expression de *fgf-10* est limitée au niveau distal dans le mésenchyme de la glande où il joue un rôle de chimioattractant pour l'élongation des canaux (36). En modèle de culture organotypique, l'induction du branchement des canaux par *fgf-10* mobilise la voie MEK1/2 pour le contrôle de la morphogenèse comme le démontre l'utilisation d'inhibiteur de MEK1/2 (37). FGFR2iiib, le récepteur membranaire de FGF-10, est exprimé au niveau des cellules épithéliales soulignant l'action paracrine de FGF-10 au cours du développement prostatique. Les souris invalidées pour FGFR2iiib ne présentent pas de prostate ventrale soulignant la dépendance de ce lobe vis-à-vis de FGF10. En revanche, ces animaux présentent les lobes dorsaux et latéraux même s'ils restent peu développés (38). De manière intéressante, le blocage par un antagoniste de FGFR2iiib montre que la signalisation FGF-10 est essentielle pour la stimulation de *shh* et *hoxb13* par les androgènes (20). De plus l'expression de *fgf-10* et de *fgfR2iiib* est sensible aux androgènes, ce qui place la signalisation FGF10 au cœur des processus de morphogenèse prostatique régulés par les androgènes. Enfin, il faut noter que la surexpression de *fgf-10* au niveau du mésenchyme prostatique chez la souris entraîne la formation d'adénocarcinomes prostatiques (39).

(3) Les membres de la famille TGFβ

TGFβ1 (*transforming growth factor 1*) est un membre de la superfamille des TGFβ qui agissent généralement comme des inhibiteurs de la prolifération cellulaire au cours du développement. Chez la souris, *tgfβ1* est exprimé en période post-natale au niveau de cellules du mésenchyme et décrit comme impliqué dans la répression de *fgf-10* par TGFβ1. Par ailleurs, les gènes codant les récepteurs

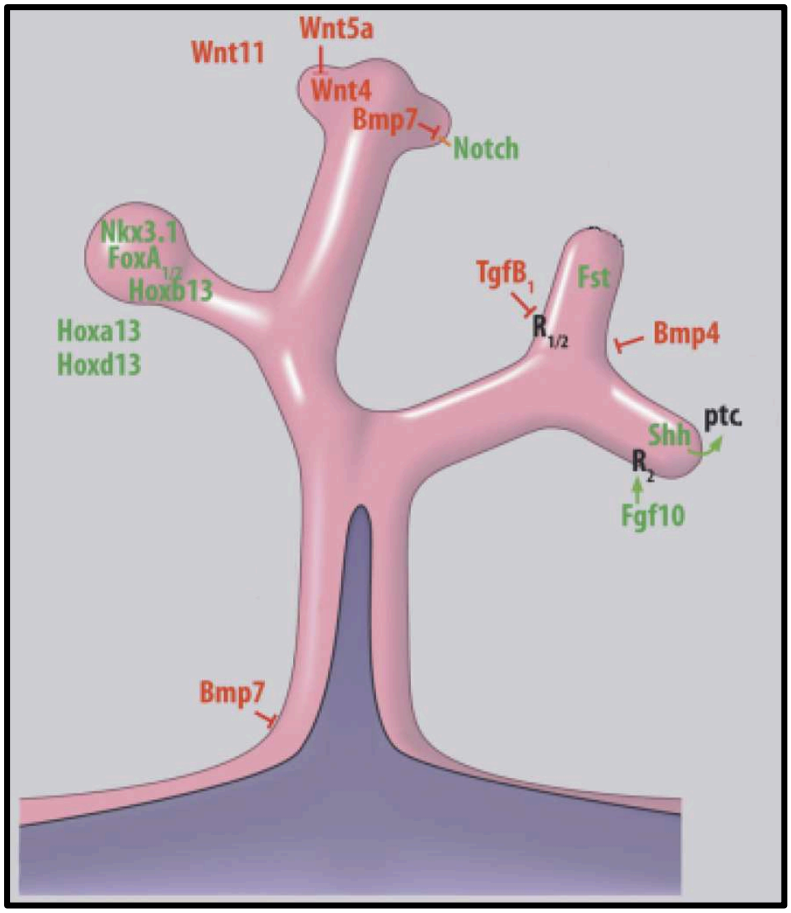


Figure 5: Schéma récapitulatif de l'action des acteurs régulant la morphogenèse prostatique. Modèle schématique de l'élongation et du branchement des canaux prostatiques montrant la localisation de plusieurs facteurs de transcription, des facteurs morphogènes sécrétés et leurs récepteurs respectifs. Les facteurs en vert montrent une action stimulatrice et à l'inverse, en rouge sont représentés les facteurs inhibiteurs. Les flèches symbolisent une action paracrine depuis le mésenchyme ou l'épithélium en direction des morphogènes sécrétés. A l'inverse les « T » symbolisent une inhibition.

tgfβrI et *tgfβrII* qui sont exprimés au niveau des cellules stromales et épithéliales permettent une inhibition de la croissance prostatique en agissant sur les deux types de population au cours du développement (40) (Figure 4). La perte d'expression de ces deux récepteurs est corrélée à la progression tumorale et pourrait constituer un mécanisme utilisé par les cellules tumorales pour échapper à l'inhibition de croissance induite par TGFβ1 (41).

Les *bone morphogenetic proteins* (*bmps*) sont des membres de la famille TGFβ et sont également considérés comme des inhibiteurs de la prolifération au cours du développement (Figure 4). Les BMPs sont sécrétés par les cellules épithéliales et se fixent sur des récepteurs transmembranaires, présents à la fois sur les cellules épithéliales et mésenchymateuses, pour activer des voies de signalisation intracellulaire impliquant SMAD 1, 3 et 5. Par exemple, chez la souris, *bmp7* est exprimé entre les jours 1 et 5 post-nataux au niveau des centres distaux. Son invalidation, comme celle de *bmp4*, multiplie par deux le nombre de branches (26) (42) ce qui démontre ainsi le rôle inhibiteur des BMPs sur la morphogenèse des branches au cours du développement prostatique.

(4) *WNT*

Les gènes *wnt* codent une large famille de 19 glycoprotéines hautement conservées et connues pour leur implication dans le contrôle de la détermination et prolifération cellulaire en se fixant au récepteur membranaire FZL (*frizzled*). La voie canonique induite par cette fixation passe par l'activation de la β-caténine qui transloque au niveau nucléaire pour activer des gènes cibles. Au niveau de la prostate, les gènes *wnt* tels que *wnt4*, *wnt11*, *fzd1*, *fzd7*, *lrp*, *lef1* et *sfrp2* sont fortement exprimés au cours du développement prostatique (43). A ce jour, leur rôle dans le développement normal de la prostate n'est pas très clair. En revanche, plusieurs études montrent une dérégulation de la signalisation WNT au cours de la progression tumorale (44, 45). La mutation de la β-caténine conduisant à une forme constitutivement active dans la prostate de souris entraîne une hyperplasie épithéliale et une métaplasie avec une transdifférenciation des cellules vers un lignage épidermal, ce qui suggère le rôle de la voie WNT canonique dans la détermination, la différenciation et la prolifération des cellules prostatiques (46).

La figure 5 résume l'action de ces différents morphogènes pendant le développement de la glande prostatique.

4. Régulation hormonale

Les régulations hormonales au niveau de la prostate sont multiples et complexes (47). Nous nous limiterons volontairement à celle des androgènes et de façon succincte. Le rôle clé des androgènes au cours du développement prostatique a été brièvement abordé précédemment. A l'âge

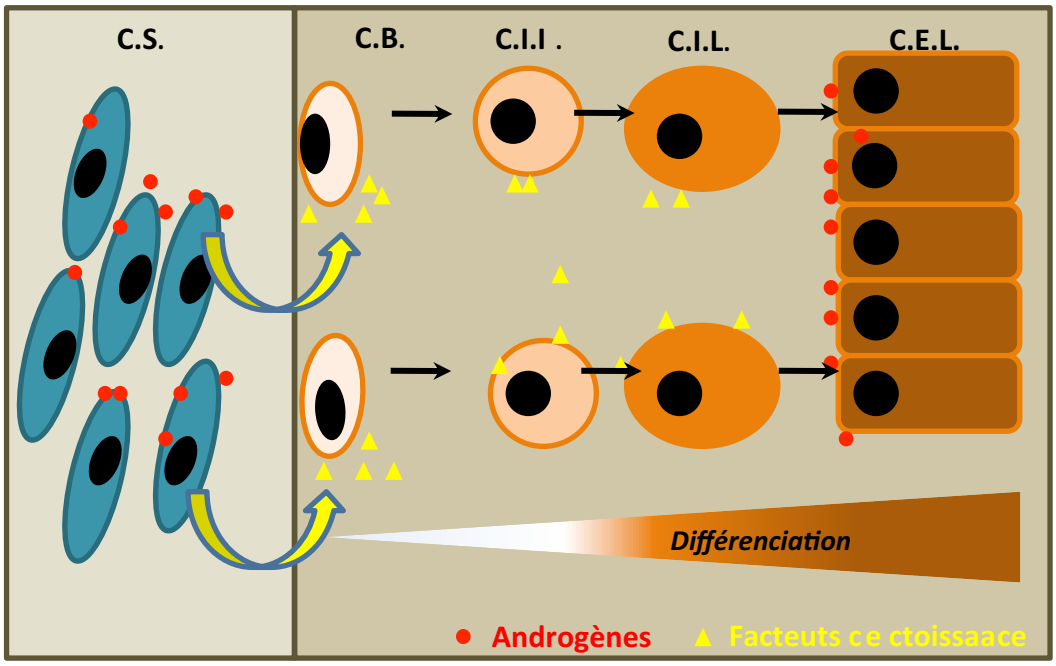


Figure 6 : Action des androgènes sur la prolifération, la différenciation et le maintien des cellules prostatiques. Les androgènes stimulent le maintien de l'épithélium prostatique *via* deux effets majeurs : 1) Ils stimulent la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules stromales (C.S.) qui activent la prolifération et la différenciation des cellules basales (C.B.), des cellules intermédiaires basales (C.I.B.) et luminales (C.I.L.) ; et 2) en stimulant directement la survie des cellules épithéliales luminales (C.E.L.) différenciées.

adulte, une privation androgénique induite, soit par une castration, soit par un traitement pharmacologique, conduit à une involution des épithélia génitaux dont celui de la prostate (48), ce qui démontre la totale dépendance de la prostate vis-à-vis des androgènes tout au long de la vie. Au niveau de la prostate, la testostérone est transformée en DHT (dihydro-testostérone) par la SRD5A2 (5α-réductase de type 2). L'affinité de la DHT (kd = 0.3nM) pour son récepteur AR (*androgen receptor*) est supérieure à celle de la testostérone (kd = 1nM). L'activité SRD5A2 est donc fondamentale pour le maintien de l'homéostasie de la prostate par les androgènes. Les androgènes agissent non seulement sur les cellules stromales pour stimuler la production de facteurs de croissance indispensables au renouvellement et au maintien des cellules épithéliales, mais aussi directement les cellules luminales afin de permettre le maintien de leurs fonctions différenciées telles que la production des sécrétions (48) (Figure 6).

5. Les pathologies de la glande prostatique

Chez l'homme, il existe différentes pathologies de la prostate telles que la prostatite, l'hyperplasie bénigne de la prostate (BPH), décrites ci-dessous et le cancer de la prostate qui sera plus amplement détaillé dans le chapitre I B (page 16).

a) Les prostatites

La prostatite est une inflammation de la prostate fréquemment retrouvée chez l'homme âgé. Il existe 4 formes. Trois d'entre elles sont peu communes : les prostatites bactériennes aigües (catégorie I) qui résultent d'une infection de la prostate (80% *E. coli* et 20% *P. aeruginosa*, *S. marcenscens*, *Klebsiella spp*, *P. mirabilis*) et les prostatites chroniques (catégorie II) qui sont des infections récurrentes de la prostate. Ces deux types de prostatite, sont traités par des antibiotiques. La prostatite chronique non bactérienne ou syndrome de douleur pelvienne chronique (catégorie III), qui représente 95% des prostatites diagnostiquées et dont l'étiologie n'est pas connue, est traitée par des alpha-bloquants, des massages de la prostate ou des antihistaminiques. Les prostatites de catégorie IV, très peu répandues dans la population générale, sont des formes de leucocytoses, c'est-à-dire la présence de leucocytes dans les tissus et sécrétions prostatiques.

b) L' hyperplasie bénigne de la prostate (BPH)

La BPH est une pathologie de l'homme vieillissant, de 55 ans et plus. Les signes d'appel principaux sont : une difficulté à la miction et le besoin fréquent d'uriner. La BPH se caractérise par

une augmentation du volume de la zone transitoire de la prostate entraînant une constriction de l'urètre plus ou moins importante en fonction de l'avancement de la pathologie.

Les traitements sont médicamenteux ou chirurgicaux. L'administration d'alpha-1-bloquants, tels que la Tamsulosine® permet de diminuer le tonus des muscles lisses de la vessie et de l'urètre et celle d'inhibiteurs de la 5-alpha réductase de type II tels que le Finastéride® entraîne une diminution du volume prostatique avec amélioration des symptômes. Dans des cas plus avancés, il convient d'avoir recours à une résection trans-urétrale. Il s'agit alors de retirer, par une sonde introduite dans l'urètre du patient, l'intégralité ou une partie de la prostate. Depuis peu, cette ablation peut être réalisée par d'autres techniques faisant appel aux lasers, micro-ondes ou électrovaporisation. Il faut noter que l'incontinence et l'éjaculation rétrograde, c'est-à-dire vers la vessie et non vers l'extérieur, sont deux complications classiques de ce type d'intervention.

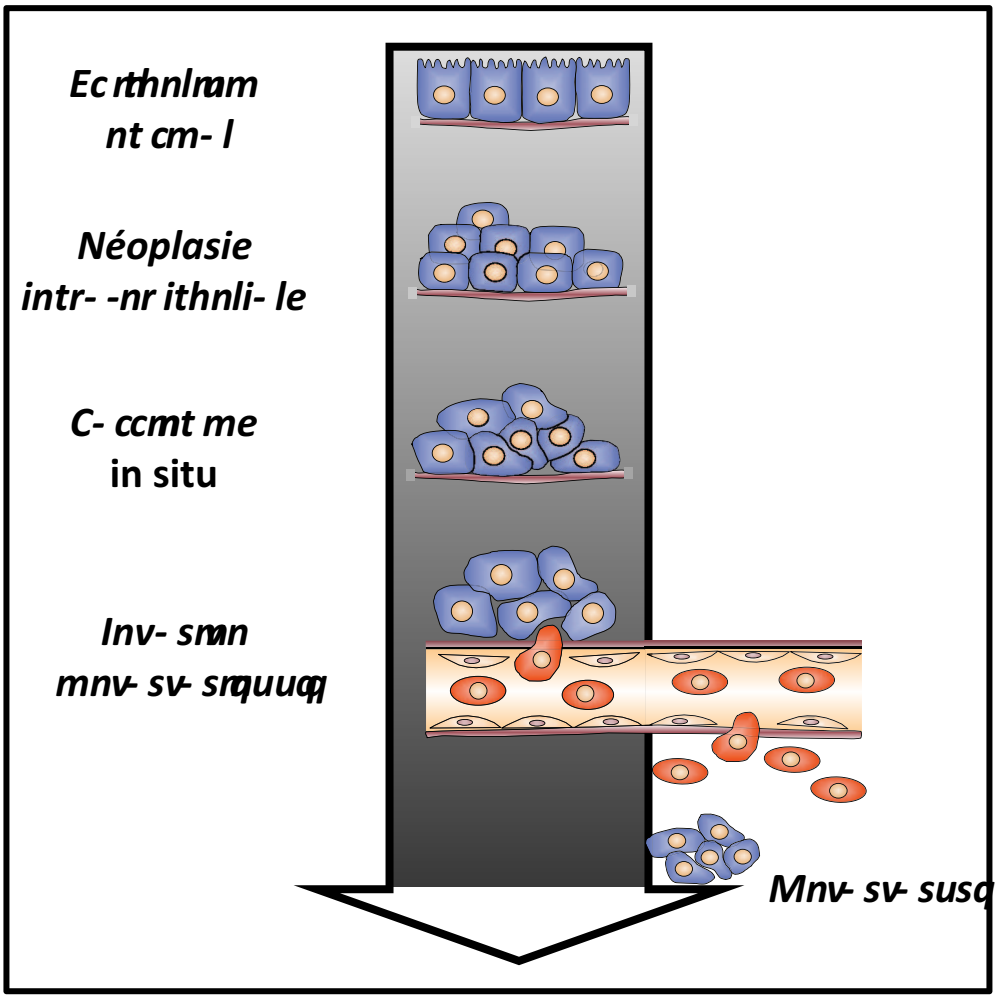


Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes de l'évolution tumorale au niveau de l'épithélium prostatique. Les cellules épithéliales prolifèrent de manière incontrôlée conduisant à la formation de néoplasies intra-épithéliales. Ensuite, les cellules peuvent acquérir différents degrés d'agressivité pour donner lieu à l'apparition de carcinomes *in situ*. Dans certains cas, il est possible d'observer la formation de tumeurs secondaires (métastases) lorsque les cellules envahissent les compartiments sanguin et lymphatique pour aller coloniser des tissus/organes périphériques.

B. Le cancer

1. Stades d'évolution de la pathologie

La formation d'un adénocarcinome au niveau de la zone périphérique de la prostate est un processus relativement long au cours duquel il est possible de distinguer différentes étapes (Figure 7). De nombreux arguments suggèrent que les néoplasies intra-épithéliales ou PIN (*prostatique intra-neoplasia*) sont des précurseurs des adénocarcinomes. La mise en place des PIN se traduit par une désorganisation des structures d'unités prostatiques. En fonction de leur architecture et de leur cytologie, elles sont classées en PIN de bas ou de haut grade (49). Les PIN de haut grade seraient une transition entre les PIN de bas grade et les carcinomes invasifs (1, 50). La perte de la lame basale est la principale caractéristique qui permet de distinguer le carcinome invasif de la PIN de haut grade. Au stade de carcinome, les cellules épithéliales basales et luminales présentent une très forte activité de prolifération. Cette augmentation du nombre de cellules se traduit par une forte production de PSA détectable au niveau plamatique. Les cellules peuvent ensuite évoluer vers un stade encore plus agressif où elles deviennent capables d'envahir les tissus périphériques notamment les vésicules séminales mais aussi la vessie ou le rectum (51). Le stade ultime des tumeurs prostatiques se traduit par la formation de métastases. Elles sont associées à une perte d'adhérence des cellules entre elles et à la matrice extra-cellulaire, un passage dans le système lymphatique ou sanguin et une colonisation des tissus périphériques tels que les ganglions lymphatiques, les os ou encore le cerveau (52-54).

2. Epidémiologie

L'âge moyen des patients atteints de cancer de la prostate oscille, en fonction des données épidémiologiques, entre 72 et 74 ans. 85% des patients sont diagnostiqués après 65 ans et les risques de développer un cancer de prostate à 85 ans s'échelonnent de 0,5 à 20 % à travers le monde. En France, le cancer de la prostate représente le premier cancer en terme d'incidence et la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme après le cancer du poumon et celui du gros intestin (55). Son incidence (59,3 cas pour 100 000 par an) a augmenté de manière très importante ces deux dernières décennies avec un taux annuel moyen d'évolution de + 8,5% entre 2000 et 2005 (55). L'incidence du cancer de la prostate varie énormément en fonction des pays concernés (56). Les taux les plus importants sont retrouvés aux Etats-Unis particulièrement chez les américains d'origine africaine (185,4 cas pour 100 000 par an). A l'inverse, avec 1,7 nouveau cas pour 100 000 par an, la Chine fait partie des pays qui présentent une incidence très faible du cancer de la prostate (figure 8). Ces données

Afrique	Congo	29,0
	Kenya	16,6
	Senegal	7,5
	Uganda	38,0
	Zimbabwe	27,4
Amérique du nord	Canada	78,2
	Etats Unis	124,8
	Etats Unis, blancs	107,8
	Etats Unis, noirs	185,4
Asie	Chine	1,7
	Taiwan	3,0
	Israel	47,5
	Japon	12,6
	Corée	7,6
	Thailande	4,5
Europe	Autriche	71,4
	France	59,3
	Hongrie	34,0
	Islande	75,2
	Norvège	81,8
	Espagne	35,9
	Suède	90,9
	Suisse	77,3
	Royaume Unis	52,2
Océanie	Australie	76,0
	Nouvelle Zélande	100,9

Figure 8 : Incidence (pour 100 000 habitants) du cancer de la prostate standardisé à l'âge dans le monde. D'après Hass et al. 2009 (56).

suggèrent l'existence de plusieurs composantes dans la survenue du cancer de la prostate. Les facteurs qui favorisent, ou à l'inverse, protègent du cancer de la prostate peuvent être schématiquement regroupés en plusieurs catégories.

a) Les facteurs endogènes

Les différences d'incidence liées à l'origine ethnique, pouvant être considérées comme facteurs endogènes, ne seront pas abordées ici car elles sont le reflet trop complexe de plusieurs paramètres qui incluent par exemple, les composantes génétiques et alimentaires mais aussi les moyens de diagnostic (pour revue lire (57)).

(1) L'âge

Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer l'influence du vieillissement sur l'oncogenèse prostatique. L'une d'entre elles est la formation d'adduits à l'ADN (acide désoxyribonucléique) due l'accumulation progressive des espèces oxygénées réactives (EOR) responsables d'un déséquilibre du statut pro-oxydant/antioxydant des cellules. Par différents mécanismes, cela conduit à une augmentation de la fréquence des cassures d'ADN dans la plupart des tissus créant ainsi un environnement propice aux mutations et au développement de cancers. En effet, avec l'âge, l'activité des enzymes anti-oxydantes impliquées dans la détoxication des EOR comme les superoxide-dismutases (SOD), la catalase ou les glutathion peroxydases est observée. La consommation de certains produits antioxydants pourrait donc compenser l'activité de ces enzymes et réduire la survenue de cancer de la prostate.

(2) Les gènes

D'un point de vue épidémiologique, on peut distinguer les formes du cancer de la prostate héréditaires et sporadiques. Parmi tous les gènes impliqués dans la survenue du cancer de la prostate, il convient donc de dissocier deux catégories : 1) ceux qui confèrent un caractère héréditaire à la pathologie et qui font bien partie des facteurs strictement endogènes et 2) les gènes retrouvés fréquemment dérégulés et/ou mutés souvent associés aux cancers sporadiques et dont l'origine des dérèglements, bien souvent peu ou pas connue, peut être liée aux facteurs exogènes. Ces gènes feront l'objet du chapitre IC (page 27) qui traite des bases moléculaires du cancer.

« *The failure to identify highly penetrant genes in hereditary prostate cancer may result from the fact that multiple genes with a small to moderate effect are involved in hereditary prostate carcinogenesis* » (58)

Contrairement à d'autres types de cancer, il n'y a pas de gène identifié à ce jour avec une très forte pénétrance associé au cancer de la prostate. Cependant on peut retrouver des polymorphismes (Ser217Leu et Ala541Thr) de ELAC2 dans certaines familles (59). ELAC2 serait une hydrolase mais sa fonction n'est pas encore bien établie. Son implication dans le cancer reste controversée puisque toutes les études menées sur de larges cohortes de patients ne confirment pas cette association (60, 61). Certaines délétions dans les gènes RNASEL (62) et MSR1 (63) qui sont impliqués dans la réponse aux infections sont associées au risque héréditaire de cancer de la prostate. Enfin, certains gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire tels que NSB1 (64) et CHEK2 (65) font également partie des gènes de susceptibilité héritée dans le cancer de la prostate. NSB1 fait partie du système de réparation des cassures d'ADN double brin et CHEK2 est un régulateur de p53, acteur dans les voies de signalisation mises en jeu suite aux dommages de l'ADN.

b) Les facteurs exogènes

(1) La nutrition

Les facteurs nutritionnels qui protègent ou au contraire qui favorisent le développement du cancer de la prostate sont nombreux. Parmi ceux-ci, la nature des lipides, qui sont des composants majeurs de notre alimentation est clairement impliquée dans les mécanismes qui influencent le devenir tumoral. Au vu de la complexité de ce sujet et de mon intérêt pour la question, le lien entre les lipides et le cancer de la prostate sera abordé et particulièrement détaillé dans le chapitre IE (page 41).

(a) Les éléments anti-carcinogènes

Puisque le stress oxydant est un facteur important impliqué dans le développement du cancer de la prostate, il n'est pas étonnant que la plupart des molécules présentes dans l'alimentation et connues pour protéger de cette pathologie possèdent des activités antioxydantes. Cependant leur utilisation en nutrition préventive est encore controversée (66) :

- La **vitamine E** (alpha-tocophérol) inhibe la croissance et induit l'apoptose des cellules de cancer de la prostate (67). Différentes études montrent 1) qu'un taux faible de vitamine E est associé à une augmentation du risque de cancer de prostate au moins chez les fumeurs (68) et, 2) qu'il existe une très forte association inverse entre la consommation de vitamine E et le risque de cancer (69). De manière surprenante, bien qu'en culture de cellules, **la vitamine C** qui est connue pour éliminer les EOR et les radicaux libres, inhibe la prolifération des cellules de cancer de prostate (70), la plupart des études épidémiologiques n'ont pas trouvé d'association entre la consommation de vitamine C et le risque de cancer de prostate (71).
- La **curcumine**, polyphénol retrouvé dans *Curcuma longa*, est en phase d'essais cliniques dans le cadre de nombreux cancers en raison de son fort pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et

anti-prolifératif. Le traitement des cellules tumorales prostatiques par de la curcumine est capable de moduler de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la croissance et la survie cellulaire (pour revue lire (72)). On peut noter par exemple que le traitement de cellules LNCaP (*lymph node cancer prostate*) par la curcumine bloque l'action des androgènes, hormone impliquée dans la prolifération cellulaire, en inhibant l'expression de AR et en diminuant ainsi la sécrétion de PSA.

- Le **lycopène**, majoritairement retrouvé dans la tomate, est associé à une diminution du risque de cancer de la prostate (73). Le lycopène est le caroténoïde le plus représenté au niveau de la prostate (74) où il est connu pour s'opposer aux effets délétères des espèces oxygénées réactives grâce à sa forte activité antioxydante. L'exposition des cellules LNCaP à des sérums issus de volontaires sains ayant consommé du lycopène purifié entraîne une augmentation d'expression de *igfbp3*, connu pour être réprimé dans les cancers avancés (75).
- Les **polyphénols** présents dans le thé vert sont également capables d'inhiber l'expression de IGF1 ainsi que de certains maqueurs d'angiogenèse et de métastase tels que VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (76).
- Les **phytoestrogènes** retrouvés dans le soja par exemple semblent également protéger du cancer de la prostate (77). Cette consommation particulièrement importante dans les pays Asiatiques pourrait permettre d'expliquer en partie, la faible incidence du cancer de la prostate retrouvée dans ces pays (78).
- La prostate concentre de manière notable le **zinc** majoritairement dans le noyau des cellules épithéliales. Avec l'âge (79) et dans les cas de cancer (80), sans pour autant en connaitre l'origine, la concentration en zinc dans la prostate et dans le sang diminue. Dans des conditions physiologiques, le zinc est sécrété par la prostate et permet de prolonger la viabilité des spermatozoïdes (81). Enfin, on peut noter qu'une complémentation en **sélénium** réduit l'incidence du cancer de la prostate (82).

Ces données appuient donc l'existence d'une relation entre le stress oxydant et la survenue du cancer de la prostate qui augmente parallèlement avec l'âge. Ceci dit, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle du stress oxydant dans la survenue du cancer.

Enfin une déficience en **vitamine D** et plus précisément en 1,25-dihydroxycholécalciférol [1,25- $(OH)_2D_3$], métabolite de la vitamine D dont les effets sont médiés par son récepteur VDR (*vitamin D receptor*), pourrait être un facteur de risque (83) suggérant une activité protectrice de la vitamine D sur le développement de cancer. Le 1,25- $(OH)_2D_3$ inhibe la prolifération des cellules LNCaP induite par les androgènes (84). De manière surprenante, une forte quantité de vitamine D dans le sérum n'est pas associée à une diminution du risque de cancer de la prostate (85, 86).

(b) Les éléments pro-carcinogènes

La vitamine A, qui regroupe le rétinol et ses dérivés métaboliques, est retrouvée naturellement sous forme de vitamine préformée dans les aliments d'origine animale, les produits laitiers et les poissons ou sous forme de pro-vitamine A dans les caroténoïdes. Une association positive entre consommation de vitamine A préformée et cancer de prostate est rapportée dans la majorité des études (87). En revanche, l'association entre la présence de vitamine A dans le sérum et risque de cancer est plus incertaine (88).

Plusieurs études ont montré une association positive entre la consommation de lait et le risque de cancer de la prostate. Il est cependant difficile de distinguer les effets des lipides, également présents dans les produits laitiers, des effets du **calcium**. Ceci dit, les hommes qui consomment beaucoup de calcium développent plus facilement un cancer avancé de la prostate (89). La forte consommation de calcium pourrait inhiber la formation de 1,25- $(OH)_2D_3$ présentant un rôle protecteur (90).

(2) Les agents environnementaux

Quant à l'existence d'un potentiel risque de tel ou tel facteur environnemental sur le cancer de la prostate, les études sont souvent controversées. Cependant il semble se dégager quelques agents à risques. Par exemple, l'exposition à certains **pesticides** comme le bromure de méthyl (agent alkylant), le DTT (dithiothréitol) ou encore l'heptachlore augmente le risque (91). Les **perturbateurs endocriniens** retrouvés dans certains produits agricoles et industriels, plastiques et détergents sont connus pour avoir des activités oestrogéniques. Une exposition à ce type de molécules peut être associée à une augmentation de risque de cancer de la prostate (92). Enfin le **cadmium**, retrouvé entre autres dans les colorants et les plastiques industriels, semble s'accumuler de manière notable dans les tumeurs prostatiques par rapport aux tissus sains ou même aux zones atteintes de BPH (93). En parallèle les études montrent une corrélation positive entre l'exposition au cadmium et le risque de développer un cancer de la prostate (94).

Le cancer de la prostate est donc une pathologie multifactorielle avec l'implication 1) de composantes génétiques visiblement mal connues ou faibles au vue de la prévalence des gènes identifiés et 2) de composantes environnementales et nutritionnelles protectrices comme la plupart des vitamines, le zinc, le sélénium, les phyto-oestrogènes et le lycopène, ou à l'inverse délétères telles que certains pesticides, le DTT, le cadmium ou le calcium. Ces facteurs exogènes ont clairement un impact sur le risque de développement du cancer de la prostate.

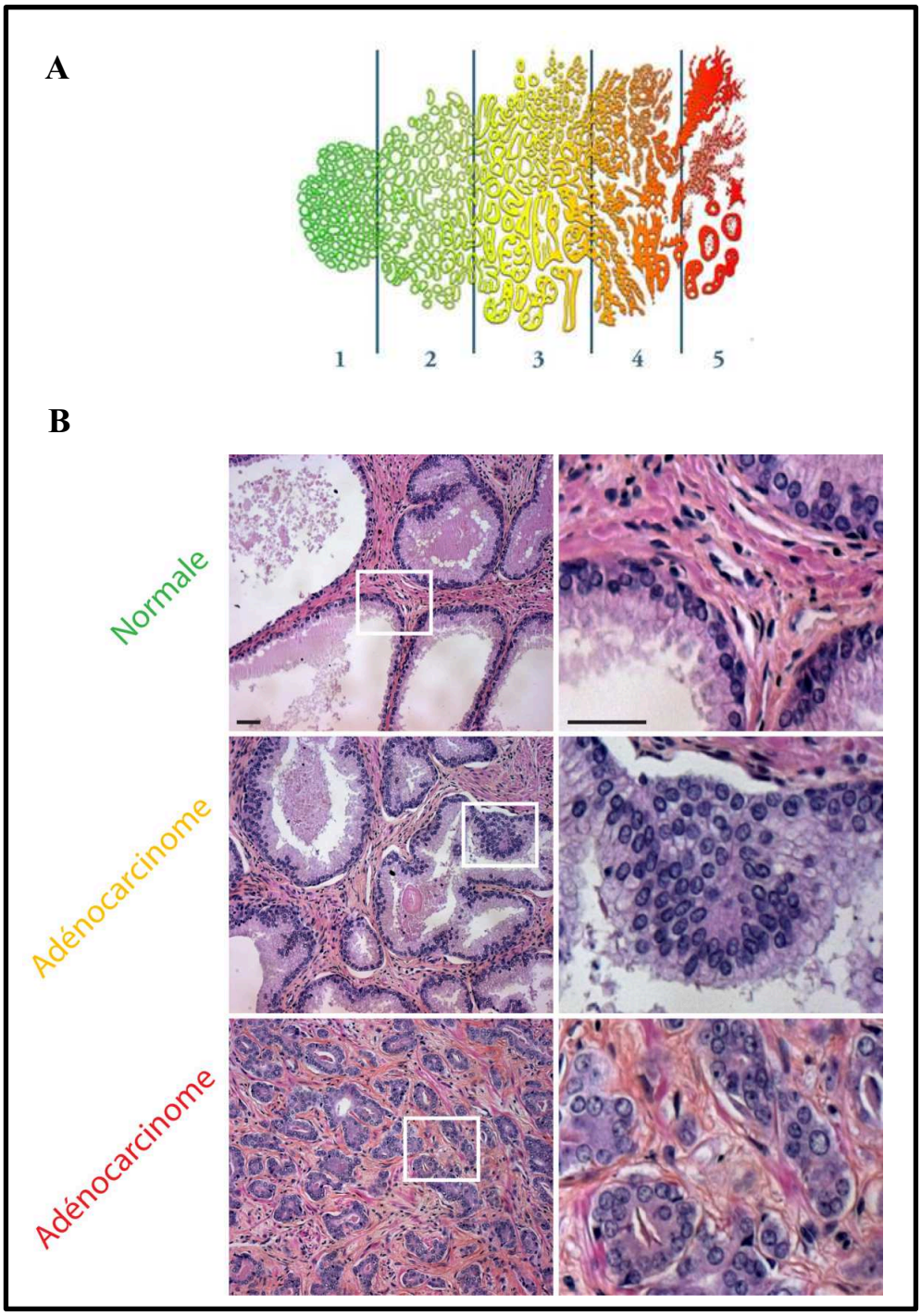


Figure 9: Différents grades de cancer de la prostate chez l'homme. (A) Vue schématique de l'histologie prostatique à cinq grades différents selon la classification de Gleason. (B) Clichés histologiques de coupes de biopsies prostatiques normales ou présentants un adénocarcinome de grade 3 (en jaune) à 5 (en rouge). La barre d'échelle représente 50 µM.

3. Diagnostic du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est asymptomatique jusqu'à des stades relativement avancés. Alors, il peut entraîner une rétention d'urine, une hématurie (sang dans les urines), une impuissance sexuelle ou encore des douleurs et/ou un dysfonctionnement d'autres organes lié à la présence de métastases. Il peut être diagnostiqué précocement lors d'un dosage sanguin de PSA, ou fortuitement lorsqu'une HBP (hypertrophie bénigne de la prostate) est initialement soupçonnée. Contrairement à la HBP, le cancer a pour origine la zone périphérique de la prostate. Ainsi, lors du toucher rectal il est possible de distinguer les deux pathologies. Le diagnostic est ensuite confirmé ou infirmé par analyse microscopique d'échantillons de biopsie (figure 9). Lorsqu'il s'agit d'un cancer, il faut ensuite déterminer l'étendue de l'invasion tumorale. Au niveau local, ceci est réalisée par une IRM (imagerie par résonnance magnétique) abdomino-pelvienne puis au niveau périphérique, par une scintigraphie osseuse pour rechercher la présence d'éventuelles métastases, puisque l'os qui offre un microenvironnement favorable aux cellules tumorales prostatiques, est un des tissus de prédilection pour le développement de métastases (95) (pour revue lire (96)).

4. Classification du grade tumoral

a) La classification TNM

La classification TNM est un système international qui permet de classer tous les cancers selon leur extension anatomique. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour *node*) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient. La lettre **T** symbolise la tumeur initiale. Elle est cotée de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion, et de la fixation aux organes voisins. La lettre **N**, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. La lettre **M** est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple.

b) Le score de Gleason

En présence d'un cancer, le pathologiste examine des échantillons histologiques de tissu prostatique afin de déterminer le grade de la tumeur. Ce grade indique à quel point le tissu tumoral diffère du tissu prostatique normal. Il permet de prévoir la vitesse d'évolution/de progression de la

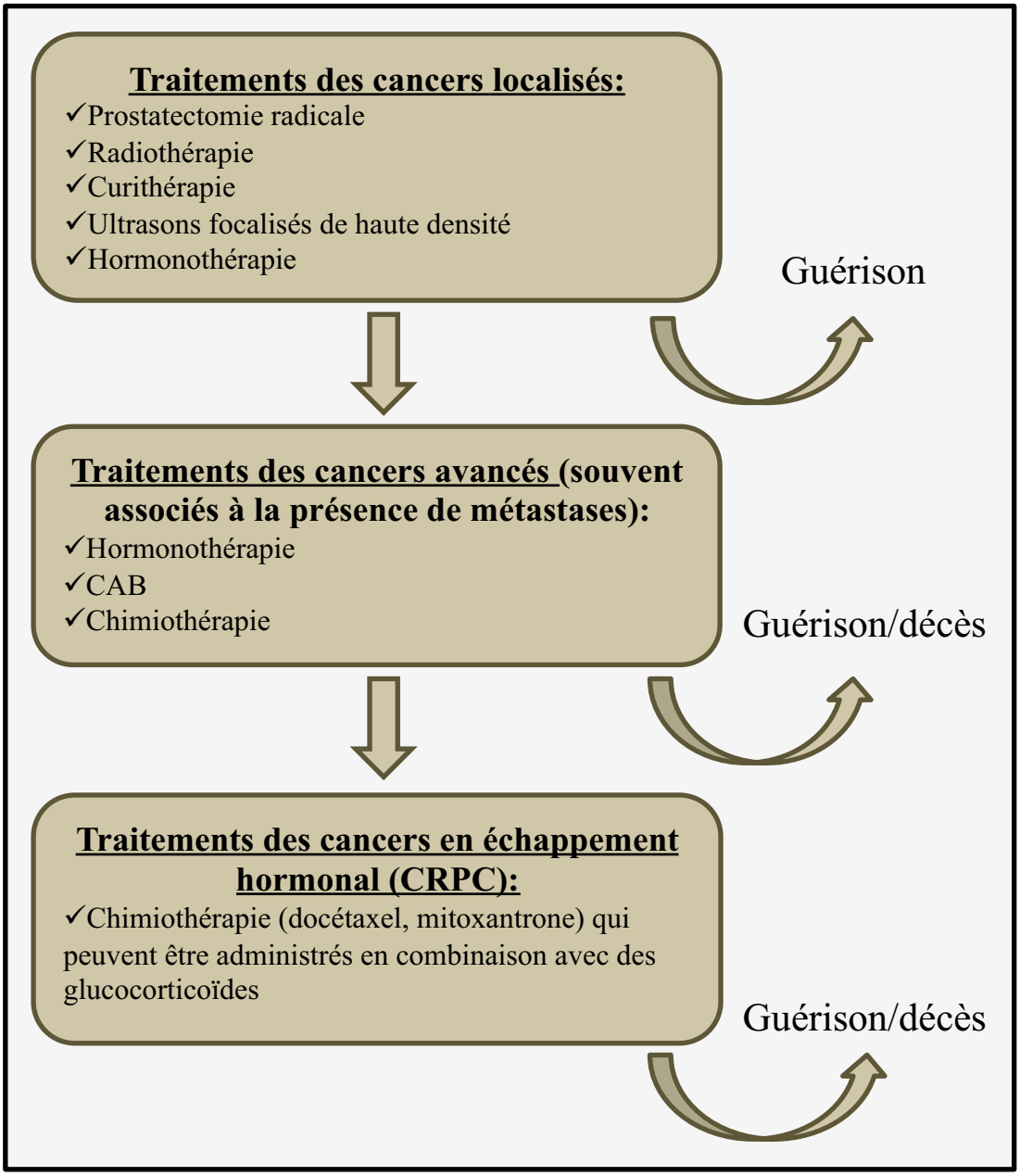


Figure 10 : Schéma regroupant les différents traitements couramment utilisés en fonction de l'avancé du cancer de la prostate. CAB (*Combined androgene blocage*), CRPC (*castrate-resistant prostate cancer*). D'après les données de Simmons et al, 2009 ; Berthold et al, 2005 (97, 98).

tumeur. Les tumeurs dont le grade est élevé ont tendance à se développer et à progresser plus vite que celles dont le grade est faible. Le score de Gleason est un système d'attribution d'un grade aux tumeurs. Le pathologiste attribue un grade de 1 à 5 à chaque zone du cancer (Figure 9). Le score de Gleason est obtenu en additionnant les deux grades les plus fréquents ou en additionnant le grade le plus fréquent et le grade le plus élevé (le plus anormal). Les scores de Gleason vont de 2 à 10. Les tumeurs de score 2 à 4 sont qualifiées de cancers de bas grade de malignité, celles de 5 à 7 de cancers de grade intermédiaire et les scores de 8 à 10 correspondent aux cancers de prostate de haut grade, les plus agressifs et évolutifs.

Cette classification très approximative, car fortement dépendante du praticien effectuant la lecture des lames, reste pourtant l'outil de diagnostic le plus fiable actuellement.

5. Les traitements du cancer de la prostate

Plusieurs paramètres entrent en compte et orientent le choix du traitement. Il s'agira de choisir entre une ablation chirurgicale (prostatectomie), une radiothérapie, l'utilisation d'ultrasons, une hormonothérapie ou encore une chimiothérapie (Figure 10) (99).

a) La prostatectomie

La prostatectomie est réservée aux cancers localisés à la prostate. Au cours de l'intervention chirurgicale, le praticien tente, dans la mesure du possible, de préserver les bandelettes neuro-vasculaires responsables de l'érection. Si l'invasion tumorale est trop importante, celles-ci sont retirées ou endommagées et le patient présentera alors des troubles de l'érection plus ou moins importants. La deuxième complication majeure de la prostatectomie est l'incontinence urinaire le plus souvent passagère. Deux mécanismes ont été avancés dans la littérature, une lésion du sphincter strié de l'urètre directe pendant l'opération à l'origine d'une déficience sphinctérienne et/ou une instabilité vésicale post-opératoire (hyperactivité vésicale). La prostatectomie peut être radicale ou totale en fonction de l'étendue de la tumeur. Il existe deux manières de procéder : la coelioscopie et la cryoablation. La coelioscopie est réalisable par voie transpéritonéale ou par voie sous péritonéale selon les préférences de l'opérateur. La cryoablation permet une destruction du tissu prostatique cancéreux par application locale d'un gaz très froid. La cryosonde (refroidie le plus souvent à l'azote liquide) est introduite en endo-urétral jusqu'à la prostate.

b) La radiothérapie et la curiethérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement locorégional du cancer qui utilise des radiations ionisantes pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. L'irradiation par des rayons X a pour but de détruire toutes les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains périphériques. Elle est donc réservée aux cancers localisés de la prostate.

La curiethérapie est une technique encore peu utilisée en France contrairement aux Etats-Unis qui la pratiquent depuis une dizaine d'années. Elle s'adresse aux tumeurs de la prostate localisées avec un score de Gleason qui ne dépasse pas 6. Il s'agit d'implanter une centaine de grains d'iode 125 à l'aide d'aiguilles échoguidées. Ces grains resteront en place au sain de la prostate de manière définitive. Ainsi la prostate est exposée à de fortes doses de rayons tout en épargnant les tissus sains alentours.

c) Les ultrasons focalisés de haute intensité

Cette technique est récente et non invasive. Son utilisation en première intention est particulièrement bien adaptée à certaines indications et notamment chez les patients atteints de cancer localisé de la prostate non candidats à la chirurgie, soit en raison de leur âge (plus de 70 ans), soit en raison de facteurs de co-morbidité (antécédents, obésité, troubles cardiaques, etc.) En seconde intention, ce traitement a fait les preuves de son utilité dans le cas de patients en situation d'échec après radiothérapie. Le principe consiste à focaliser des faisceaux d'ultrasons de haute intensité dans la prostate de manière à obtenir un effet d'ablation thermique.

d) L'hormonothérapie

Tout comme le développement et le maintien de l'homéostasie de la prostate, la progression du cancer de la prostate est fortement dépendante des androgènes principalement d'origine testiculaire ou secondairement ceux produits localement par conversion de la DHEA (déhydroépiandrostérone) ou de l'androstènedione surrénalienne. Hormis le DES (diéthylstilbestrol), l'hormonothérapie vise donc à bloquer la production et l'action des androgènes. Elle est utilisée dans des cas de cancers parfois localisés, si la chirurgie est contre indiquée, ou plus souvent lors de cancers avancés et métastatiques. Plusieurs moyens existent (Figure 11) dont l'efficacité est variable. La castration physique, testée en 1895 pour la première fois dans le cadre d'hypertrophie de la prostate (100), était initialement la seule solution, elle reste très efficace mais néanmoins peu utilisée de nos jours. Il est possible maintenant de bloquer la production de testostérone (castration chimique) par la prise d'agoniste/antagoniste LHRH (*luteinizing hormone releasing hormone*) ou de ses dérivés métaboliques par des inhibiteurs de la 5-α-

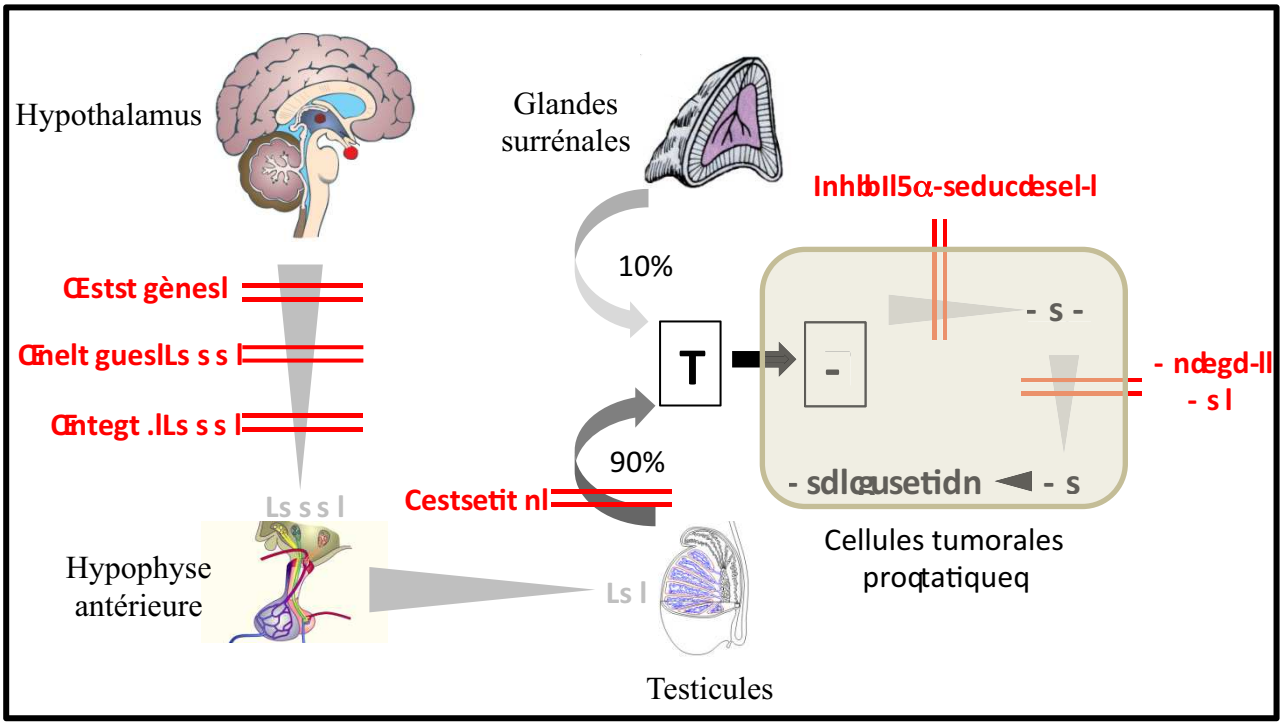


Figure 11 : Hormonothérapie du cancer de la prostate. LHRH (*luteinizing hormone releasing hormone*), LH (*luteinizing hormone*), T (*testosterone*), DHT (*dihydrotestosterone*), AR (*androgen receptor*).

réductase. Enfin, il est possible de cibler le médiateur de l'action des androgènes, AR, par des antagonistes.

(1) Le diéthylstilbestrol (DES)

Le DES qui est un œstrogène semi-synthétique, fut le premier traitement non chirurgical du cancer de la prostate. Son utilisation à grande échelle a par la suite été limitée en raison de sa toxicité cardiovasculaire et de ses effets thromboemboliques. A la dose de 3 à 5 mg par jour, le DES montre une rémission du cancer identique à celle observée après castration mais une mortalité supérieure dus aux accidents cardio-vasculaires (101).

(2) Les agonistes/antagonistes LHRH

Les méthodes de castration « chimique » ont pour principe le blocage de l'axe gonadotrope. Par exemple, l'administration d'agonistes de LHRH (Leuprolide® ou Goserelin®) montre la même efficacité que la castration chirurgicale (102) et que le DES (103). De manière physiologique, LHRH est une hormone sécrétée de manière pulsatile par l'hypothalamus pour l'hypophyse antérieure qui, en réponse, libère la LH (*Luteinizing hormone*) également de manière pulsatile. La LH permet la production de testostérone au niveau des cellules de Leydig dans le testicule (Figure 11). Une stimulation pharmacologique constante de l'hypophyse par des analogues LHRH conduit à une diminution des récepteurs de LHRH et donc de la production de LH et ainsi à une perte de la synthèse de testostérone par le testicule. A l'inverse, il est possible d'administrer des antagonistes de LHRH tels que le Abarelix® dont les effets sur les niveaux de testostérone et de PSA circulants semblent comparables au Leuprolide® (104).

(3) Les inhibiteurs de la 5-alpha-réductase

Le finastéride (Proscar®) est un inhibiteur de la 5-α-réductase, notamment de type 2, présente au niveau du tractus urogénital mâle et responsable de la synthèse de dihydrotestostérone (DHT). Ainsi, il réduit les effets uniquement de la DHT et non de la testostérone, ce qui présente l'intérêt majeur d'éviter les effets indésirables (baisse de la libido principalement) des précédents composés qui s'opposent aux effets généraux des androgènes sur l'organisme entier.

(4) Le CPA (Acétate de cyprotérone)

Le CPA, analogue de l'hydroxyprogestérone, est un stéroïde qui bloque l'interaction des androgènes avec leur récepteur (AR). Il est parfois utilisé en combinaison avec les agonistes LHRH ou la castration car il permet de bloquer l'effet des androgènes résiduels produits à partir des précurseurs surrénaliens. Comme le DES, il entraîne des complications cardiovasculaires, son utilisation est d'ailleurs maintenant interdite aux Etats-Unis.

(5) Les anti-androgènes non stéroïdiens

Les anti-androgènes non stéroïdiens comme le bicalutamide (Casodex®), le flutamide (Eulexin®) ou le nilutamide (Nilandron®) rentrent en compétition avec la testostérone ou la DHT sur

AR afin de limiter leurs effets. Les études montrent une bonne efficacité de ces composés sauf dans les cas de cancers métastasiques où la castration chimique affiche une meilleure diminution du PSA (105).

(6) Le blocage androgénique combiné

Il s'agit de bloquer l'action des androgènes qui sont obtenus par conversion des stéroïdes surrénaliens au niveau périphérique (10% des androgènes totaux) et peuvent ainsi participer à la stimulation de la progression tumorale même après castration. De plus, après 50 ans, le pourcentage d'androgènes surrénaliens circulants augmente (106). Il s'agit donc de combiner à la castration chirurgicale ou aux agonistes LHRH, un anti-androgène non stéroïdien. Après des premières études plutôt prometteuses (107), et de manière inattendue, la plupart des données accumulées à ce jour ne montrent aucun bénéfice de ce type de combinaison (108).

De manière générale, les bénéfices de l'hormonothérapie sont temporaires et ne dépassent pas 30 mois (109). Ainsi, une augmentation du PSA traduisant un échappement vis-à-vis du traitement des cellules tumorales qui deviennent alors pharmaco-résistantes est fréquemment observée. On parle alors de CRPC (*castrate-resistant prostate cancer*). L'utilisation de ces différents composés pharmacologiques utilisés en hormonothérapie permet donc une augmentation de la survie du patient limitée comprise entre 12 et 33 mois (110). L'échappement thérapeutique nécessite alors le recours à d'autres types de prise en charge tels que la chimiothérapie.

e) La chimiothérapie

La chimiothérapie est parfois utilisée pour traiter les cancers de la prostate métastasiques avant hormonothérapie mais principalement pour traiter des CRPC. Le traitement de patients atteints de CRPC par le docetaxel (Taxotère®) permet une survie médiane de 27 mois en moyenne, avec dans 46 % des cas, une diminution >50% du taux de PSA (111).

Le docétaxel favorise le maintien des microtubules en inhibant leur dépolymérisation par liaison stable à la tubuline et entraîne un blocage de la mitose. Au vu de la toxicité du docétaxel, plusieurs combinaisons (notamment avec toute une gamme de glucocorticoïdes) ont été testées afin de limiter sa dose tout en préservant son efficacité (pour revue lire (112)). L'utilisation des corticoïdes se justifie par leur capacité à inhiber la production des précurseurs androgéniques surrénaliens (DHEA et androstènedione) *via* un feedback négatif sur l'hypophyse conduisant à une réduction de la sécrétion d'ACTH (adrénocorticotrophine). De plus, les corticoïdes présentent des propriétés anti-inflamatoires qui conduisent à l'amélioration des douleurs et de l'état général des patients. Un inhibiteur de la topoisomérase de type II peut également être utilisé : le mitoxantrone (Novantrone®) qui interrompt la synthèse et la réparation de l'ADN par son action intercalante.

Au final, en 2004, malgré une certaine toxicité, la première ligne de traitement par docétaxel associé à des corticoïdes (prednisone ; Pred Forte®) est approuvée pour traiter les CRPC (113). Actuellement, les essais se focalisent sur la « chimiothérapie moléculaire » qui vise à augmenter la spécificité vis-à-vis des cellules tumorales et ainsi limiter la toxicité.

(1) Le système GDEPT (*Gene-derived pro-drug therapy*)

Parmi les nouvelles techniques en cours de recherche et développement, on retrouve le système GDEPT composé de deux parties : 1) une prodrogue, relativement peu toxique, administrée de façon systémique, et 2) un gène codant l'enzyme, souvent d'origine bactérienne ou virale, qui convertit la prodrogue en drogue toxique au niveau de la tumeur. Il s'agit alors de vectoriser l'expression de ce gène grâce à des promoteurs spécifiques de la prostate. On peut noter l'utilisation actuelle en phase clinique de deux systèmes qui fonctionnent avec le promoteur de l'ostéocalcine : la thymidine kinase du virus herpes simplex (HSV-tk) associé à du ganciclovir (Cytovene®) (114) et la phosphorylase nucleoside purine (PNP) associé à du 6-Méthylpurine-2' (115). Le système GDEPT peut convenir au traitement des cancers qui ne touchent que des organes non vitaux comme la glande prostatique. En effet, de par la nature des promoteurs utilisés qui sont spécifiques de l'organe, l'inconvénient majeur de la GDEPT est la toxicité qui touche les cellules saines en raison du manque de spécificité vis-à-vis des cellules tumorales.

(2) Le CRAds (*Conditionally replicative adenoviruses*)

Le CRAds repose sur le développement d'un nouveau vecteur dit à réplication conditionnelle : le vecteur adénoviral oncolytique (116) qui se réplique préférentiellement dans les cellules cancéreuses et limite ainsi la toxicité vis-à-vis des cellules saines. Une étude en phase 1 menée sur 20 patients montre une réduction des taux de PSA par ce traitement (117). Pour l'instant cette technique est limitée par la nature des promoteurs utilisés qui ne sont actifs que dans des cancers encore dépendants des androgènes (probasine, psa), ce qui souligne la nécessité de continuer les recherches pour améliorer la nature des promoteurs et des vecteurs.

C. Les bases moléculaires du cancer de la prostate

Quels sont les événements moléculaires responsables de l'initiation/progression tumorale ? En d'autres termes, comment et pourquoi une cellule saine est capable d'échapper aux différents mécanismes de contrôle pour acquérir des capacités de prolifération et de survie lui conférant un caractère tumoral ? Actuellement cette question n'est bien entendu pas totalement élucidée. Ceci dit, l'émergence des nouvelles techniques de biologie moléculaire a permis la mise en évidence de polymorphismes et de dérégulations d'expression génique qui ont contribué à améliorer la compréhension des mécanismes à l'origine de la carcinogenèse.

Dans ce chapitre, il s'agit de souligner les principaux acteurs dont l'expression/activité est fréquemment dérégulée dans les cas de cancer de la prostate. Les gènes impliqués dans la transmission héréditaire de la pathologie et décrits précédemment (page 17) ne seront pas abordés ici, mais il faut bien évidement noter que ces gènes sont également impliqués dans les formes sporadiques de cancer. Nous focaliserons sur les polymorphismes associés aux risques de cancer de prostate ainsi que sur les principaux acteurs dits oncogéniques, c'est-à-dire pro-carcinogènes lorsqu'ils sont activés, et les suppresseurs de tumeurs dont l'inactivation contribue à la formation de cancer.

1. Les fusions TMPRSS2-ETS

Les fusions entre le gène androgéno-régulés TMPRSS2 (*trans-membrane prostease serine 2*), et des gènes membres de la famille des facteurs de transcription ETS (*E-twenty six*), le plus souvent avec le gène ERG (*ETS related gene*), font partie des altérations chromosomiques les plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides humaines (118). Le proto-oncogène ERG est connu pour être surexprimé dans 72% des cancers de la prostate (119). La fusion de ERG avec TMPRSS2 serait à l'origine de cette surexpression (120). En effet, ce réarrangement génère un transcrit hybride qui présente le promoteur de TMPRSS2 avec l'ORF (*open reading frame*) de ERG donnant lieu à la traduction du variant TMPRSS2 : ERG. Des fusions ont été identifiées également avec d'autres membres de la famille ETS tels que ETV1, ETV4 et ETV5. 70% des cancers de la prostate présentent ce type de fusion. De manière intéressante, chez des patients présentant un cancer prostatique multifocal, différentes fusions peuvent être retrouvées au sein des différents foci tumoraux au niveau de la prostate d'un même patient (118, 121). Cette hétérogénéité de variant TMPRSS2 : ETS observable dans un même échantillon cancéreux suggère fortement que les cancers multifocaux présentent différentes populations clonales de cellules tumorales. A ce jour, aucune corrélation

convaincante n'a pu être établie entre la présence de ces fusions et le score de Gleason ou les niveaux de PSA circulants.

2. Les polymorphismes associés au risque de cancer de la prostate

Comme décrit précédemment, les androgènes favorisent le développement tumoral. Dans ce cadre, il n'est alors pas étonnant de retrouver certains polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation androgénique :

- L'action des androgènes sur le développement tumoral est médiée par son récepteur nucléaire AR qui agit comme un facteur de transcription. L'existence de polymorphismes dans le gène codant AR est associée au risque de cancer de prostate. Par exemple, le domaine de transactivation de AR possède deux trinucléotides hautement polymorphes : (CAG)n et (GGN)n. Une diminution du nombre de répétitions CAG, responsable d'un gain de fonction et d'une sur-activation des gènes cibles de AR (122), est associée à un risque de cancer de la prostate (123). Le polymorphisme GGN est plus controversé. En effet, alors que les premières études ont montré une augmentation du risque de cancer de la prostate chez les hommes présentant un faible nombre de répétitions GGN (124), les dernières études ne retrouvent pas forcément cette association (125). La mutation T877A de AR mérite également d'être soulignée. Cette mutation, retrouvée dans les cancers de la prostate métastatiques, est présente dans les cellules LNCaP (126, 127). Elle confère un changement de spécificité du récepteur des androgènes qui devient alors activable par d'autres stéroïdes notamment oestrogéniques (128).
- La 5-α-réductase (SRD5A2) convertit la testostérone en DHT, le métabolite actif sur AR dans la prostate. Plusieurs polymorphismes existent au niveau du gène codant SRD5A2. La substitution A49T qui conduit à la traduction d'une enzyme particulièrement active (129) est associée à une augmentation du risque de cancer. A l'inverse, un autre variant V89L, retrouvé dans des pays présentant un taux particulièrement faible de cancer de la prostate tels que la Chine, le Japon ou le Groenland, diminue l'activité SRD5A2 (130).
- Plus en amont dans la signalisation androgénique, un variant allélique (-34T>C) du gène *cyp17a1* codant l'enzyme responsable de la biosynthèse de la testostérone au niveau du testicule est également associé au cancer de la prostate (131). La transcription de ce variant serait plus active, ce qui provoquerait une augmentation de la production de testostérone et donc une stimulation du processus tumoral (132).

On peut également noter l'existence d'autres polymorphismes, non associés à la signalisation androgénique mais fréquemment retrouvés dans les cancers de la prostate :

- La perte du contrôle du cycle cellulaire est connue pour être un mécanisme important de la promotion tumorale. CDKN1B ($P27^{Kip1}$) et CDKN1A ($P21^{Waf1}$) qui appartiennent à la famille Cip/Kip sont considérés comme des garde-fous de la prolifération cellulaire en inhibant le cycle. Leur polymorphisme conduisant à une perte de fonction est associé non seulement au risque de cancer prostatique (133) mais également à un risque de cancer avancé (134).
- Les variations alléliques de VDR qui diminuent sa transactivation transcriptionnelle sont particulièrement associées aux cancers avancés de la prostate (135). Comme décrit précédemment, une déficience en 1,25- $(OH)_2D_3$, métabolite de la vitamine D, serait un facteur de risque du cancer de la prostate (90). De plus, le traitement par des concentrations physiologiques de vitamine D stimule la différenciation et l'arrêt de la croissance des cellules de cancer de prostate *in vitro* par un mécanisme médié par VDR (136) ce qui souligne le rôle protecteur de VDR dans le développement du cancer de la prostate.
- *Tlr4* (*Toll-like receptor*) code un récepteur qui joue un rôle central dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire innée. Son polymorphisme est associé à une faible augmentation du risque de cancer de la prostate (137). Ceci corrobore les études qui montrent une association entre statut inflammatoire, non abordé dans ce manuscrit, et le cancer de prostate (pour revue lire (138)).

3. Les suppresseurs de tumeur

Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs il faut citer la perte d'expression de *gstp1* (*Glutathione S-transferase 1*) considérée comme l'une des plus importantes dans le cancer de la prostate. L'hyperméthylation de *gstp1* observée dans 90% des tumeurs prostatiques pourrait devenir un puissant marqueur de diagnostic (139). Cette enzyme est impliquée dans la détoxication des produits oxydants et prévient ainsi des dommages à l'ADN (140). La diminution de son expression pourrait expliquer l'augmentation du stress oxydant observé au cours du vieillissement dans la prostate.

Outre le polymorphisme de *cdkn1b* décrit précédemment, il faut souligner que la transcription de ce gène suppresseur de tumeur et l'accumulation de sa protéine, qui est réduite dans les cancers de prostate, sont contrôlées négativement par la voie PI3K-Akt connue pour être elle-même constitutivement activée dans les cellules tumorales. En effet PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) qui joue son rôle de suppresseur de tumeur en inhibant la voie PI3K-Akt est retrouvé

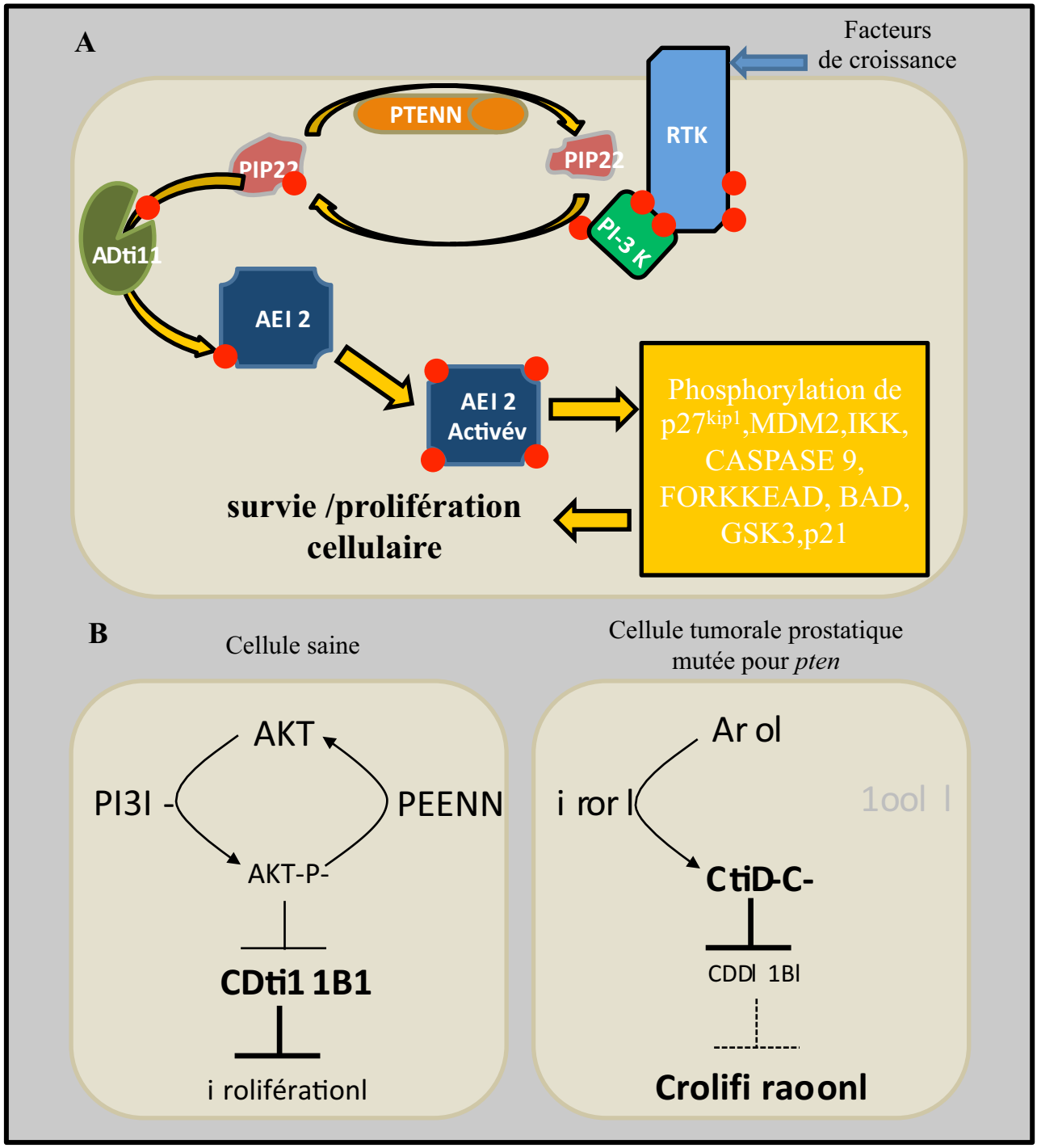


Figure 12 : Mécanisme d'action conduisant à l'activation de la kinase AKT et son implication dans les voies de survie et de prolifération cellulaire. (A) En réponse à des signaux extracellulaires tels que des facteurs de croissance, les récepteurs tyrosine kinase (RTK) entraînent une cascade de phosphorylation intracellulaire mettant en jeu la PI3 Kinase (PI3K) qui phosphoryle l'inositol diphosphate en inositol triphosphate. La phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) se charge de la réaction inverse. Ensuite, la kinase PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) active AKT par phosphorylation conduisant à la stimulation de la survie et de la prolifération cellulaire en modulant par phosphorylation l'action de facteurs clés dans ces mécanismes. Les points rouges représentent des groupements phosphates. (B) Conséquence de l'inactivation de PTEN sur l'accumulation protéique de CDKN1B ($p27^{kip1}$) et sur la prolifération dans une cellule tumorale. Le taille de la police matérialise la « quantité relative » de protéine entre une cellule saine et tumorale. Les pointes de flèches symbolisent une activation et les « T », une inhibition. L'épaisseur des lignes représente le degré de contrôle. D'après les données de Downward, 2004 (143).

inactivé dans 30 à 60 % des cancers de prostate (141, 142) par différents mécanismes incluant des délétions hétéro ou homozygotes, des mutations ponctuelles ou encore la méthylation du promoteur. Cette activation constitutive de la voie PI3K-Akt participe donc à l'extinction de CDKN1B ($p27^{kip1}$) qui est dégradé par le protéasome suite à sa phosphorylation par la kinase AKT (Figure 12 B). Bien évidemment, l'impact de l'extinction de PTEN est beaucoup plus large puisque AKT est capable de moduler par phosphorylation l'activité d'un grand nombre d'acteurs protéiques (pour revue lire (143)) impliqué dans la survie et la prolifération cellulaire pour favoriser ainsi la progression tumorale (Figure 12 A). Les souris invalidées pour PTEN au niveau de la prostate constituent un très bon modèle d'étude du cancer puisqu'elles développent les différents stades de la carcinogenèse observés chez l'homme (Figure 13). Dès 4 semaines ces souris montrent des signes d'hyperplasie, à 6 semaines on peut noter l'apparition de néoplasies intra-épithéliales qui évoluent en adénocarcinomes. A 9 semaines, les adénocarcinomes deviennent invasifs entraînant la formation de métastases (145).

Dans ce modèle de souris *pten*-/-, une diminution précoce de l'expression du gène suppresseur de tumeur *nkx3.1* dès 4 semaines est observée avec la formation d'hyperplasie. Chez l'homme, la perte du locus 8p, dans lequel se trouve le gène codant NKX3.1, est un événement largement observé au cours des phases précoces du développement tumoral. Ce facteur de transcription est absent dans 20% des lésions de type néoplasie intraépithéliale, 6% des cancers de bas grade, 22% des cancers de haut grade, 34 % des cancers androgéno-indépendants et 78 % des cancers métastasiques (17). L'invalidation de *nkx3.1* chez la souris entraîne la formation de néoplasies intra-épithéliales au niveau de la prostate, ce qui démontre son rôle clé de suppresseur de tumeur (146).

La dérégulation du suppresseur de tumeur pRB (*retinoblastoma protein*) est un événement fréquent de la pathologie tumorale (147). La phosphorylation inactivatrice de pRB permet la prolifération cellulaire en libérant les protéines E2F, retenues par pRB à l'état non phosphorylé, qui stimulent la transcription de gènes responsables de la transition G1/S. Les mécanismes conduisant à l'inactivation de pRB dans les cancers incluent la perte allélique ou des mutations (148) mais également une diminution de l'accumulation protéique observée par marquages immuno-histochimiques (149, 150). La ré-expression d'une forme sauvage du gène codant pRB en lignée de cellules de prostate diminue la tumorigenécité cellulaire (151), ce qui démontre le rôle clé de l'inactivation de pRB dans la carcinogenèse.

Enfin des mutations de p53 sont retrouvées dans 26 % des cancers de la prostate (152). P53 restreint l'entrée en phase S du cycle cellulaire et permet l'apoptose des cellules ayant subi des dommages de l'ADN. La perte de sa fonction est responsable d'une croissance cellulaire incontrôlée (148). L'invalidation de *p53* n'induit pas de cancer de la prostate chez la souris. En revanche, des souris *pten/p53* +/- développent des néoplasies avancées plus rapidement que des souris *pten* (144) (Figure 13).

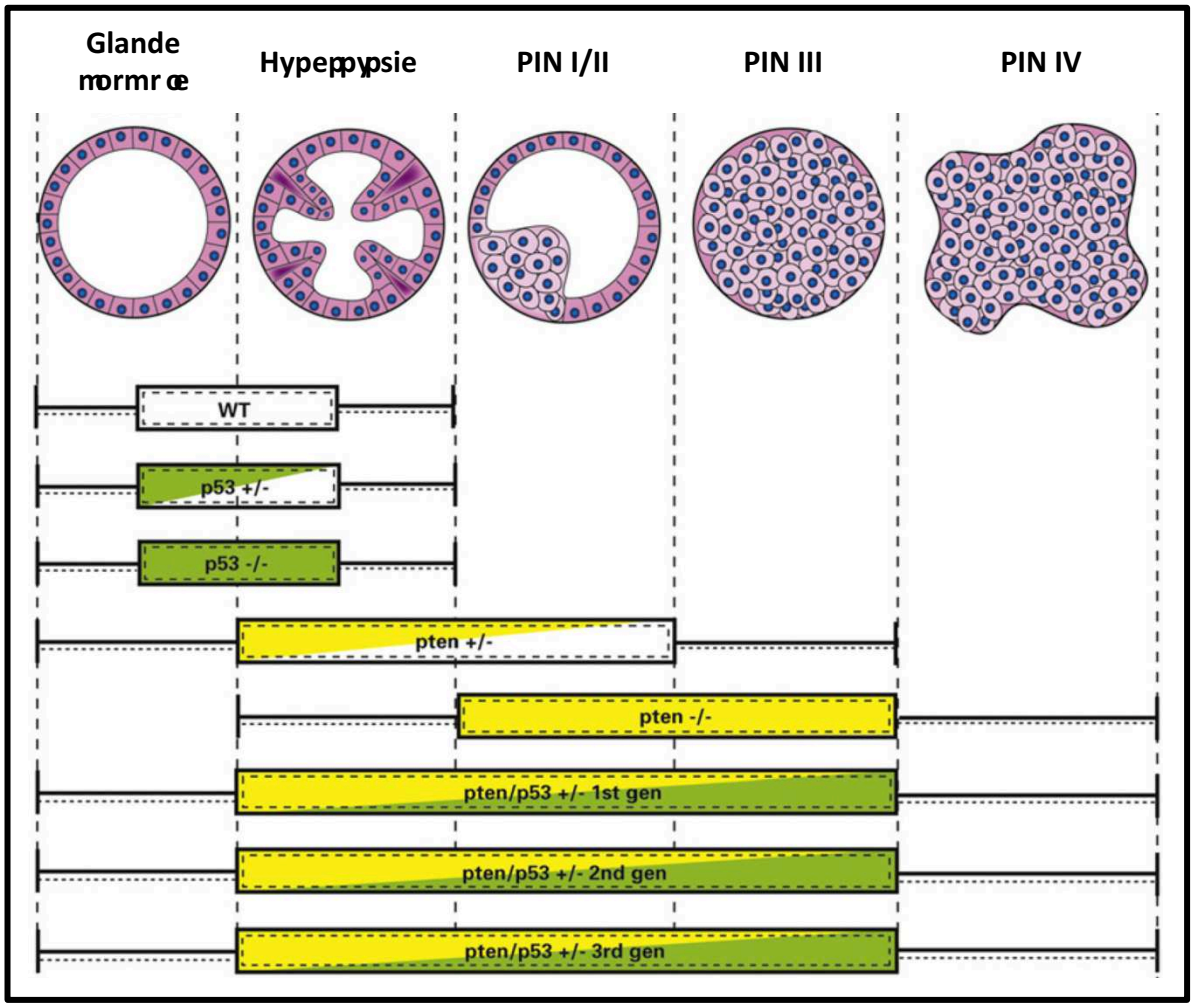


Figure 13 : Stade d'avancement tumoral au niveau de la prostate de différents modèles génétiques de souris. Se référer au texte pour les explication. WT (*wild type*), PIN (*prostatic intra-neoplasia*). D'après Suzana S. Coutoa *et al.*, 2009 (144).

4. Les oncogènes

Les cellules tumorales présentent des taux d'expression élevés de certains oncogènes parfois totalement absents des cellules prostatiques normales. C'est le cas de *bcl-2***,** dont la surexpression est due à une amplification du gène (153) et qui présente un profil d'expression en corrélation avec l'avancement tumoral (154). BCL-2 intervient dans la régulation des mécanismes apoptotiques. Localisé dans la membrane mitochondriale, il bloque l'homodimérisation de BAX responsable de l'initiation de la cascade apototique ce qui confère une action anti-apoptotique à BCL-2.

Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression de l'oncogène *c-myc* en corrélation avec le score de Gleason. C'est un facteur de transcription membre de la famille des bHLHZ (*basic helix-loop-helix-leucine zipper*), capable de contrôler la transcription notamment en se dimérisant avec d'autres membres de cette famille. C-MYC joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des cellules prostatiques (pour revue lire (155)). Il faut noter que *c-myc* peut être activé par des facteurs tels que SHH qui, pour rappel, est également surexprimé dans les cancers. Chez la souris, la surexpression de *c-myc* au niveau de la prostate est responsable de la formation d'adénocarcinomes invasifs associés à un profil d'expression génique semblable à celui retrouvé dans les tumeurs humaines, ce qui démontre son rôle oncogénique (156).

Une forte activation des tyrosine-kinases de la famille Src connues pour être activées par l'oncogène *c-kit* peut être observée. Une étude décrit une forme tronquée de *c-kit* dans les cancers et montre une corrélation entre la surexpression de *c-kit* et celle des protéines de la famille Src dans les stades avancés de la pathologie (157).

Enfin, il faut citer l'implication de STAT5 (*signal transductor activator of transcription 5*) identifié comme un facteur de survie crucial dans les cellules tumorales et dont l'activation est associée au grade (158).

Au vu des informations accumulées jusqu'ici, il est clair que le cancer de la prostate est la résultante de plusieurs dérèglements, concomitants ou successifs, d'expression génique qui conduisent à l'apparition et l'évolution de la pathologie. Les mutations et les variants de polymorphismes ne permettent pas d'expliquer l'intégralité de ces nombreux dérèglements associés au cancer de la prostate. Les causes des multiples dérégulations d'expression génique étant fondamentales dans la promotion et la progression du cancer, il est alors nécessaire de trouver leurs origines plus en amont. Parmi les mécanismes impliqués dans la régulation génique, l'épigénétique occupe une place croissante dans l'étiologie du cancer de la prostate.

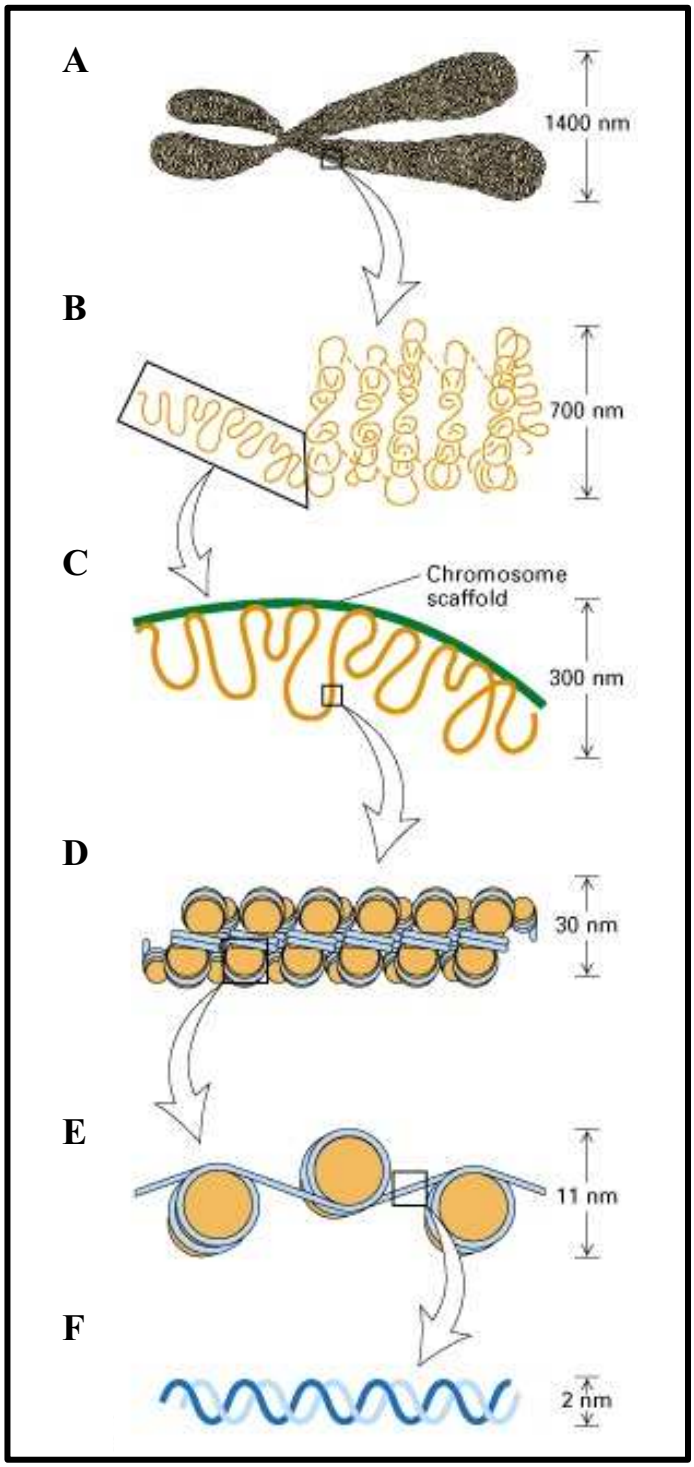


Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation structurale de l'ADN au sein des chromosomes. (A, B et C) Vue d'un chromosome à différentes échelles mettant en évidence la repliement de la chromatine. (D) Schéma de la chromatine condensée. (E) « le collier de perle » : l'ADN est enroulé autour des histones. (F) Double hélice d'ADN.

D. Epigénétique du cancer de la prostate

Le terme « épigénétique » réfère aux mécanismes responsables des changements héritables d'expression d'un gène mais qui n'impliquent pas de changement de la séquence d'ADN ni de modification du nombre de copies du gène. A noter qu'ici, le terme « héritable » inclut la transmission mitotique en plus de la transmission méiotique « classique ».

La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau. Elle correspond à l'association de l'ADN et de protéines structurales appelées histones. Les nucléosomes correspondent à l'enroulement de l'ADN autour de disques protéiques composés de 8 molécules d'histones H2A, H2B, H3, H4. Ils constituent une structure en collier de perles (Figure 12). L'histone H1 permet un niveau de compaction supplémentaire sous forme de fibres de 30 nm de diamètre, constituant l'unité de base de la chromatine. Cette fibre elle-même peut être plus ou moins condensée (surenroulée). Ainsi pour schématiser, on distingue l'euchromatine, peu dense, qui contient les gènes actifs et l'hétérochromatine, dense qui contient des gènes réprimés.

On peut observer deux grands types de modifications épigénétiques : 1) la méthylation de l'ADN associée à la répression génique, et 2) les marques d'histones dont le code semble plus complexe avec des marques dites permissives et d'autres répressives sur la transcription. L'expression des gènes est la résultante de combinaisons complexes entre ces différentes modifications auxquelles se rajoute l'intervention de divers facteurs en *trans*.

1. La méthylation de l'ADN

La méthylation en position N^5 de la cytosine dans les séquences CpG augmente le niveau de compaction de l'ADN conduisant à une moins bonne accessibilité des facteurs de transcription sur les promoteurs et donc à une inactivation de l'expression des gènes (Figure 15). Le lien entre la méthylation de l'ADN et le développement du cancer est bien établi (159). En effet, le processus tumoral s'accompagne d'un profil de méthylation du génome particulier avec une déméthylation globale du génome (160) et, en parallèle, une hyperméthylation très forte au niveau de certains promoteurs de gènes, associée à une puissante inactivation transcriptionnelle.

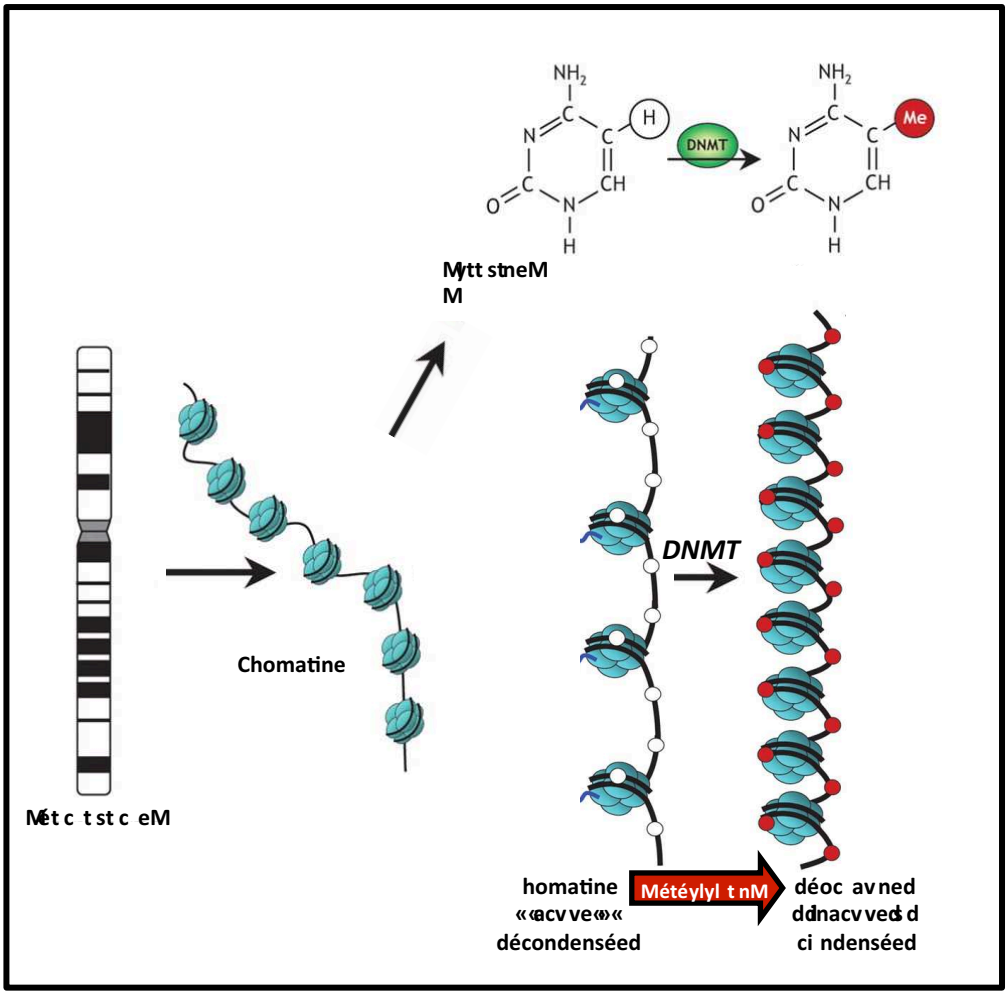


Figure 15 : Schéma de la condensation de la chromatine suite à la méthylation de l'ADN. Les DNMT1, 3a et 3b méthylent l'ADN entrainant sa compaction. Les cytosines sont représentées en blanc lorsqu'elles ne sont pas méthylées et en rouge lorsqu'elles le sont. DNMT (*DNA methyltransferase*).

a) Hyperméthylation

Les gènes suppresseurs de tumeur sont retrouvés particulièrement hyperméthylés. C'est le cas de GSTP1, déjà mentionné plus haut, qui représente le gène le plus fréquemment (> 90%) réprimé par hyperméthylation très tôt dans le cancer de la prostate (161, 162) ce qui fait de lui un excellent marqueur diagnostic. Combiné à l'analyse du profil de méthylation de *apc* (*Adenomatous polyposis coli*), lui aussi hyperméthylé, la sensibilité de détection du cancer approche les 100 % (163). Parmi les autres suppresseurs de tumeurs confirmés ou candidats, touchés par ce mécanisme, il faut également retenir les gènes codant PTEN, déjà mentionné plus haut, CDKN2A ($p16^{ink4a}$), qui inhibe le cycle cellulaire *via* les CDK (*cyclin dependent kinase*), RASSF1A connu comme suppresseur de tumeur qui interagit avec la kinase AURORA, E-CADHERIN intervenant dans l'EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) , ESR1 (*oestrogen receptor alpha*) décrit comme étant associé au statut métastatique du cancer et DAB2IP qui code une protéine de la famille des *RasGTPase activating protein*. A la vue de ces données, se pose alors la question du niveau d'expression et d'activité des protéines qui régulent la méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est contrôlée par les DNMT (*DNA methyltransferase*) 1, 3a et 3b qui méthylent (Figure 15). Une étude (164) montre que DNMT1 est surexprimé dans les cancers conduisant à une activité DNMT 2 à 3 fois supérieure dans les cellules et les tissus cancéreux par rapport aux tissus atteints de BPH et aux cellules qui en dérivent.

b) Hypométhylation

Il y a un consensus selon lequel l'hyperméthylation observée au niveau de certains *loci* spécifiques n'est pas directement liée à l'hypométhylation globale. D'ailleurs, dans le cancer de la prostate, l'hypométhylation a lieu de manière tardive, après l'hyperméthylation des îlots CpG (165). Cependant, malgré les changements de profil d'expression des *dnmt*, l'hypométhylation est un processus hautement associé à la progression tumorale (160). Par exemple, l'hypométhylation de *wnt5a* (*wingless-related MMTV integration site 5A*), *crip1* (*cysteine-rich protein1*) et *s100p* (*s100 calcium-binding protein p*), dont la surexpression est associée à la progression tumorale, est fréquemment observée dans les cancers de la prostate (166). L'origine de l'hypométhylation n'est pas déterminée mais trois hypothèses sont actuellement évoquées : la perte d'un régulateur majeur de la méthylation de l'ADN, le découplage de l'activité ADN méthyltransférase et de la réplication de l'ADN et la « carence » en S-adénosylméthionine (SAM), le groupement donneur pour la méthylation.

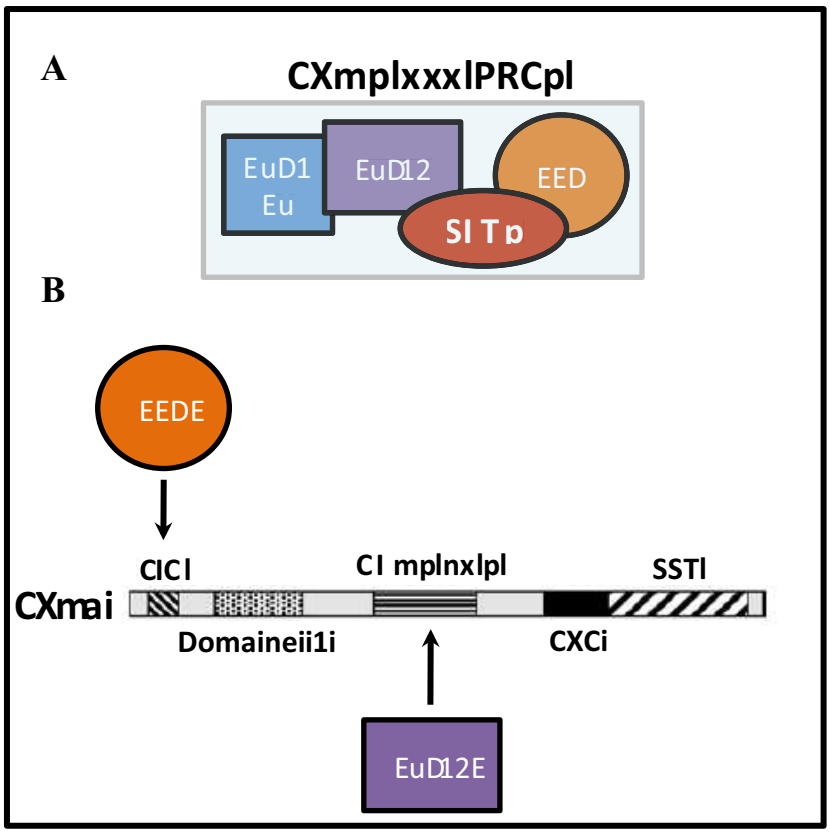


Figure 16 : Schéma représentant le complexe PRC2 humain (A) et des différents domaines qui composent la protéine EZH2 (B). Adapté d'après Simon et Lange, 2008 (169).

2. Les marques « histone »

Malgré le rôle majeur de la méthylation CpG dans la répression génique au cours du processus tumoral, 40% des promoteurs de gènes humains ne contiennent pas d'ilôts CpG (167) suggérant que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la répression génique. Les modifications post-traductionnelles des histones, bien décrites sur les histones 3 et 4, par méthylation, acétylation et ubiquitinylation, appelées « marques », sont associées à une activation ou une répression génique en fonction de la nature de ces modifications, de leur combinaison et de leur position. Comme pour la méthylation CpG, ces modifications changent le niveau de compaction de l'ADN et ainsi l'accessibilité des facteurs de transcription aux promoteurs. De manière générale, des marques comme H3K4me2 et H3K4me3 (*H3 lysine 4 dimethylation* et *trimethylation*) et H3K9ac (*H3 lysine 9 acetylation*) sont associées à une transcription active et donc dites « permissives ». A l'inverse, H3K27me3, H3K9me2 et H3K9me3 sont dites « répressives ». Pour illustrer l'importance des différentes combinaisons de marques, on peut citer l'existence des domaines bivalents. Ces domaines sont caractérisés par la présence des marques H3K4me3 et H3K27me3 et c'est une régulation bien précise de la balance entre ces deux modifications qui permet, ou non, la transcription (168).

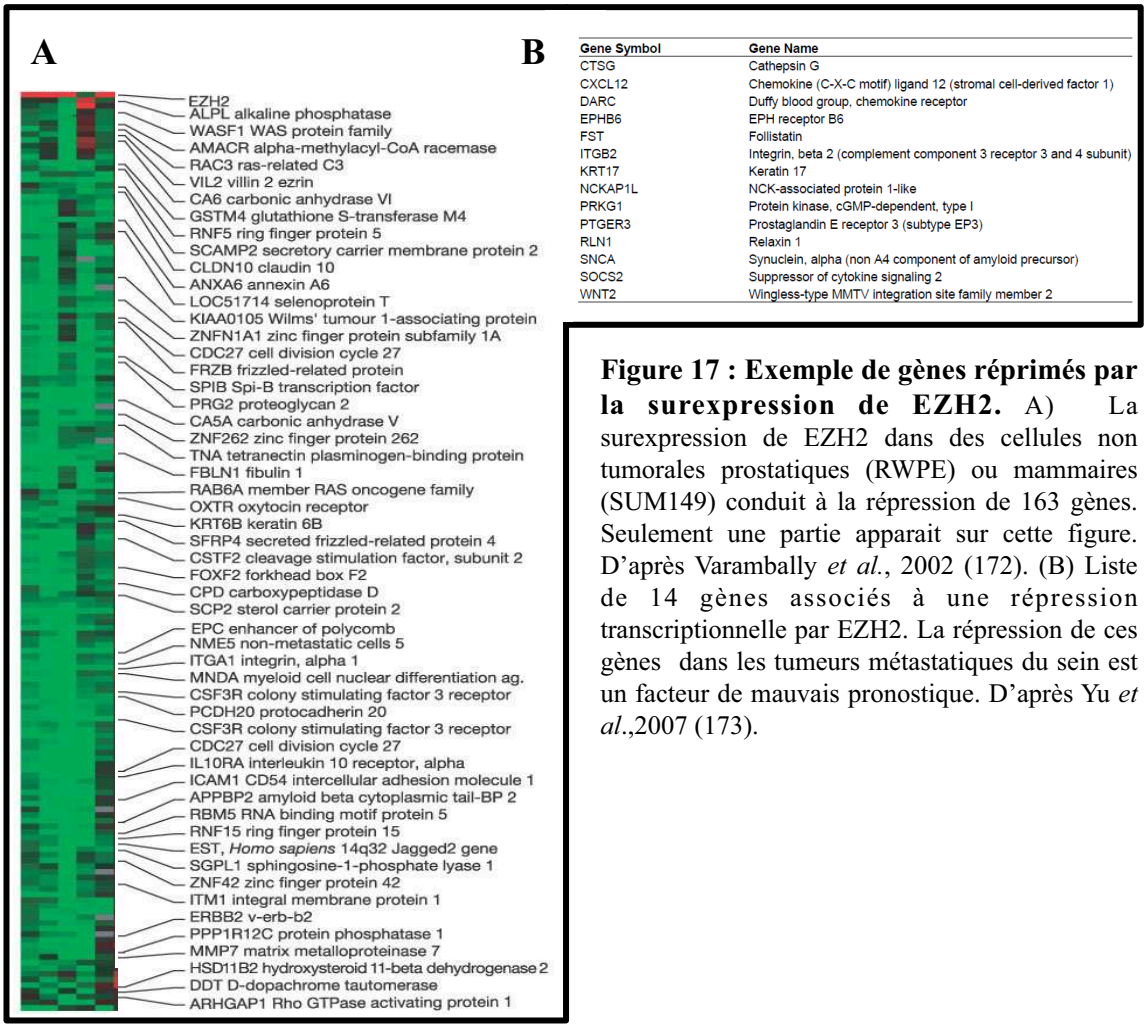
a) Méthylation

Les complexes protéiques du groupe des Polycombs (PRC1-PRC4) jouent un rôle important dans le contrôle de la répression transcriptionnelle. Dans cette partie, de par son rôle majeur dans le développement du cancer de la prostate, l'attention sera portée sur la protéine EZH2 (*Enhancer of zest 2*), qui est la sous-unité catalytique possédant l'activité *histone methyltransferase* au sein du complexe PRC2, et sur son produit, la marque H3K27me3.

(1) EZH2

(a) Structure/fonction

EZH2 est la principale enzyme responsable de la tri-méthylation de la lysine-27 sur l'histone H3, c'est la marque répressive H3K27me3. L'activité méthyltransférase est portée par son domaine SET. Néanmoins, la présence des autres membres du complexe, SUZ12 et EED qui interagissent directement avec EZH2 *via* les domaines II et EID respectivement et dans une moindre mesure de RbAp48, est nécessaire pour une activité méthyltransférase optimale (Figure 16) (170). Une fois triméthylée, la marque H3K27me3 est reconnue par le complexe PRC1 qui est impliqué dans le maintien stable de la répression génique. PRC1 est composé des protéines des familles Polycomb et polyhoméotiques (CBX/HPC et EDR/HPH), RING1A, RING1B, YY1 et BMI-1 (pour revue lire (171)).



Gene Symbol	Gene Name
CTSG	Cathepsin G
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
DARC	Duffy blood group, chemokine receptor
EPHB6	EPH receptor B6
FST	Follistatin
ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
KRT17	Keratin 17
NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
PRKG1	Protein kinase, cGMP-dependent, type I
PTGER3	Prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
RLN1	Relaxin 1
SNCA	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
SOCS2	Suppressor of cytokine signaling 2
WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2

Figure 17 : Exemple de gènes réprimés par la surexpression de EZH2. A) La surexpression de EZH2 dans des cellules non tumorales prostatiques (RWPE) ou mammaires (SUM149) conduit à la répression de 163 gènes. Seulement une partie apparait sur cette figure. D'après Varambally *et al.*, 2002 (172). (B) Liste de 14 gènes associés à une répression transcriptionnelle par EZH2. La répression de ces gènes dans les tumeurs métastatiques du sein est un facteur de mauvais pronostique. D'après Yu *et al.*,2007 (173).

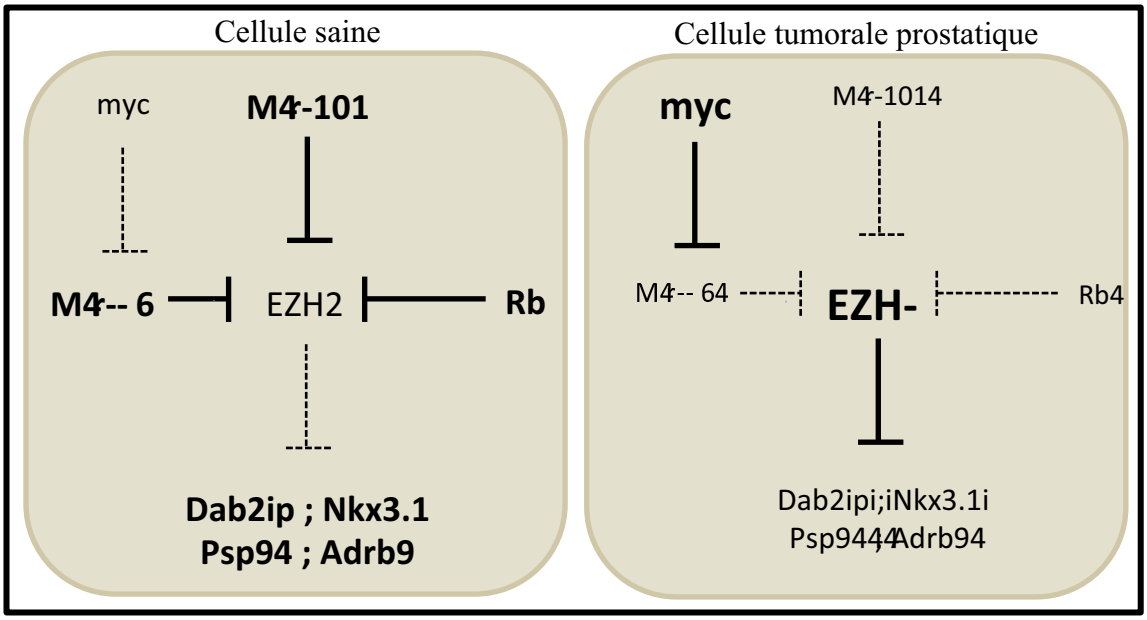


Figure 18 : Voies impliquées dans la perte de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression de *ezh2* dans une cellules tumorale prostatique. Le taille de la police matérialise la « quantité relative » de protéine entre les deux cellules. Les pointes de flèches symbolisent une activation et les « T », une inhibition. L'épaisseur des lignes représente le degré de contrôle.

Au final, la répression transcriptionnelle par PRC2 est un mécanisme extrêmement bien conservé. Par exemple PRC2 est retrouvé aussi bien chez les mammifères pour l'inactivation du chromosome X que chez *C. elegans* où il intervient dans la répression génique au niveau de la lignée germinale, en encore chez *D. melanogaster* où PRC2 réprime certains gènes de différenciation tels que les gènes homéotiques (*hox*). Plus récemment, l'activité de ce complexe a été associée au cycle cellulaire et au cancer de la prostate.

(b) Implication dans le cancer

Le rôle de EZH2 dans la promotion et la progression tumorale est très étudié, en particulier dans le cancer de la prostate. L'analyse par puce ADN d'échantillons prostatiques de patients révèle que *ezh2* est le gène le plus significativement surexprimé dans les métastases par rapport aux cancers localisés, ce qui fait de lui un bon marqueur pronostic (172). Cette étude montre également 1) que la perte de EZH2 inhibe la croissance des cellules de cancer de prostate et 2) que la surexpression de *ezh2* dans ces cellules entraîne la répression de 163 gènes. Plus récemment, 14 gènes cibles de EZH2 réprimés dans le cancer ont été décrits comme outils de prédiction pour l'évolution du cancer du sein et de la prostate (173). (Figure 17).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'augmentation d'expression de *ezh2* dans les cellules tumorales (Figure 18). Il peut s'agir d'une perte de certains régulateurs négatifs de EZH2 comme Rb (cf suppresseur de tumeur, page 29) (174), ou de miR-26 (microRNA-26) réprimé par C-MYC retrouvé de manière abondante dans les cellules cancéreuses (cf oncogène, page 31) (175). Enfin, des travaux récents montrent que la perte génomique mono ou bi allélique du gène codant miR-101 est corrélée à l'augmentation de l'expression de *ezh2*, dans 37,5% des cancers localisés et 66,7% des cancers métastasiques (176). Ainsi, la perte génomique de *mir-101* et de manière consécutive la dérégulation d'expression de *ezh2* pourraient participer à la progression tumorale.

Parmi les gènes cibles de EZH2, certains sont particulièrement intéressants (Figure 18) au vu de leur profil d'expression au cours de la carcinogenèse prostatique. C'est le cas de *dab2ip* dont l'expression est diminuée *via* EZH2 et par méthylation CpG dans les cellules cancéreuses. Les promoteurs de *nkx3.1* et *msmb* sont également directement verrouillés par EZH2 (177, 178). *Msmb* (*microseminoprotein-beta*) code la protéine PSP94 (*prostatic secretory protein of 94 amino acid*) qui est sécrétée par la glande prostatique et qui fonctionne comme un suppresseur de tumeur (179). Son expression, comme celle du suppresseur de tumeur *nkx3.1*, est perdue au cours de la progression tumorale (17, 180).

(2) Les déméthylases de H3K27 : JMJD3 et UTX

JMJD3 (*Jumanji D3*) et UTX sont les deux déméthylases des motifs H3K27me3 et H3K27me2 (Figure 19). Les études montrent qu'elles sont impliquées dans les processus développementaux notamment *via* le contrôle des gènes *hox* (181, 182). De manière intéressante, UTX

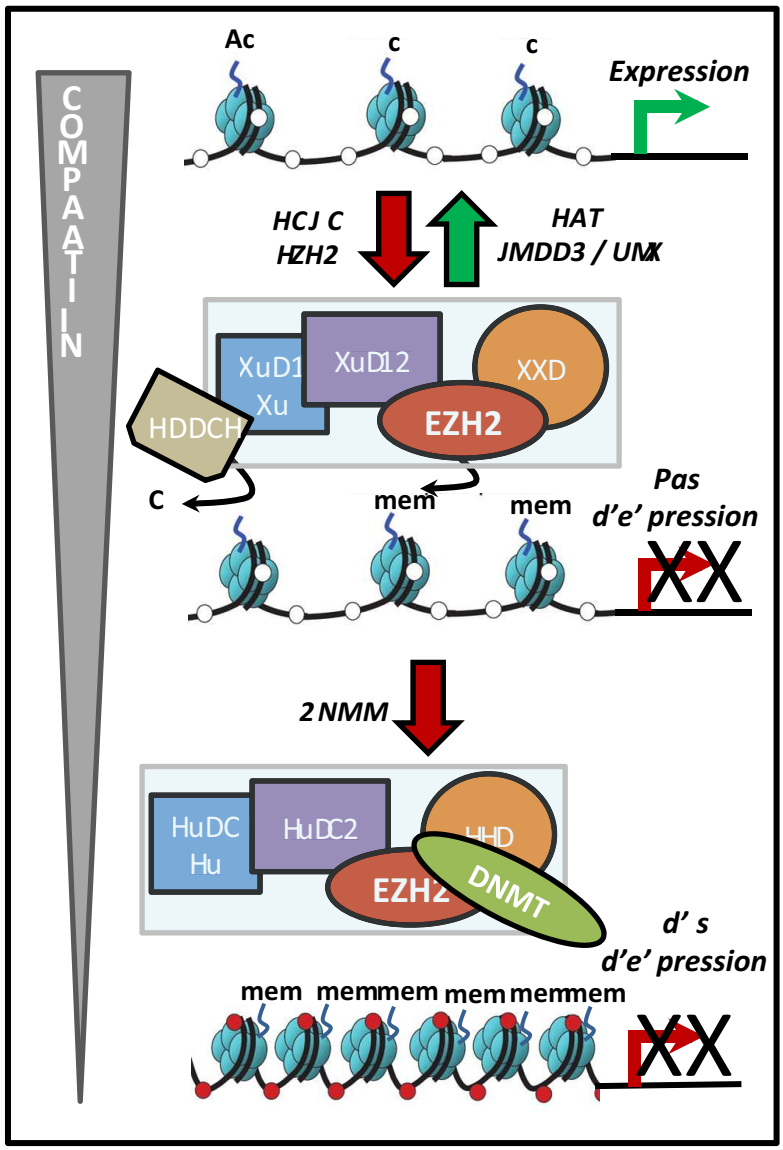


Figure 19 : Schéma représentant l'action répressive du complexe PRC2 en synergie avec les HDAC et les DNMT. Voir le texte pour les explications. Les cytosines sont représentées en blanc lorsqu'elles ne sont pas méthylées et en rouge lorsqu'elles le sont. Me (méthylation) , Ac (acétylation). Adapté d'après Simon *et al.*, 2008 (169).

et JMJD3 co-immunoprécipitent avec des membres du complexe de méthylation H3K4 de type MLL et RbBP5 (183, 184) ce qui suggère une coopération entre les différents acteurs de la méthylation pour définir une chromatine active ou inactive au niveau de ces domaines. Pour l'instant, mis à part une étude difficile à interpréter qui montre JMD3 surexprimé dans les cancers métastatiques de la prostate (185), aucune donnée ne relie ces déméthylases au développement ou à la progression du cancer.

(3) Connexion entre la méthylation des histones et de l'ADN

La méthylation de l'ADN et la répression de celle des histones par les Polycombs sont restées longtemps considérées comme deux processus biochimiquement indépendants. Cependant, chez l'Homme, ce dogme semble remis en question. Des expériences de co-immunoprécipitation démontrent que les 3 types de DNMT interagissent avec les sous unités de PRC2 (EZH2 et EED) (186). Une inhibition par RNAi de EZH2 diminue la méthylation CpG, ce qui démontre que EZH2 est requise pour ce mécanisme. En revanche, l'inverse n'est pas vrai, les DNMTs ne sont pas nécessaires pour la méthylation par EZH2 (186) (Figure 19). Ces données suggèrent que EZH2 agit en amont des DNMTs comme pour « pré-marquer » certains gènes qui seront ensuite hyperméthylés et réprimés au cours de la transformation cellulaire normale ou tumorale. Il faut noter qu'une fois les gènes hautement hyperméthylés, le maintien de la répression ne requiert pas EZH2 (187). Ce mécanisme qui ressemble au déterminisme cellulaire au cours du développement embryonnaire peut engendrer la formation de cellules « initiatrices de tumeurs » en accord avec le courant de pensée actuel selon lequel des perturbations épigénétiques seraient responsables de la formation de cellules précurseurs à l'origine du développement tumoral.

(4) Connexion entre la méthylation et l'acétylation des histones

Il existe un lien physique et fonctionnel entre EZH2 et acétylation. Ce lien passe par une interaction entre PRC2 et les HDAC (*histone deacetylase*) 1 et 2 (188) (Figure 19). Ce recrutement contribue de manière synergique à l'action répressive de PRC2. Les HDAC peuvent retirer les groupements acétyles de H3K27 et favorise ainsi la triméthylation par EZH2 (169).

b) L'acétylation

L'acétylation des histones est régulée par deux types d'enzymes : les histones HAT (*acetyltransferases*) et les HDAC).

(1) Les histones acétyltransférases (HAT)

Bien que les HAT soient par définition les enzymes chargées de catalyser le transfert du groupement acétyle depuis l'acétyl-CoA sur les histones, il faut noter qu'elles sont également capables de réagir avec d'autres protéines, ce qui ne facilite pas leur étude. Pour illustrer ce propos, on peut citer l'exemple de AR qui est acétylé dans sa région charnière par p300, P/CAF (*P300/CBP associated factor*) et TIP60 (*tat-interactive protein 60 kDa*) lors d'une activation par la DHT. Cette acétylation

augmente la capacité transactivatrice de AR. En revanche aucune donnée pertinente n'est disponible à ce jour quant à leur rôle sur la chromatine dans le cancer de la prostate.

(2) Les histones déacétylases (HDAC)

(a) Structure / fonction

Il existe 18 HDAC séparées en 4 classes en fonction des identités de séquences et de l'organisation des domaines (pour revue lire (189). Les HDAC sont des enzymes chargées de retirer le groupement acétyle des lysines sur les histones de l'ADN. Le niveau d'acétylation influence l'activité de transcription : l'acétylation décondense la chromatine et favorise l'accessibilité à la machinerie de transcription et à l'inverse, la déacétylation est associée à une répression génique. Le rôle principal des HDAC est donc de verrouiller l'expression génique.

(b) Implication dans le cancer de la prostate

Parmi toutes les HDAC étudiées, on retrouve une forte expression de HDAC1, HDAC2 et HDAC3 dans les cas de cancer de la prostate (190). Par ailleurs, HDAC8 est sous-exprimée au niveau des cellules cancéreuses (191). Une localisation nucléaire de HDAC4, normalement cytoplasmique dans des cellules saines ou de cancers localisés, est observée dans des cellules de cancers androgéno-indépendants (192).

De manière intéressante, les cancers de la prostate qui présentent une translocation TMPRSS2-ERG surexpriment très souvent HDAC1 (193). A ce jour, la relation entre ces deux événements n'est pas connue. De plus, le gène *dab2IP* déjà décrit comme étant « doublement » réprimé par EZH2 et méthylation CpG, est également ciblé par HDAC1 dans les cellules cancéreuses (194). Une autre HDAC, SIRT1, joue un rôle important dans la déacétylation de H4K16 et H3K9. Une diminution de l'activité des SIRT1 entraîne une réactivation des gènes codant les agonistes de type WNT dans le cancer du côlon et du sein (195). Ces résultats laissent penser qu'un mécanisme identique peut exister dans les cellules tumorales prostatiques dans lesquelles les voies de signalisation WNT sont également retrouvées suractivées (196).

Le code histone met donc en jeu plusieurs mécanismes qui sont visiblement tous interconnectés (Figure 19). Il y a maintenant un certain nombre d'études qui montrent que la dérégulation de ces mécanismes est associée au cancer de la prostate. Par exemple, la méthylation aberrante des histones par EZH2, pouvant être associée à l'acétylation des histones et à la méthylation de l'ADN sur des promoteurs de gènes clés, est un mécanisme qui semble participe à la carcinogenèse en permettant la répression génique. Aujourd'hui de nombreuses hypothèses postulent l'existence des perturbations épigénétiques comme événement précoce ayant lieu dans les cellules progénitrices ce qui formerait ainsi une population polyclonale de précurseurs à l'origine du développement tumoral. Cependant ceci n'est pas démontré pour le moment.

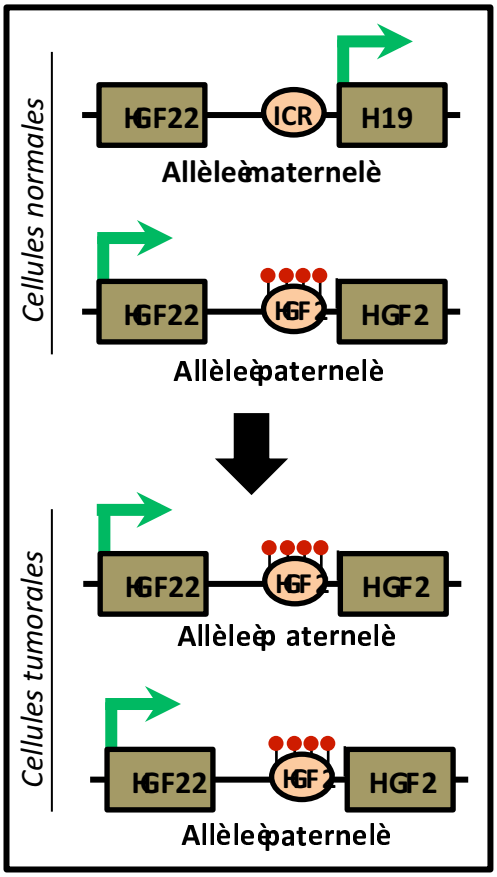


Figure 20 : Méthylation *de novo* au niveau de l'ICR du locus IGF2-H19 au cours de la carcinogenèse. ICR (*imprinting control region)*. Les points rouges symbolisent la méthylation de l'ADN. Adapté d'après Henckel *et al.* 2008 (199).

3. La perte des empreintes parentales

Outre le rôle des marques décrites précédemment, la pose d'empreintes épigénétiques (*imprinting*) est également un mécanisme qui permet l'expression spécifique des allèles paternels ou maternels. Il faut rappeler qu'au moment de la fécondation, les génomes maternel et paternel sont globalement configurés de manière différente : le génome de l'ovocyte est empaqueté avec des histones, celui du spermatozoïde est empaqueté avec des protamines. Les deux génomes sont également très différents sur le plan fonctionnel : dans les cellules germinales mâles et femelles, des marques épigénétiques distinctes sont acquises au niveau des gènes soumis à l'empreinte qui sont pour la plupart organisés en domaines chromosomiques, ce qui permet une régulation par des régions de contrôle de l'empreinte (ICR : *imprinting control region*) souvent riches en CpG (197). Ce sont ces régions qui présentent la particularité d'être méthylées de manière différentielle selon l'origine parentale des allèles. Il faut noter que la méthylation CpG n'est pas la seule marque retrouvée au niveau de ces régions puisque des modifications d'histones répressives telles que H4K20me3 ou H3K9me3 sont également associées aux ICR (198). Dans tous les cas, une mise en place ou un maintien inadéquat de cette asymétrie épigénétique entre les deux génomes parentaux qui se manifeste par une expression, ou une répression, biallélique d'un gène normalement soumis à l'empreinte et qui s'exprime habituellement à partir d'un seul allèle, peut se traduire par différentes pathologies telles que le cancer.

Dans le cadre du cancer de la prostate, la région chromosomique 11p15 qui contient les allèles IGF-II et H19 semble particulièrement intéressante à ce sujet. Dans des conditions normales, l'ICR de ce locus est méthylée uniquement sur l'allèle paternel ce qui entraîne une expression paternelle du gène IGFII et une expression maternelle du gène voisin H19 (Figure 20). Dans les cancers, un gain important de méthylation est retrouvé au niveau de cette ICR ce qui est associé à une surexpression de IGF-II (200).

4. Les acteurs épigénétiques comme cibles thérapeutiques

L'ensemble de ces informations indique que des dérégulations épigénétiques peuvent être à l'origine des processus tumoraux. Certains acteurs impliqués dans ces dérèglements peuvent ainsi constituer des cibles thérapeutiques pertinentes dans le cadre du traitement du cancer de la prostate. La stratégie consiste à limiter l'activité de ces enzymes par des molécules telles que le DZNep®, (inhibiteur de EZH2), la trichostatine A ou la romidepsin (inhibiteurs d'HDAC ; pour revue, lire

(189)) et la 5-azacytidine (inhibiteur de DNMT) afin de « reprogrammer » le statut épigénétique des cellules tumorales et de retrouver des empreintes dites normales.

5. L'influence des facteurs environnementaux sur les marques épigénétiques

Si le dérèglement des systèmes responsables du maintien correct des marques épigénétiques est un mécanisme clé impliqué dans le développement tumoral, il faut alors comprendre quelles peuvent être les causes de ces perturbations. Un grand nombre d'études (201) montrent que de plus en plus de facteurs environnementaux et nutritionnels sont reliés à ces changements épigénétiques.

a) Les facteurs environnementaux

Parmi les facteurs environnementaux, on retrouve l'exposition aux carcinogènes physiques, chimiques et les agents infectieux (202-204). Par exemple, les radiations ionisantes (205), les UV (206), la fumée de tabac (207), l'arsenic (204), le cadmium (208), le nickel (204) sont considérés comme des « épimutagènes » c'est-à-dire pouvant modifier les marques épigénétiques. Certains virus comme l'Epstein-Barr virus (209), le papillomavirus humain (209) et le virus de l'hépatite (210) sont capables d'altérer l'expression des gènes de l'hôte par des modifications épigénétiques. A titre d'exemple, *cdkn2a* ($p16^{Ink4A}$) et *cdkn2b* ($p15^{Ink4B}$) sont des gènes connus pour être « épigénétiquement » dérégulés par la présence de nikel. (pour revue lire (201)).

b) Les facteurs nutritionnels

Parmi les facteurs nutritionnels, l'alcool (211), les folates (212), les vitamines A, B6, B9, B12 (213, 214), le zinc (215), la méthionine (216), la choline (217), les phytoestrogènes tels que l'équol (métabolite de la daidzeïne) (218) et certains polyphénols du thé (219), la génistéïne (220), le coumestrol (218) retrouvé dans les graines de soja, le resvératrol (221, 222) (polyphénol retrouvé entre autre dans le raisin) sont capables de modifier les marques épigénétiques et de modifier la susceptibilité à développer un cancer.

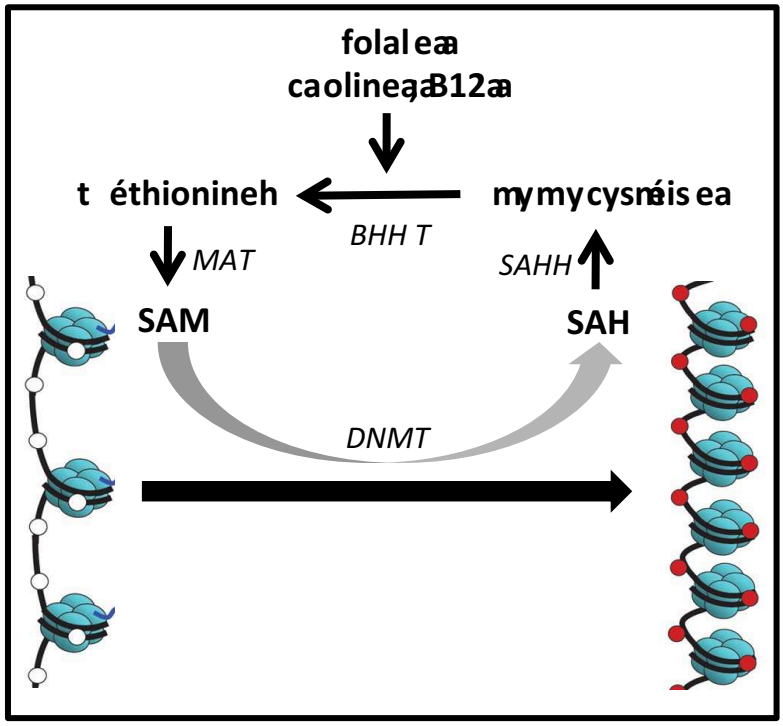


Figure 21 : Facteurs nutritionnels pouvant influencer la méthylation de l'ADN par modification de la biodisponibilité du groupement méthyle donneur. Les enzymes sont en italique. MAT (*methionine adenosyltransferase*), DNMT (*DNA methyltransferase*), SAHH (*S-adenosyl-homocysteine hydrolase*), BHMT (*betaine-homocysteine S-methyltransferase*). D'après les données de Davis, 2004 (223).

c) Les mécanismes impliqués

(1) La méthylation de l'ADN

Tous les facteurs impliqués dans le métabolisme de la méthionine sont potentiellement capables d'interférer avec la méthylation de l'ADN puisqu'ils peuvent modifier l'apport en groupements méthyle et donc les voies de méthylation. La méthionine est l'acide aminé utilisé pour la formation du S-adénosylméthionine (SAM) qui est ensuite converti en S-adénosylhomocystéine (SAH) par les DNMT pour la méthylation de l'ADN. Le contrôle de l'apport en SAM est fondamental à l'établissement normal de la méthylation CpG du génome. Les folates, la choline, la vitamine B6 et B12 ainsi que la méthionine elle-même font partie des nutriments qui influencent la méthylation de l'ADN par modification de la disponibilité en groupements méthyle (pour revue lire (223) (Figure 21). Par exemple, une alimentation riche en méthionine pendant le développement embryonnaire chez la souris induit une augmentation du niveau de méthylation et des changements permanents d'expression génique (224). A l'inverse, l'exposition chronique à l'arsenic induirait une déplétion en SAM (225) et ainsi une hypométhylation globale de l'ADN, phénomène impliqué dans l'activation d'oncogènes comme C-MYC (226). Certains agents mutagènes tels que le benzo[a]pyrène retrouvé dans la fumée de tabac semblent se fixer et former des adduits à l'ADN préférentiellement au niveau des sites CpG méthylés favorisant ainsi les mutations G vers T (227).

(2) La modification des histones

Différentes classes d'HDAC peuvent être altérées par des facteurs nutritionnels. Par exemple le resvératrol est un inhibiteur potentiel de SIRT-1 (228, 229). Des données montrent en effet que l'inhibition de SIRT1 réactive l'expression de gènes réprimés dans les cellules cancéreuses (195), ce qui peut suggérer un effet du resvératrol sur les modifications épigénétiques.

L'exposition au nickel diminue le niveau d'acétylation sur les résidus lysine 12 et 16 de l'histone H4 (230) en bloquant l'accès des HAT à la chromatine (231). Le nickel induit également la perte de l'acétylation sur H2A, H2B, H3 et H4 ainsi qu'une augmentation de la diméthylation H3K9 et de l'ubiquitinylation de H2A et H2B (232) conduisant au final à une répression transcriptionnelle.

Au vu de ces informations et dans une optique de prévention contre les risques de cancer, il semble fondamental d'approfondir les études sur l'impact des facteurs environnementaux et nutritionnels capables de modifier les marques épigénétiques. En effet, les interrogations restent encore nombreuses quant aux mécanismes d'action de beaucoup de facteurs environnementaux, de plus en plus abondants, connus pour favoriser la survenue de cancer. C'est le cas par exemple de la consommation de lipides et du risque de cancer de prostate.

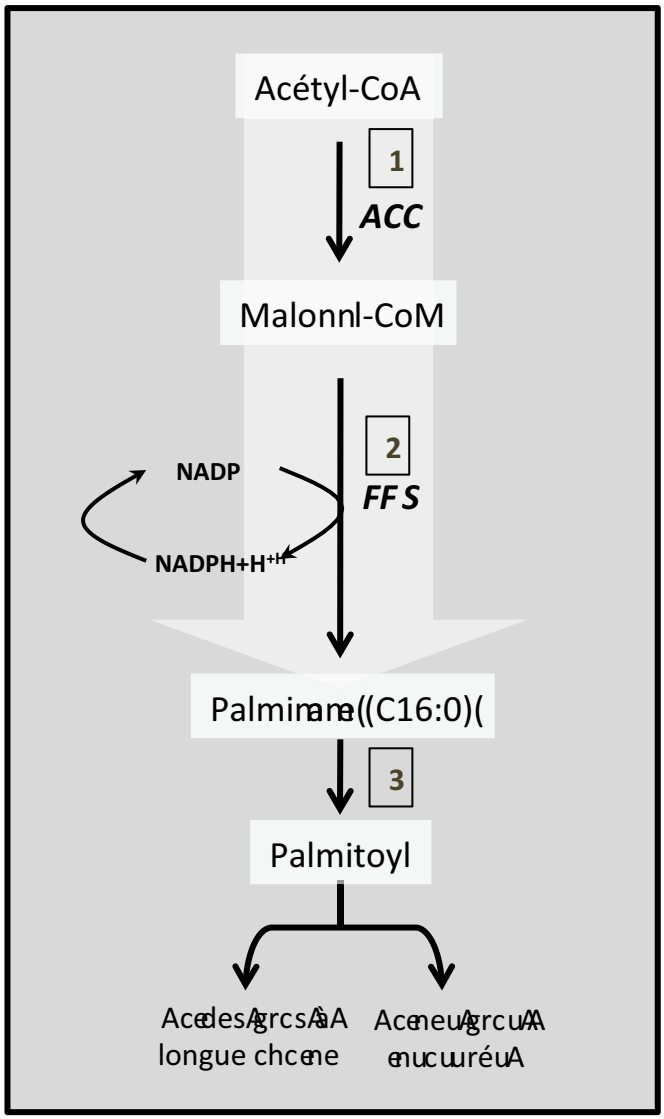


Figure 22 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des acides gras. 1) L'ACC (*acetyl CoA carboxylase*) catalyse la formation du molonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA. C'est l'étape limitante de la synthèse des acides gras. 2) La FAS (*fatty acid synthase*) permet, après 7 cycles d'élongation du malonyl-CoA, la formation de palmitate. Lors de ces réactions, l'agent réducteur est le $NADPH+H^+$. 3) Le palmitate doit être activé en palmitoyl-CoA en présence d'ATP avant d'être utilisé pour la synthèse de triglycérides, de phospholipides, d'acides gras à longue chaîne et d'acides gras désaturés.

E. Quel rôle pour les lipides dans le cancer de la prostate?

Des études épidémiologiques montrent que les pays d'Asie tels que la Chine, le Japon ou encore l'Inde présentent des taux d'incidence du cancer de la prostate nettement plus faibles que les pays occidentaux comme les Etats-Unis ou les pays scandinaves : l'incidence atteint 185,4 cas pour 100 000 afro-américains par an aux Etats-Unis contre 1,7 pour des Chinois vivant en Chine (56). Lorsque des Chinois de Qidong migrent à San Francisco, l'incidence de ce cancer passe de 0,5 à 26 cas pour 100 000 (233). Parmi les différents facteurs environnementaux pouvant expliquer ces variations d'incidence du cancer de la prostate, la nature des régimes alimentaires très différente entre les pays occidentaux et les pays asiatiques notamment en ce qui concerne leur composition en lipides, semble un facteur prépondérant.

Les régimes alimentaires de plus en plus riche en lipides dans les pays occidentaux ainsi que les données épidémiologiques qui attribuent des effets importants dans la survenue du cancer de la prostate (233) posent la question du rôle des lipides au cours de l'initiation, la la promotion et de la progression dans les processus de carcinogénèse.

Parmi les lipides, on peut distinguer les différents types d'acides gras et le cholestérol.

1. Les acides gras et le cancer de la prostate

a) Généralités

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique de 4 à 28 carbones. Ils sont retrouvés au niveau de l'alimentation dans les graisses animales et végétales, les huiles ou les cires sous forme de triglycérides, estérifiés avec le glycérol. Ils sont stockés majoritairement au niveau du tissu adipeux sous la forme de triglycérides dans les adipocytes. Les acides gras sont principalement apportés par l'alimentation, cependant les cellules humaines possèdent l'ensemble de l'équipement enzymatique nécessaire pour réaliser la synthèse de la quasi-totalité des acides gras (mis à part certains acides gras polyinsaturés, voir ci-dessous, page 43). La lipogenèse est réalisée à partir de l'acétyl-CoA et met en jeu des enzymes telles que l'ACC (*acetyl CoA carboxylase*) et la FAS (*fatty acid synthase*) (figure 22). L'ACC est une enzyme qui catalyse en présence d'ATP la synthèse du malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA, de CO_2 et de biotine. Le malonyl-CoA va ensuite servir de substrat pour la synthèse d'AG par la FAS. Par la suite, sept réactions apportant successivement les molécules de malonyl-CoA conduisent à la production de palmitate (AG en C16). Une étape importante dans la biochimie lipidique consiste en une désaturation de la chaîne aliphatique pour

former des acides gras mono ou polyinsaturés. Par exemple, les SCD 1 et 2 (*stearoyl-CoA desaturases*) sont des enzymes qui catalysent une désaturation en Δ9-*cis* des acides gras saturés.

Les AG remplissent différentes fonctions. Tout d'abord, ils ont un rôle majeur dans l'apport énergétique puisqu'ils sont métabolisés par la voie de la β-oxydation et du cycle de Krebs pour fournir de l'ATP. Ensuite, ils ont un rôle structural puisqu'utilisés pour la synthèse de phospholipides, constituants principaux des membranes cellulaires. Le degré d'insaturation des phospholipides présents dans les membranes modifie leurs propriétés physico-chimiques. Enfin, ils ont un rôle de messager intra et extracellulaire puisqu'ils sont précurseurs dans la synthèse de certaines hormones comme les eicosanoïdes (leucotriène et prostanoïde) intervenant dans l'inflammation.

La nature et la quantité des AG présents dans l'alimentation font parti des facteurs nutritionnels qui semblent influencer le développement tumoral. Dans l'alimentation, quatre grandes classes d'AG peuvent être distinguées en fonction du degré d'insaturation et de la conformation : les AG dit *trans*, les AG saturés et les AG polyinsaturés, soit de type ω3 soit ω6.

b) Données épidémiologiques et expérimentales

Peu de données sont actuellement disponibles concernant les effets des acides gras *trans* sur le cancer de la prostate. A ce jour, il ne semble pas y avoir d'association claire entre leur niveau circulant et le risque de développer un cancer de la prostate. Néanmoins, la présence dans le plasma de C18 :1 n-9t (dérivé de l'acide oléique C18 :1), et de C18 : 2t (dérivé de l'acide linoléique C18 :2) est associée aux cancers de prostate de bas grade (234).

(1) Les acides gras saturés

Chez l'homme, la présence d'acide palmitique (C16 :0) et l'absence d'acide stéarique (C18 :0), deux acides gras saturés sont associés aux cancers de prostate de bas grade (235). Seule la présence plasmatique de l'acide myristique (C14 :0) est associée aux cancers de haut grade. Chez des souris sur-exprimant le proto-oncogène C-MYC, un régime pauvre en AG saturés diminue le développement de carcinomes invasifs (236).

Indépendamment de la nature des AG circulants, les cellules tumorales présentent des dérèglements dans les voies de synthèse endogène d'acides gras. Le blocage de la synthèse d'acides gras par le Soraphen A, inhibiteur de ACC ralentit la prolifération et diminue la survie des cellules LNCaP et PC-3M (237). L'apport exogène d'acide palmitique bloque les effets du Soraphen A, ce qui indique une dépendance des cellules tumorales vis-à-vis de cet acide gras. De plus, une forte augmentation de l'expression de la FAS et ACC est retrouvée dans les zones tumorales (238, 239), (240). L'inhibition de la synthèse d'acides gras par la technique de RNAi dirigés contre FAS ou ACC n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules non malignes (241). Ces données démontrent ainsi que les cellules tumorales acquièrent une dépendance à leur anabolisme lipidique anormalement élevé.

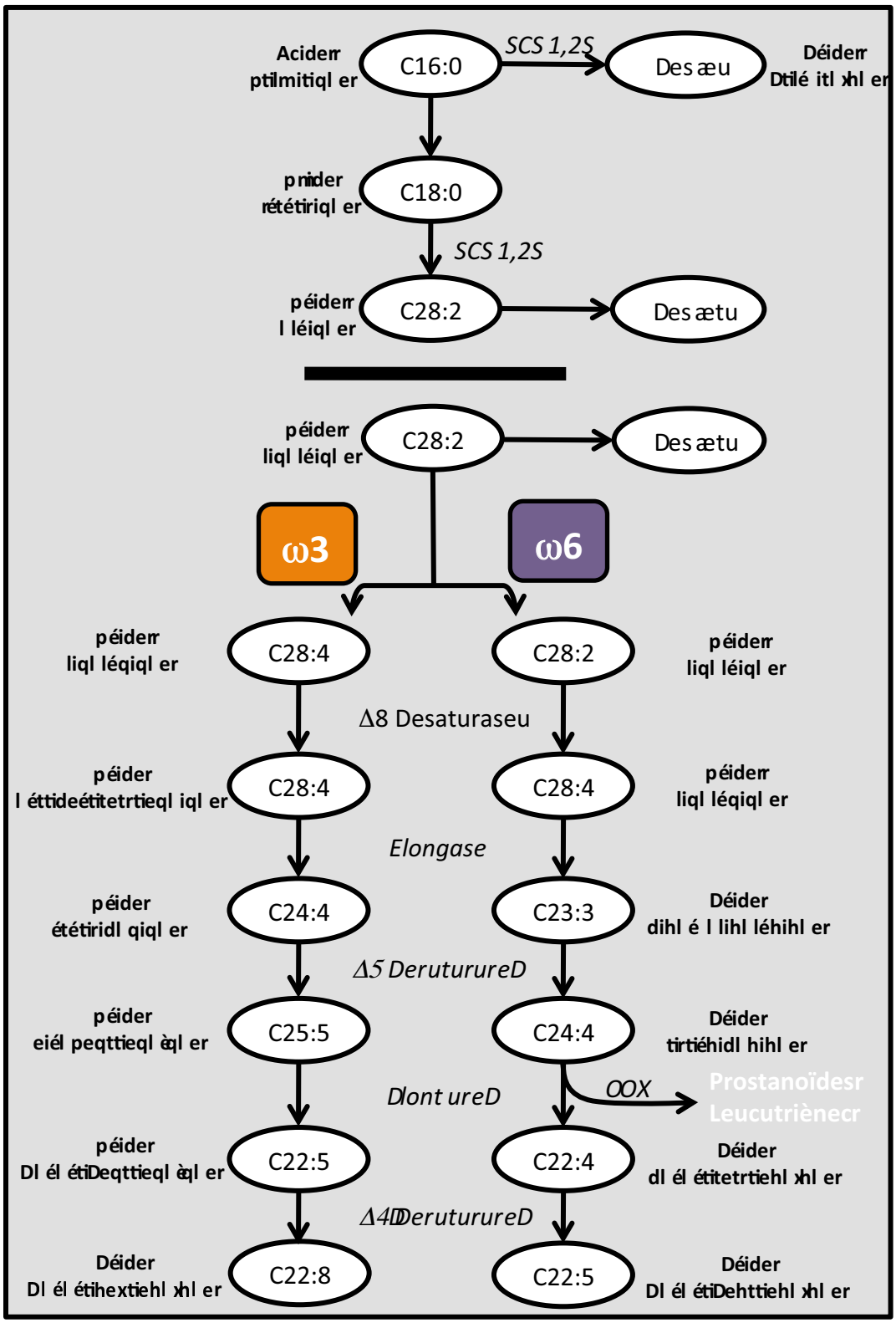


Figure 23 : Insaturation et élongation des acides gras. Chez l'homme, la synthèse de tous les acides gras polyinsaturés est réalisée à partir de l'acide linoléique (C18 : 2) retrouvé dans l'alimentation car les cellules ne possèdent pas l'enzyme qui désature l'acide oléique pour former l'acide linoléique. Les enzymes sont en italique. SCD (*stearoyl-CoA desaturase*), COX (*cyclo-oxygenase*).

Les mécanismes moléculaires à l'origine des changements d'expression et les rôles oncogéniques de ACC et FAS sont encore peu connus. Néanmoins, dans les cellules prostatiques, l'expression de FAS est positivement contrôlée par p63 dont l'expression augmente au cours de la carcinogenèse (242). Ceci suggère donc un possible contrôle de l'expression de *fas* par p63 au cours de la carcinogenèse. Concernant le rôle oncogénique de FAS, son activité conduit à la synthèse d'acide palmitique fournissant le substrat pour la palmitoylation de WNT-1. Ainsi, la surexpression de *fas* dans des cellules iPReCs (*immortalized prostate epithelial cells*) conduit à une palmitoylation de WNT-1 qui est responsable de la stabilisation cytoplasmique de la β caténine, connue pour son rôle oncogénique (243). Une très forte association entre la surexpression de FAS et la stabilisation cytoplasmique de la β caténine est reportée dans les cas de cancer de prostate chez l'homme. Ce mécanisme souligne, une fois de plus, le rôle clé de l'acide palmitique dans les mécanismes de carcinogenèse.

L'expression d'autres enzymes intervenant dans le métabolisme lipidique est connue pour être dérégulée dans le cancer de la prostate. Par exemple, l'α-méthylacyl-CoA-racémase (AMACR) est surexprimée dans les cellules tumorales. Cette enzyme régule la β-oxydation peroxysomale des acides gras branchés. L'augmentation de son activité serait responsable de la production de composés oxydatifs pro-carcinogéniques (244). L'enzyme SCD1 (*stearoyl Co-A desaturase 1*) est sous-exprimée dans les cancers de prostate (245). Cette enzyme intervient dans la production d'acides gras mono-insaturés tels que les acides palmitoléique et oléique depuis les acides palmitique et stéarique respectivement. La perte d'expression de SCD pourrait résulter d'un mécanisme actif visant à augmenter la disponibilité de l'acide palmitique, capitale pour les cellules tumorales.

(2) Les acides gras insaturés

Les cellules humaines sont incapables de réaliser la synthèse d'acide α-linoléique (ω3) (C18 : 2 n-6), qualifié d'acide gras essentiel, à partir de l'acide oléique mono-insaturé (ω9) (C18 : 1 n-9) (Figure 23). Ainsi, les différents acides gras polyinsaturés retrouvés chez l'homme proviennent directement de l'alimentation ou indirectement *via* une synthèse depuis l'acide α-linoléïque, précurseur de tous les acides gras polyinsaturés. Parmi les deux grandes classes d'acides gras poly-insaturés (ω3 connus pour leurs rôles protecteurs et ω6 pour leurs effets délétères sur le cancer de la prostate), certains sont les précurseurs d'importantes voies de synthèse impliquées dans l'inflammation. Il faut rappeler que malgré la controverse, de nombreuses études montrent une corrélation entre le statut inflammatoire et le cancer de la prostate (pour revue lire (138)). Ainsi, un apport plus ou moins important de certains acides gras polyinsaturés pourrait, en modifiant le statut inflammatoire, influencer le développement tumoral.

(a) ω6

Chez l'homme, il existe une association entre la présence d'acide α-linoléique (ALA ; C18 : 2 n-6) de type ω6 et les cancers de prostate de haut grade (235). Dans le modèle génétique murin *pten-/-* de cancer de la prostate, un régime riche en acides gras ω6 favorise la progression tumorale (246). En parallèle, l'exposition des cellules humaines de cancer de prostate PC3 à l'acide de type ω6 stimule la croissance tumorale (247).

Des études montrent que les effets délétères des ω6 pourraient s'expliquer par l'accumulation de certains dérivés métaboliques des acides linoléique et eicosatétraènoïque (acide arachidonique, C20 :4n-6). L'acide arachidonique est le précurseur principal des molécules de la famille des leucotriènes et des prostanoïdes connus pour leurs activités pro-inflammatoires. D'une part, dans les tissus prostatiques tumoraux, il est décrit une forte expression de la 15-lipoxygénase-1 (15 LO-1) qui transforme l'acide arachidonique en acide 15(S)-hydroxypéroxy-5,8,10,14($Z_1Z_1E_1Z$) éicosatétraénoïque (15(S)-HPETE) (248). La réduction biochimique de la 15(S)-HPETE conduit à la formation de 15(S)-HETE (acide 15-(S)-hydroxy- éicosatétraénoïque) fortement impliqué dans l'inflammation. D'autre part, l'étude de Kelavkar *et al.* décrit également une forte expression de COX-1 et COX-2 (*cyclo-oxygenase*) dans les cancers de la prostate (248). Ces enzymes transforment l'acide arachidonique en PGG2 (prostaglandine G2) substrat pour la synthèse des prostaglandines PGE2 ou PGF2 à activité pro-inflammatoire. De plus, l'inhibition pharmacologique des COX par des anti inflammatoires non stéroïdiens diminue à la fois les risques de développer un cancer de la prostate et les taux de PSA chez les patients (249) démontrant donc leur implication dans la progression tumorale.

Ainsi, l'augmentation du catabolisme des acides gras ω6, illustrée par une expression élevée de 15-LO-1 et des COX, liée à la production de médiateurs pro-inflammatoires dans les cellules tumorales prostatiques, permettrait d'expliquer les effets pro-carcinogènes des ω6. En effet, la surexpression orthotopique de 15-LO-1 induit une augmentation de la prolifération et la formation d'hyperplasie bénigne dans la prostate murine (250).

(b) ω3

La plupart des études épidémiologiques montrent une corrélation inverse entre la consommation d'acides gras ω3 et le risque de développer un cancer de prostate. Par exemple, une forte consommation et/ou forte quantité plasmatique d'AG de type ω3 sont associées à une réduction du risque de cancer agressif de la prostate (251, 252). En culture cellulaire, les ω3 augmentent la réponse à la thérapie d'ablation hormonale et retardent la progression vers les stades d'androgéno-indépendance (253). De manière intéressante, dans le modèle de souris *pten-/-*, un apport important en ω3 (acide stéaridonique, C20 :4 n-3) induit l'apoptose des cellules tumorales et une réduction de la croissance tumorale. Les auteurs proposent que l'effet protecteur des ω3 pourrait passer par une compétition des ω3 avec les ω6 sur les enzymes 15-LO-1 et COX (254) pour limiter la production de

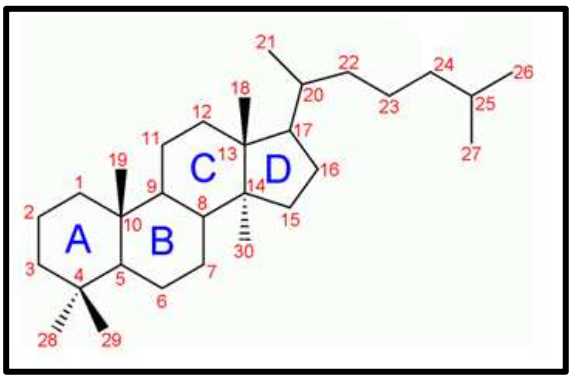


Figure 24 : Structure du cholestérol

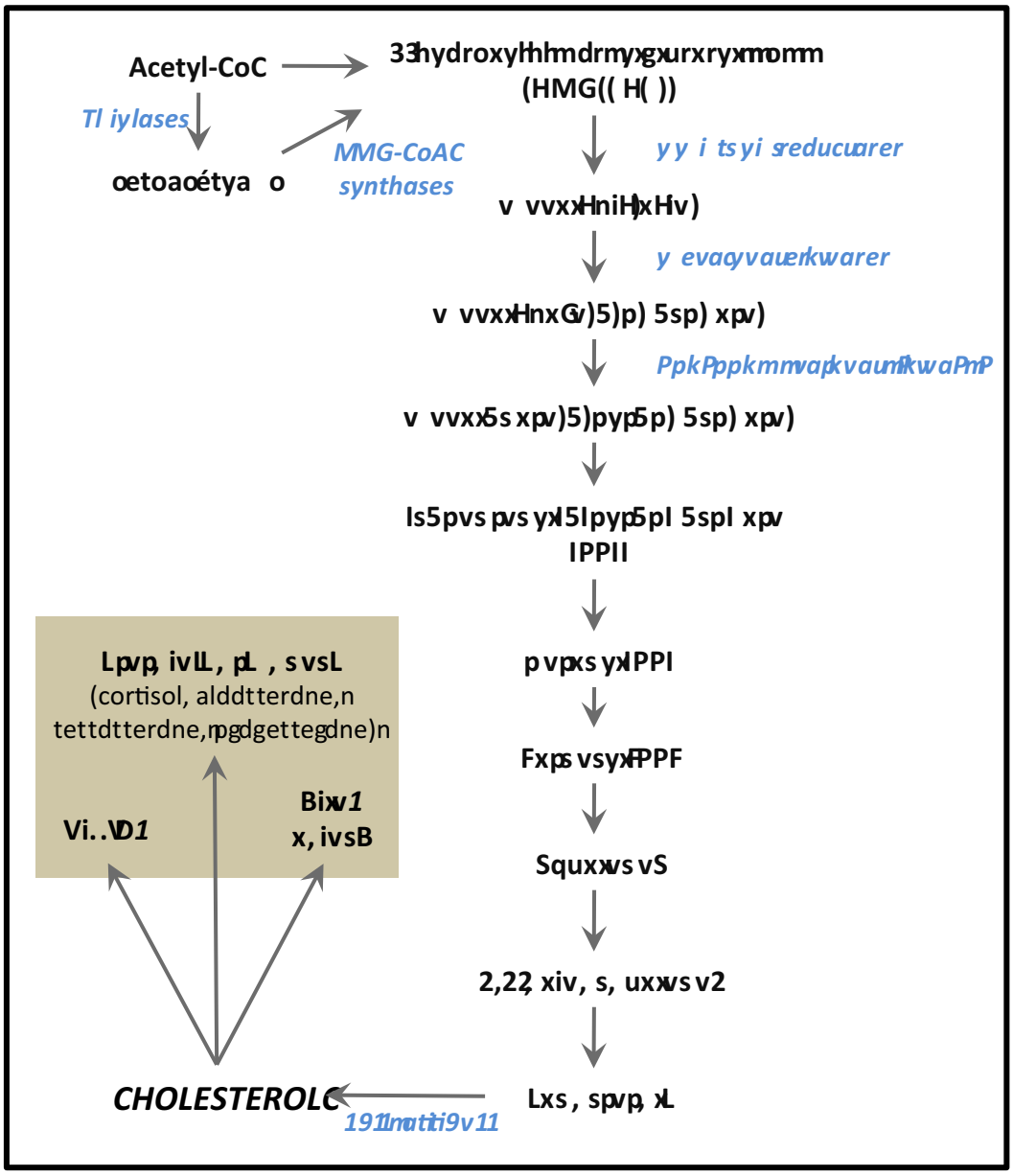


Figure 25 : Voie de biosynthèse du cholestérol. L'*HMG-CoA reductase* est l'enzyme limitante de cette voie. Le cholestérol est utilisé comme substrat pour la synthèse des acides biliaires, de la vitamine D (Vit. D) ainsi que pour les hormones stéroïdiennes.

médiateurs pro-inflammatoires. Très récemment une étude montre que les acides gras polyinsaturés de type ω3 tels que les acides eicosapentaenoïque (EPA ; C20 : 5 n-3) et docosahexaenoïque (DHA ; C22 : 6 n-3) sont capables de favoriser la dégradation de EZH2 par le protéasome et ainsi d'inhiber la marque répressive H3K27me3 dans des cellules de cancer du sein (255). Cette modification des marques épigénétiques est associée à une inhibition de l'invasion des cellules tumorales.

2. Le cholestérol

a) Généralités

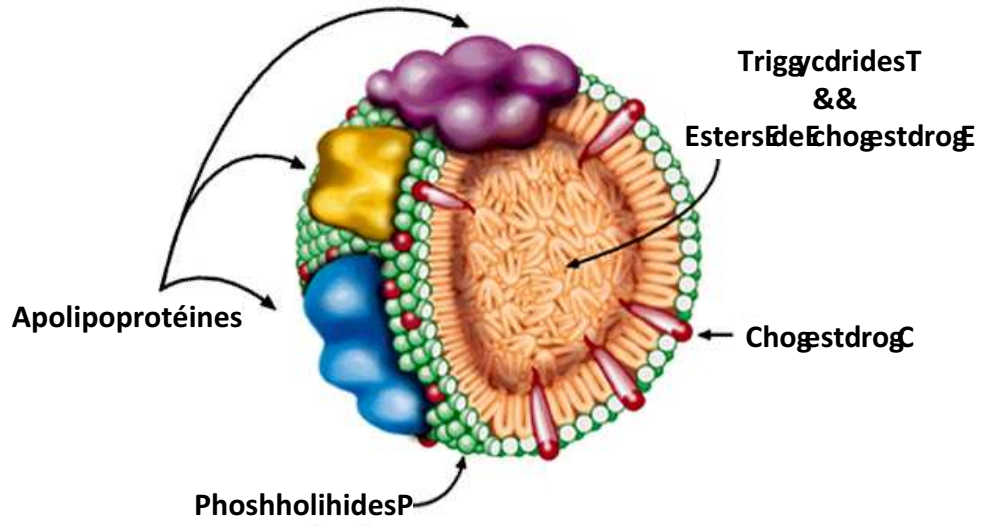
La molécule comprend quatre cycles carbonés, ou noyau cyclo-pentano-phénanthrénique, noté A, B, C et D (Figure 24). Le cholestérol possède un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3. Ce groupement chimique constitue la tête polaire et constitue donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau, on parle d'ester de cholestérol.

Le cholestérol est retrouvé dans les produits d'origine animale. Les sources alimentaires majeures sont les fromages, le jaune d'œuf, la viande bovine et porcine. La synthèse endogène du cholestérol se fait dans le cytoplasme des cellules du foie et de l'intestin principalement. La synthèse débute par la condensation de trois molécules d'acétate en hydroxy-méthyl-glutarate (HMG). Cette synthèse est effectuée par l' HMG-CoA synthase (*hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A synthase*) en présence de coenzyme A, un cofacteur d'enzyme. L'hydroxy-méthyl-glutarate est ensuite réduit en mévalonate. Le mévalonate est ensuite décarboxylé en isoprènoïde à 5 carbones (l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate). La condensation de 6 molécules d'isoprènoïde aboutit finalement au squalène. Enfin, le squalène subit l'action de la squalène cyclase qui crée les cycles du cholestérol à partir des insaturations présentes dans le squalène (figure 25).

b) Rôle physiologique du cholestérol

C'est un composant majeur des membranes cellulaires dans lesquelles il s'intercale entre les phospholipides et diminue la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles. Il joue un rôle prépondérant dans la coalescence des radeaux lipidiques ou *rafts* (256) aussi connus sous le nom de DRM (*detergent-resistant membrane domains*) ou encore DIG (*detergent-insoluble, glycolipid-enriched complexes*). Les *rafts* sont des microdomaines très riches en cholestérol et sphingolipides. La coalescence de *rafts* désigne le regroupement de plusieurs domaines pour former des microdomaines de taille plus importante. L'intérêt de ce mécanisme est évoqué ci-après. Par ailleurs, le cholestérol est également le précurseur de plusieurs voies biochimiques comme la stéroïdogenèse ou la synthèse

A



B

	Densité	Fraction lipidique (% du poid)				Apolipoprotéines majeures
		TG	C	CE	PL	
Chylomicrons	< 0,94	86-94	0,5-1	1-3	3-8	A1, A2, A4, B48
VLDL	0,94-1,006	55-65	6-8	12-14	12-18	B100, C1, C2, C3
LDL	1,006-1,063	8-12	5-10	33-40	20-25	B100
HDL	1,063-1,210	3-6	3-5	14-18	20-30	A1, A2, C1, C2, C3

Figure 26 : Structure et composition des lipoprotéines. A) Schéma représentant une lipoprotéine et ses composants. B) Tableau indiquant la densité des principales lipoprotéines VLDL (*very low density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*) et HDL (*high density lipoprotein*). Les proportions relatives en triglycérides (TG), cholestérol (C), esters de cholestérol (EC) et phospholipides (PL) ainsi que les apolipoprotéines majeures qui composent les lipoprotéines sont indiquées.

d'acides biliaires (Figure 25). En effet, le cholestérol est utilisé comme précurseur pour la synthèse de vitamine D et des hormones stéroïdiennes telles que les hormones surrénaliennes (cortisol et aldostérone) ou les hormones sexuelles (progestérone, œstradiol et testostérone). Enfin, dans le foie, il est converti par la CYP7A1 (*cholesterol-7α-hydroxylase*) en acides biliaires qui sont stockés dans la vésicule biliaire puis déversés au niveau de l'intestin pour permettre l'absorption des lipides.

c) Transport

Le cholestérol et de manière générale tous les lipides plasmatiques, insolubles en milieu aqueux, circulent dans le plasma liés à des protéines spécifiques, les apolipoprotéines, et forment ainsi des complexes macromoléculaires appelés lipoprotéines.

(1) Structure et rôle des lipoprotéines

Les lipides polaires constituent la zone périphérique : cholestérol libre, phospholipides et apolipoprotéines ; le noyau est formé de lipides hydrophobes : triglycérides et esters de cholestérol. Il existe quatre classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL (*very low density lipoprotein*), les LDL (*low density lipoprotein*) et les HDL (*high density lipoprotein*) qui diffèrent de par leur densité de flottation qui est fonction de la quantité et qualité des lipides qui les composent et de par leur composition en apolipoprotéines (figure 26).

Les apolipoprotéines (APO) ont un double rôle : le premier, structural, permet le maintien du complexe macromoléculaire lors du transport depuis les sites de synthèse vers les sites d'utilisation et le second, fonctionnel, assure la reconnaissance des lipoprotéines avec les sites récepteurs et active certaines enzymes. Par exemple, APO A1 qui est principalement retrouvée dans les lipoprotéines HDL « protectrices », permet l'estérification du cholestérol des HDL en activant LCAT (*lecithine cholesterol acyl transferase*). Les APO B et A1 sont les apolipoprotéines les plus importantes. L'APO B est retrouvée au sein des lipoprotéines dites athérogènes : LDL et VLDL.

(2) Métabolisme des lipoprotéines

(Figure 27)

- *Les chylomicrons et les VLDL :*

Les chylomicrons sont d'origine intestinale où ils sont synthétisés à partir des lipides de l'alimentation. La majorité des VLDL est d'origine hépatique où elles sont synthétisées à partir de triglycérides endogènes. Seulement 20% sont synthétisés par l'intestin. Ces lipoprotéines sont libérées dans la lymphe puis circulent dans le sang où elles subissent l'action de la LPL (*lipoprotein lipase*). Les chylomicrons sont transformés en particules résiduelles, ou *remnants*, qui seront ensuite reconnues

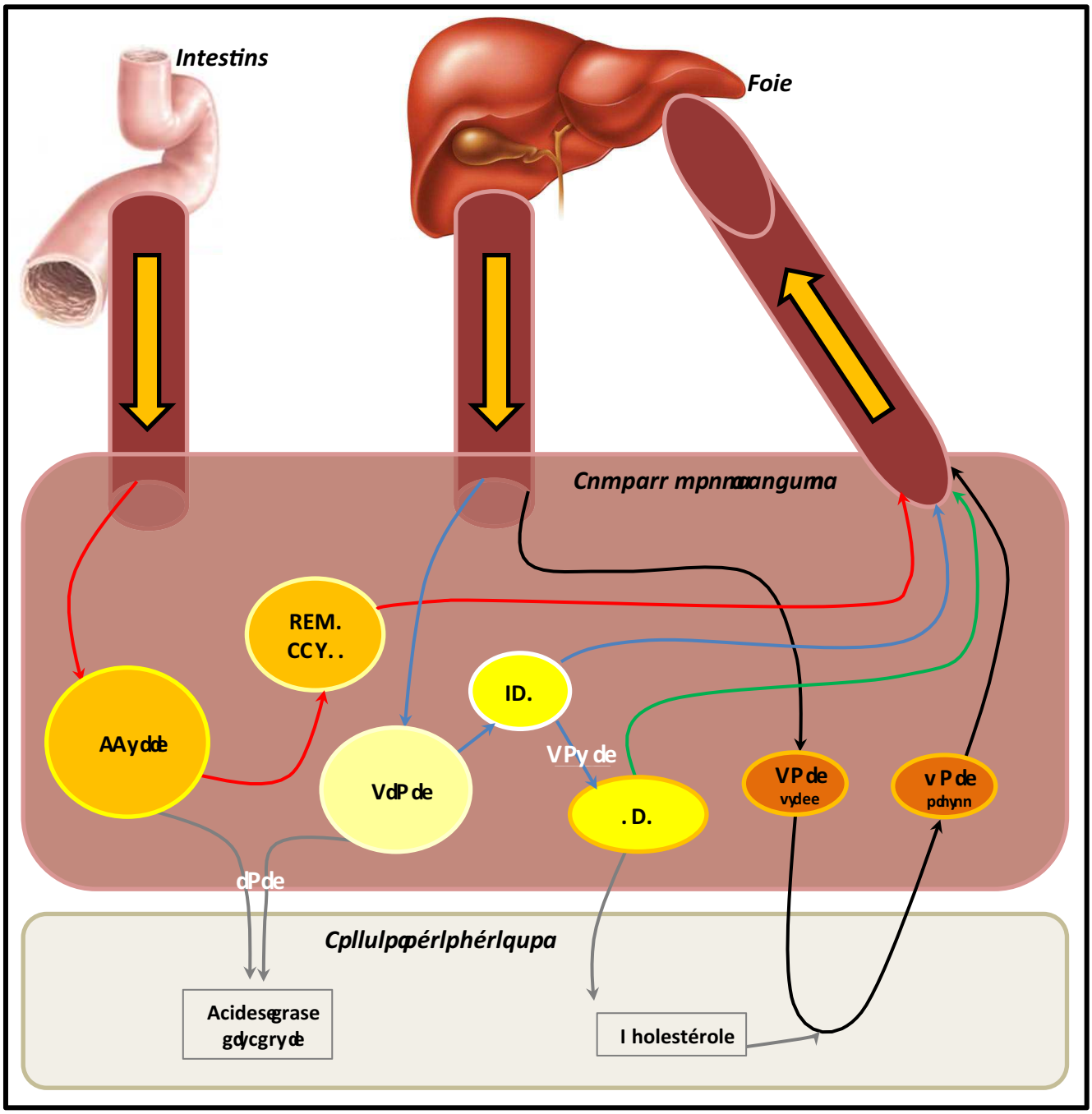


Figure 27 : Métabolisme des lipoprotéines. VLDL (*very low density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*), IDL (*intermediate density lipoprotein*) et HDL (*high density lipoprotein*), CHYL. (chylomicron), REM. (*remnant*), LPL (*lipoprotein lipase*) , HTGL (*hepatic triglyceride lipase*).

via les APO B/E et dégradées par le foie. Les VLDL sont transformées en IDL (*intermediate density lipoprotein*) rapidement converties en LDL par la HTGL (*hepatic triglyceride lipase*).

- *Les LDL :*

Les LDL ainsi formées se composent d'APO B, de cholestérol libre et estérifié. Elles circulent dans le sang vers les tissus périphériques et le foie. Elles sont reconnues par le récepteur à APO B/E : LDLR (*low density lipoprotein receptor*). Après fixation sur le site récepteur, la LDL est internalisée dans des endosomes puis dégradée en cholestérol libre, acide gras et acides aminés de l'APO B. Le cholestérol libre peut : 1) intégrer et structurer les membranes plasmiques ; 2) favoriser la coalescence des *rafts* ; 3) être estérifié avec un acyl-coenzyme A par l'ACAT (*acyl cholesterol acyltranferase*) pour être stocké sous forme d'esters de cholestérol ; 4) être utilisé pour la synthèse d'hormones ; 5) inhiber la synthèse endogène de cholestérol ; et 6) inhiber la synthèse de LDLR (Figure 28). Il faut noter que certaines LDL ne sont pas captées par LDLR car elles sont modifiées par peroxydation ou acétylation. Elles sont alors catabolisées par la voie des SR (*scavanger receptor*) notamment B1 mais également A1 et A2. Le cholestérol libre cellulaire en excès pourra être pris en charge par les HDL pour être redirigé vers le foie et y être dégradé, c'est le transport inverse de cholestérol.

- *Les HDL :*

Les HDL plasmatiques ont plusieurs origines : sécrétion par l'intestin et par le foie ou formation à partir des chylomicrons et des VLDL. En effet, au cours de la lipolyse, il y a des échanges permanents de lipides et d'apolipoprotéines entre les différentes classes de lipoprotéines. Les premières HDL libérées dans la circulation sanguine par les hépatocytes ne contiennent pas d'esters de cholestérol. Ce n'est qu'au fur et à mesure de sa circulation dans le compartiment sanguin que la particule s'enrichit en cholestérol et phospholipides au niveau des tissus périphériques. La fonction principale des HDL est d'assurer le transport inverse du cholestérol en récupérant l'excès de cholestérol libre des tissus périphériques *via* une interaction avec les cassettes ABC (*ATP binding cassettes*) impliquées dans l'efflux du cholestérol et en permettant l'estérification du cholestérol libre par la LCAT (*lecithine-cholesterol-acyl-transferase*). Au niveau du foie, les HDL sont reconnues par SR-B1, le cholestérol est libéré dans les hépatocytes puis métabolisé en acides biliaires ou éliminé directement dans la bile.

d) L'homéostasie du cholestérol

La régulation de l'homéostasie du cholestérol repose sur la gestion à la fois de sa synthèse endogène, de son stockage et de son élimination. Les principaux responsables de la gestion de cette homéostasie sont les récepteurs nucléaires LXRα et LXRβ (*liver X receptor*) dont le rôle et le mécanisme d'action sont détaillés dans le chapitre II (page 59).

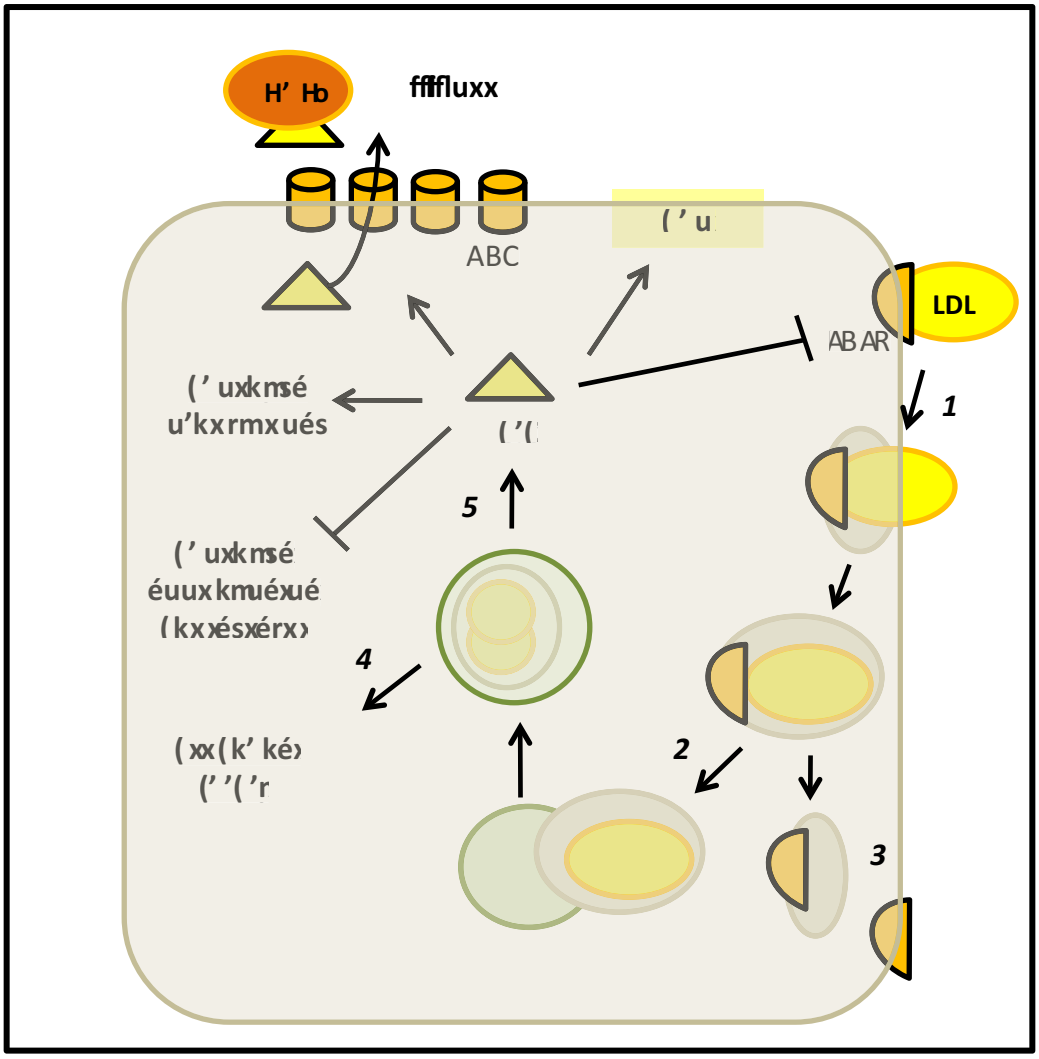


Figure 28: Internalisation et devenir du cholestérol dans une cellule. Les LDL (*low density lipoprotein*) sont reconnus par leur récepteur LDLR (*low density lipoprotein receptor*) puis internalisés dans la cellule par endocytose (1). L'endosome ainsi formé va fusionner avec des lysosomes (2). Lors de cette fusion, une fraction membranaire contenant LDLR est libérée pour permettre le recyclage de ce récepteur (3). Dans les lysosomes, les LDL sont dégradés pour libérer le cholestérol libre (C.L.) (5) ou permettre le stockage sous forme de d'esters de cholestérol (E.C) (4). Le cholestérol libre structure la membrane plasmique et les *rafts*. Il peut également être utilisé pour la synthèse d'hormones ou être redirigé vers le foie sous forme de HDL (*high density lipoprotein*) après export vers le milieu extracellulaire par les cassettes d'efflux ABC. Les « T » en fin de ligne symbolisent une inhibition.

e) Cholestérol et incidence du cancer de la prostate

Au cours des années 1980-90, le risque de cancer de la prostate a été associé à la consommation de produits d'origine animale (257), notamment par la présence des lipides dont la nature exacte restait à déterminer (258). En fait, les lipides semblent avoir un impact sur l'augmentation des cancers métastatiques plus que sur l'incidence totale des cancers. Alors que certains nutriments comme les acides gras permettent d'expliquer l'association observée entre consommation de produits laitiers et risque de cancer de la prostate de haut grade, le risque lié à la consommation de viande rouge reste inexpliqué (257), orientant de fait les études vers un autre lipide : le cholestérol. Pendant de longues années, les liens existant entre la consommation excessive de cholestérol, les taux de cholestérol circulant et le risque de cancer de la prostate ont soulevé la controverse.

Les premières études ont d'abord démontré une corrélation entre le risque de cancer et des taux faibles de cholestérol circulant (259), suggérant ainsi qu'une faible cholestérolémie favorise la survenue de cancer. Des études plus récentes ont montré à l'inverse 1) qu'un fort taux de LDL-cholestérol circulant est associé à une augmentation de 60% du risque de cancer de la prostate (260), et 2) qu'un « faible » taux de cholestérol circulant (< 200mg/dl) est associé à une réduction du risque de développer un cancer de la prostate de haut grade (score de Gleason 8-10) (261). Ces dernières données indiquent donc contrairement, aux premières études, que la présence de cholestérol plasmatique favorise le développement de cancer de la prostate, notamment de haut grade. Comment expliquer ces résultats contradictoires ? Par la suite, il a été établi que le niveau de cholestérol circulant diminue avant les signes d'appel et le diagnostic du cancer. Ainsi, si les 5 à 9 premières années de suivi sont exclues des études, la corrélation entre la faible cholestérolémie et la survenue de cancer, montrée initialement, est perdue (262). De plus, l'inclusion dans les cohortes de patients atteints d'autres cancers encore non diagnostiqués et connus pour diminuer les quantités de cholestérol circulant pouvait également entraîner un biais d'interprétation des résultats (256). Au total, ces données épidémiologiques suggèrent que le cholestérol favorise le développement tumoral.

f) Inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase et cancer de la prostate

L'association entre la présence de LDL cholestérol et le risque de cancer de la prostate pose la question de l'impact de la prise de statines, agents hypocholestérolémiants, sur le risque de cancer. Les statines se concentrent essentiellement au niveau du foie et leurs effets hypocholestérolémiants s'expliquent majoritairement par l'inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, enzyme limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol depuis le mévalonate. Les études épidémiologiques rétrospectives effectuées sur des cohortes de patients traités pour des maladies cardiovasculaires montrent que la prise de statines diminue de façon importante le nombre de

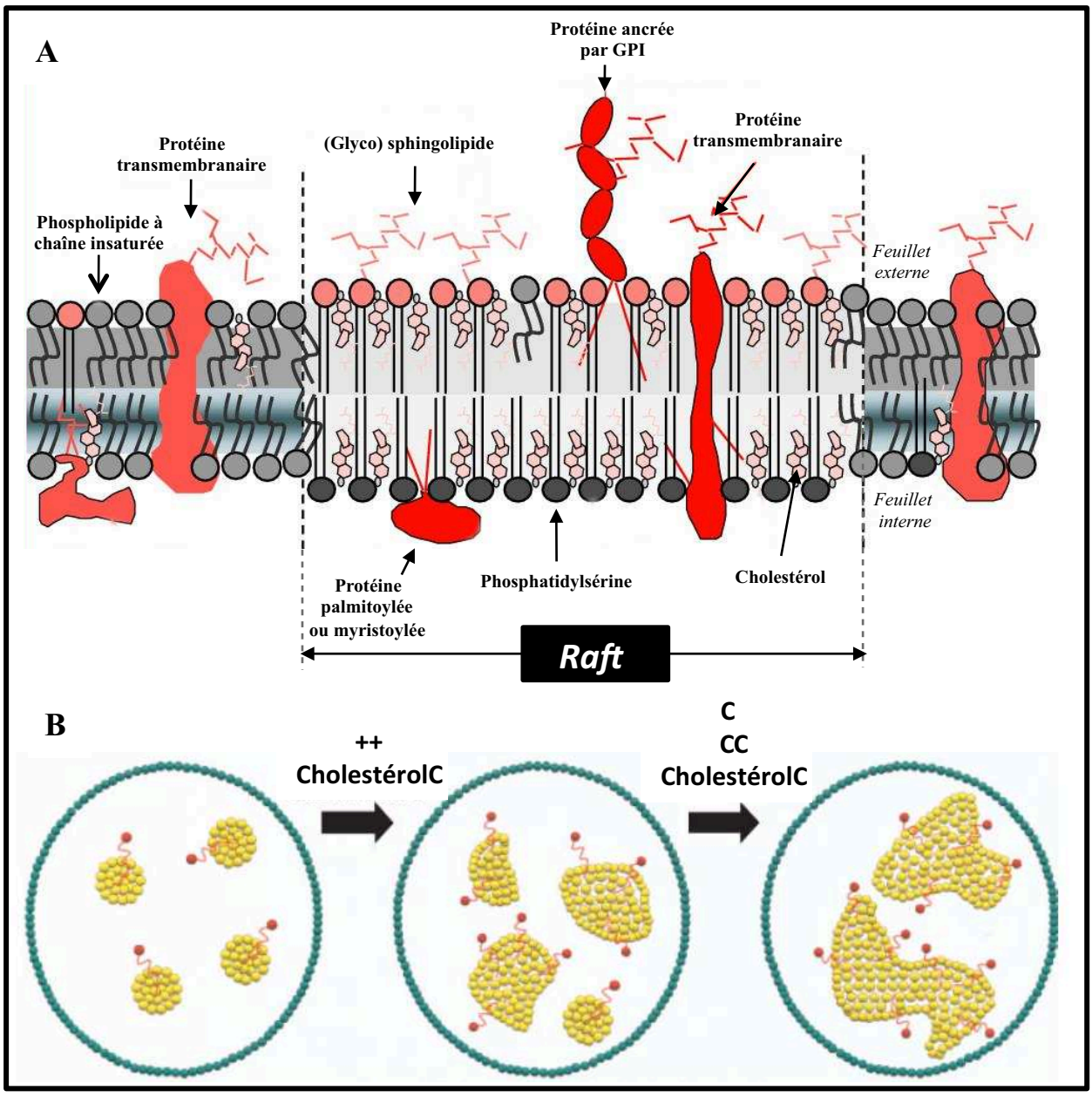


Figure 29 : Vue schématique d'un *raft* lipidique au niveau de la membrane plasmique. A) Schéma représentant les différents composants de la membrane plasmique au niveau d'un *raft*. B) Représentation de la coalescence des *rafts* lorsque l'apport en cholestérol augmente au niveau de la membrane plasmique. Les *rafts* sont figurés en jaune. Les points rouges représentent les protéines liées aux rafts comme la cavéoline ou la flotilline.

cancers agressifs de la prostate (263, 264) surtout lorsque la durée du traitement est supérieure à 5 ans (265, 266).

Au final, l'ensemble de ces données montrent que de fortes quantités de cholestérol circulant augmentent le risque de cancer avancé de la prostate alors que la prise d'agents hypocholestérolémiants comme les statines diminue ce risque, indiquant de facto *le rôle promoteur du cholestérol dans la progression tumorale et/ou l'invasion métastatique.*

---

g) Le cholestérol dans les cellules tumorales

Après les travaux de White (267) qui montrent une accumulation de cristaux de nature lipidique dans les tumeurs, Swyer *et al.* sont les premiers à rapporter une augmentation de cholestérol dans les zones atteintes d'hypertrophie bénigne de la prostate par rapport aux tissus sains (268). Par la suite, ces observations se sont généralisées à d'autres types de cancers tels que les tumeurs gastro-intestinales, pulmonaires ou rénales. Deux mécanismes ont été identifiés : 1) une augmentation du captage du cholestérol circulant (269, 270) associée à la perte des mécanismes régulateurs de l'expression du récepteur des LDL (247) ; 2) une augmentation de l'expression des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol comme l'HMG-CoA réductase (271). Dans les deux cas, il s'agit de mécanismes actifs qui favorisent la disponibilité intracellulaire du cholestérol au cours du développement tumoral. Ceci soulève la question des mécanismes moléculaires par lesquels le cholestérol peut favoriser la progression tumorale.

h) Cholestérol, rafts *et cancer de la prostate*

Dans les membranes plasmiques ou intracellulaires, le cholestérol s'accumule en partie dans des *rafts*. La présence de la cavéoline 1, marqueur des radeaux lipidiques, est un signe de mauvais pronostic associé aux cancers agressifs de la prostate (272, 273). A l'inverse, l'administration d'un anticorps dirigé contre la cavéoline 1 bloque la dissémination métastatique du cancer de la prostate sur un modèle de tumeur orthotopique chez la souris, suggérant le lien potentiel entre les *rafts* et la progression tumorale (274). Depuis ces dernières années les *rafts* lipidiques (Figure 29), domaines riches en sphingolipides, cholestérol et en protéines, sont considérés comme de véritables plate-formes impliquées dans la transduction des signaux intracellulaires. Ainsi, la sérine-thréonine kinase AKT est activée par phosphorylation au niveau de ces microdomaines lipidiques pour stimuler les processus de survie et de croissance cellulaire dans les tumeurs prostatiques. Cette phosphorylation est en partie dépendante de la présence de cholestérol dans la membrane qui, par sa présence, augmente la coalescence des *rafts* (Figure 29), facilitant ainsi le recrutement de AKT au niveau de la membrane

plasmique (275). Le traitement des cellules cancéreuses prostatiques par la simvastatine (statine), la méthyl-β-cyclo-dextrine (chélateur de cholestérol) ou la *filipin* (agent dispersant le cholestérol dans la membrane), diminue la phosphorylation de AKT au niveau des *rafts* et entraîne par conséquent l'apoptose des cellules (276). Ce rôle du cholestérol membranaire semble spécifique des cellules cancéreuses puisque la *filipin* ne modifie ni la phosphorylation de AKT ni l'apoptose des cellules non tumorales de prostate iPrEC (277).

Pour conclure, ces données bibliographiques mettent en évidence l'impact des lipides sur le processus tumoral dans le cadre du cancer de la prostate.

Parmi les acides gras, l'acide palmitique favorise le développement tumoral par des mécanismes encore peu connus qui semblent faire intervenir la palmitoylation de wnt-1 et en cascade, l'activation de la voie β-caténine. Les acides de type ω6 favorisent la croissance tumorale par des actions pro-inflammatoires encore mal comprises. A l'inverse, les ω3 inhibent le processus tumoral par des mécanismes qui font intervenir la modification d'empreintes épigénétiques en inhibant la méthyltransférase EZH2. Il faut souligner les nombreux changements d'expression génique (FAS, ACC, SCD, COX, 15-LO-1) au sein des cellules tumorales prostatiques qui contribuent à augmenter la disponibilité des acides gras, notamment de l'acide palmitique, ou qui favorisent la formation de molécules pro-inflammatoires impliquées dans le développement cancéreux.

En parallèle, l'inhibition de la synthèse de cholestérol par des statines, agents hypocholestérolémiants, diminue la prolifération des cellules tumorales prostatiques qui présentent de fortes quantités de cholestérol intracellulaire. De plus, la prise de statines, chez des patients hypercholestérolémiques est associée à une diminution du risque de cancer avancé de la prostate. Ces données montrent que les cellules tumorales prostatiques présentent donc des perturbations de l'homéostasie du cholestérol qui leur confèrent un avantage prolifératif important par des mécanismes faisant intervenir les rafts *lipidiques.*

Tout cela incite fortement à approfondir les recherches pour 1) mieux comprendre quelle est la place des lipides, acide gras et cholestérol, dans le développement tumoral et 2) mettre en évidence les mécanismes mis en jeu dans les perturbations de l'homéostasie des lipides qui favorisent la progression tumorale.

Parmi les acteurs clés de cette homéostasie lipidique, LXR joue un rôle prépondérant.

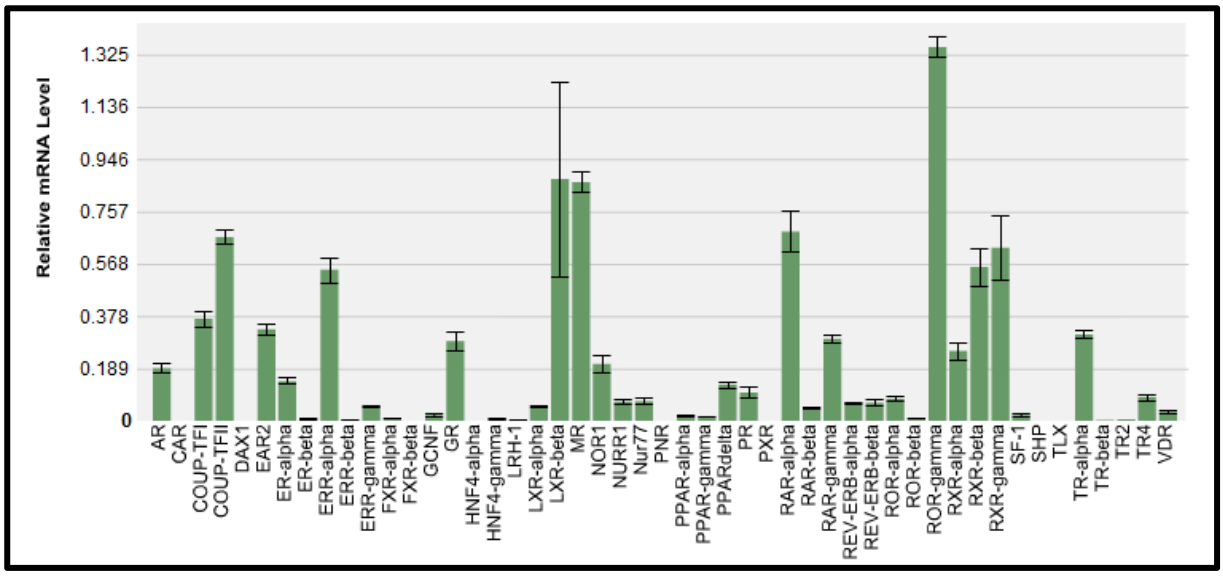


Figure 30: Expression des récepteurs nucléaires dans la prostate de souris. D'après David Mangelsdorf. (http://www.nursa.org/)

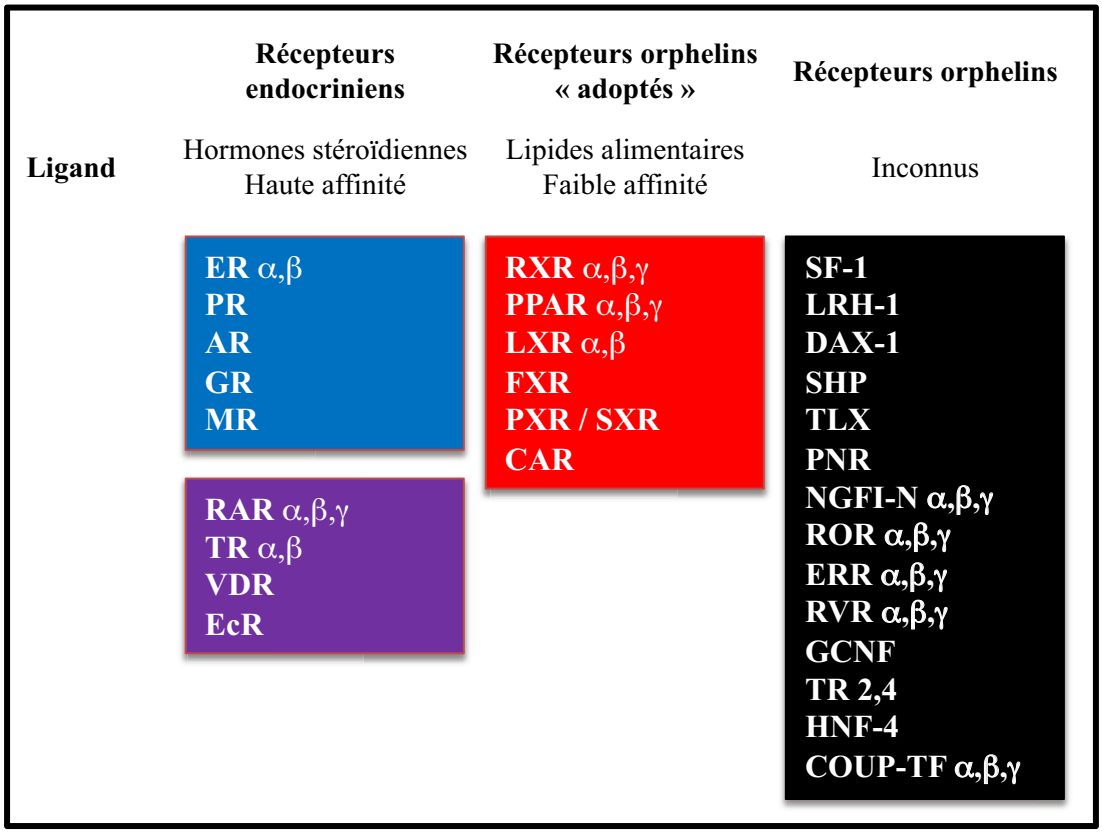


Figure 31 : Classification fonctionnelle des récepteurs nucléaires. Les récepteurs sont classés en fonction de leur capacité à fixer un ligand. En couleur sont représentés ceux pour lesquels un ligand est connu ; les récepteurs orphelins pour lesquels aucun ligand physiologique n'est connu sont représentés en noir. Les 48 récepteurs nucléaires humains sont présentés, ainsi que le récepteur EcR (*Ecdysone Receptor*) isolé chez les insectes. Adapté d'après Chawla *et al.,* 2001 (280).

II. Les récepteurs nucléaires des oxystérols : Liver X Receptors

A. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription potentiellement activables par un signal habituellement lipophile. La nature hydrophobe des ligands leur permet de franchir facilement les membranes cellulaires, même si des transporteurs membranaires ont parfois été décrits et d'activer leurs récepteurs dont la localisation est intra-cellulaire. Les récepteurs nucléaires sont largement répandus dans le règne animal et semblent être apparus tôt dans l'évolution des métazoaires (278). Chez l'homme, 48 récepteurs nucléaires ont été identifiés et regroupés en 7 sous-familles définies d'après une classification phylogénétique (279). La plupart de ces récepteurs sont exprimés au niveau de la prostate (Figure 30).

D'un point de vue fonctionnel, on peut définir trois classes de récepteurs nucléaires : les récepteurs endocriniens ayant un ligand de forte affinité, les récepteurs nucléaires orphelins « adoptés » possédant un ligand de faible affinité et les récepteurs nucléaires orphelins, pour lesquels aucun ligand naturel n'a encore été identifié à ce jour (280) (Figure 31).

Le mode d'action des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes est spécifique de la sous-famille 3 des NRs. Ces hormones sont synthétisées à partir du cholestérol et leur nature dépend de leur lieu de synthèse. Il existe 5 classes d'hormones stéroïdes activant chacune un récepteur différent : les androgènes, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les œstrogènes et les progestines. Très schématiquement, en absence de ligand, ces récepteurs nucléaires sont complexés à des protéines chaperonnes de type HSP (*Heat Shock Protein*), les maintenant à l'état inactif. La fixation du ligand, directement ou après transformation enzymatique, entraîne le départ des protéines HSP, la translocation nucléaire du récepteur et sa dimérisation. Le dimère formé se fixe ensuite au niveau de ses éléments de réponse spécifiques et induit la transcription de ses gènes cibles.

Canoniquement, il est admis que les récepteurs des hormones non stéroïdiennes sont en permanence fixés sur leurs éléments de réponse dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. En absence de ligand, le contact de co-répresseurs permet le maintien de la chromatine dans un état non permissif vis-à-vis de la transcription. L'entrée passive du ligand dans le noyau et sa fixation sur son récepteur induit l'initiation de la transcription des gènes cibles. Ces récepteurs peuvent agir sous forme d'homodimère, d'hétérodimère avec le partenaire obligatoire RXR (*Retinoid X Receptor*), récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque ou bien de monomère. Les récepteurs dimériques peuvent se fixer sur des

éléments de réponse ADN définis comme des répétitions directes DR (*Direct Repeat*), des palindromes IR (*Indirect Repeat*) ou des palindromes inversés ER (*Everted Repeat*) (281).

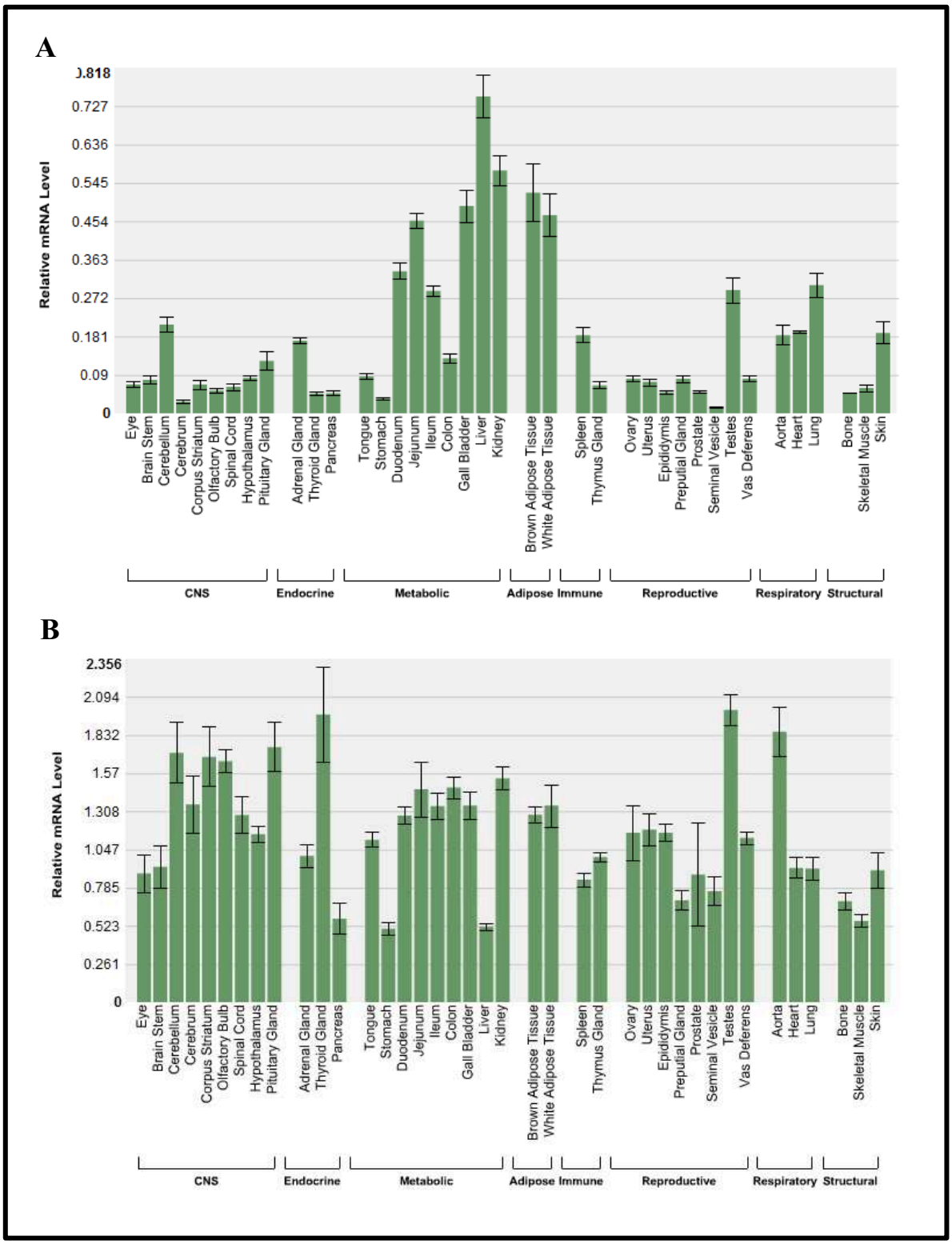


Figure 32: Expression de *lxrα* (A) et *lxrβ* (B) chez la souris. D'après David Mangelsdorf. (http://www.nursa.org/)

B. Structure et mode d'action des LXRs.

1. La structure biochimique

Les LXRs font partie des NRs qui forment des hétérodimères avec RXR. Chez l'homme et la souris, il existe deux isoformes LXRα (NR1H3) et LXRβ (NR1H2) provenant chacune de deux gènes distincts. L'analyse des profils d'expression (Fig 3) montre que l'expression de LXRβ est ubiquiste, alors que celle de LXRα présente de forts niveaux d'expression dans les organes présentant un métabolisme lipidique très actif (282, 283) (figure 32). D'un point de vue structural, ils sont constitués de quatre domaines fonctionnellement indépendants (pour revue lire (284) (Figure 33) :

-Le domaine N-terminal (domaine A/B)

Ce domaine porte une fonction activatrice AF1 (*Activating Function 1*) (286). C'est à ce niveau que l'on trouve le plus de divergence de séquence entre LXRα et LXRβ.

-Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C)

Ce domaine qui définit en partie l'appartenance à la superfamille des récepteurs nucléaires, leur confère la possibilité de reconnaître leurs séquences cibles spécifiques sur l'ADN et présente une homologie de séquence dans la superfamille. Ce domaine DBD (*DNA Binding Domain*) est caractérisé par la présence de deux doigts de zinc de type C_2C_2. Dans chaque doigt, la disposition de quatre cystéines invariables permet la chélation d'un ion zinc. On peut à l'intérieur du DBD définir quatre sous domaines (figure 34) : **1)** La boîte P (P box, boîte proximale) est portée par le premier doigt de zinc. C'est elle qui est impliquée dans la reconnaissance du demi-site de l'élément de réponse, dont la séquence canonique est AGA/GTCA (287) ; **2)** La boîte D (D box ; boîte distale ou de dimérisation) située dans le second doigt de zinc, définit l'écartement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse sur l'ADN. Cette partie du DBD définit aussi le caractère homodimérique ou hétérodimérique du récepteur nucléaire (288) ; **3)** l'extension carboxy-terminale (CTE) située en C-terminal du second doigt de zinc, permet l'interface protéine / protéine et protéine / ADN, notamment par la reconnaissance des régions riches en A/T en 5' des éléments de réponse des récepteurs nucléaires monomériques (287) ; **4)** le signal de localisation nucléaire (NLS) est une succession de 5 à 6 acides aminés basiques riches en arginine et lysine, il permet le signal de transfert nucléaire.

-Le domaine charnière (hinge ; domaine D)

Cette région constitue la charnière entre le DBD et le LBD (*ligand binding domain*) du récepteur. Elle permettrait une rotation de 180° du LBD pour permettre la fixation du dimère de récepteurs sur des

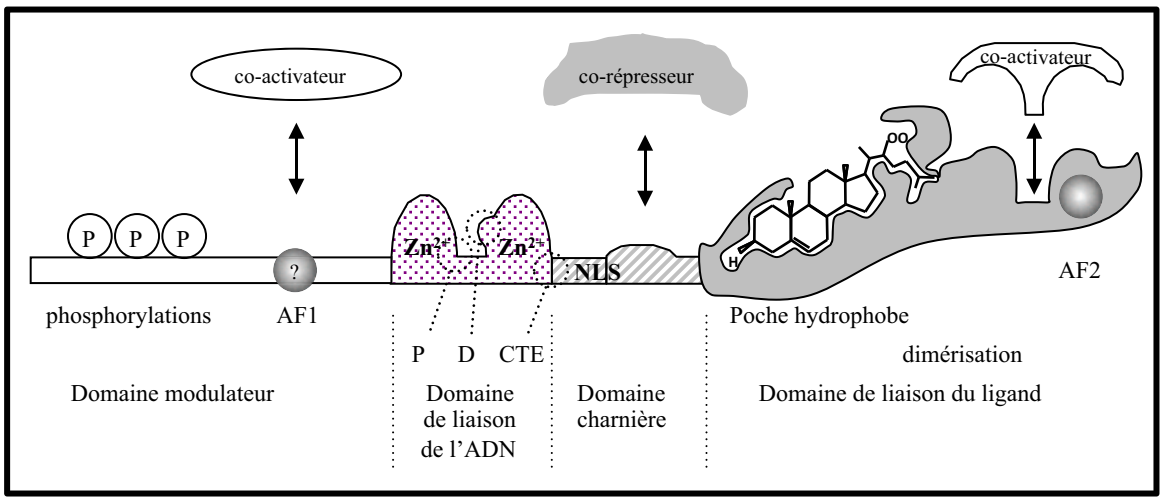


Figure 33 : Représentation schématique d'un récepteur nucléaire. Le ligand utilisé dans ce schéma est le 22(R)-hydroxy-cholestérol. AF1 et AF2 : domaines d'activation ; P : boîte P ; D : boîte D ; CTE : extension carboxy-terminale ; NLS : signal de localisation nucléaire ; : site de phosphorylation. Pour certains récepteurs nucléaires, une interaction N-C terminale a été décrite: celle-ci impliquerait des co-activateurs. D'après Souidi et al., 2004 (285).

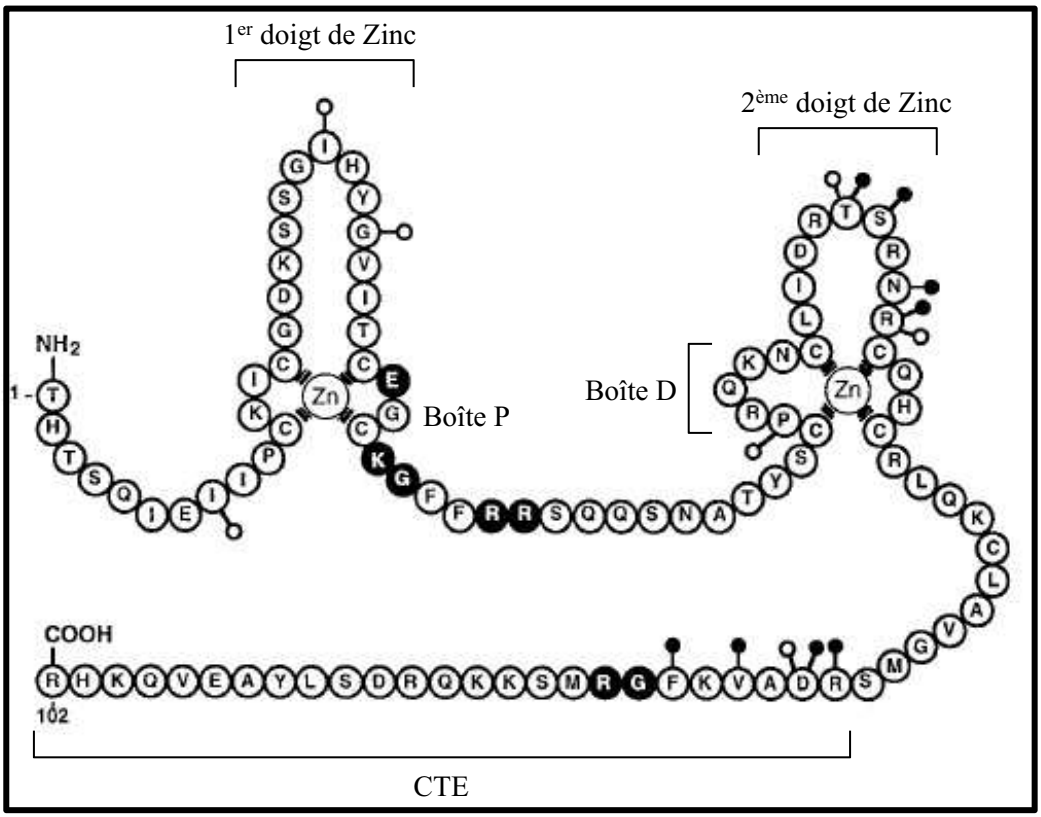


Figure 34 : Représentation schématique de la structure du DBD d'un récepteur nucléaire. Les deux doigts de Zinc et la CTE sont identifiés. Les acides aminés en noir sont impliqués dans les contacts directs avec l'ADN. Les cercles blancs et noirs représentent des acides aminés impliqués dans la dimérisation des récepteurs nucléaires. Adapté d'après Giguère, 1999 (287).

éléments de réponse de type DR ou IR. Le rôle principal du domaine charnière est le contact de co-répresseurs tels que N-Cor (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) ou SMRT (*Silencing Mediator for RAR and TR*) en l'absence de ligand, maintenant la transcription inactive (289, 290).

-Le domaine C-terminal : le domaine de liaison du ligand (LBD)

Il est le siège de plusieurs fonctions dont la principale est la liaison du ligand. L'organisation structurale du LBD définit une poche hydrophobe dans laquelle le ligand de nature lipophile peut venir se fixer. L'hélice 12 porte la fonction AF-2 (*Activating function 2*) (291). En l'absence de ligand, cette hélice est orientée vers l'extérieur du LBD. La liaison de l'hormone permet le réarrangement des hélices 10 et 11 en une hélice unique, ce qui a pour conséquence de libérer l'hélice 12 de son contact avec la boucle Ω (entre les hélices 2 et 3). L'hélice 12 se réaligne ainsi contre la poche hydrophobe de liaison du ligand, agissant ainsi comme un « couvercle » qui scelle la poche en renforçant les interactions entre le ligand et le LBD. Ce modèle est décrit comme le modèle « mouse trap ».

Le LBD intervient également dans la dimérisation car tous les récepteurs nucléaires qui forment des dimères sont liés par leur LBD (292).

2. Les gènes codant LXRα et LXRβ

Le gène murin *lxrα* se situe sur le chromosome 2, il s'étend sur 11 kb et comporte dix exons (293, 294). L'analyse de la séquence de l'ADNc a révélé qu'il existe deux sites donneurs d'épissage dans l'exon 1, générant deux ARNm différents (LXRα1A et LXRα1B) mais la protéine formée est identique quel que soit le site d'épissage. Chez l'homme, le gène *lxrα* se situe sur le chromosome 11. Comme chez la souris, il existe deux variants d'épissage pour le premier exon sans impact sur la séquence protéique en raison de sa position en région 5' non traduite. Deux transcrits supplémentaires ont toutefois été décrits (286). L'analyse de l'expression des trois isoformes révèle comme attendu de forts taux d'expression de LXRα1 au niveau du foie, du cœur, du cerveau, de la rate et du rein. LXRα2 est quant à lui exprimé au niveau testiculaire, où il représente l'isoforme majeure. En revanche, les niveaux d'expression de LXRα3 sont très faibles, quels que soient les organes étudiés.

Le gène murin *lxrβ* occupe 5 kb du chromosome 7 (293) alors que son homologue humain se situe sur le chromosome 19 en position. Comme le gène murin, il possède 10 exons, dont les deux premiers ne sont pas traduits.

3. *Mode d'action des LXRs*

a) Les éléments de réponse des LXRs

Les LXRs se fixent sur l'ADN principalement sur des LXRE de type DR4 ou DR1 dont les séquences consensuelles sont : DGGTYAyynnVGKKCA (295) où D = A, G ou T ; K = G ou T ; V = A, C ou G ; et Y = C ou T pour les DR4 et AGGTCAaAGGTCA (296) pour les DR1.

b) En l'absence de ligand : les co-répresseurs

Dans le mode d'action canonique des LXRs, lorsqu'aucun ligand n'est présent au niveau du LBD, l'hétérodimère est constitutivement fixé sur les DR4. Ainsi, à l'état inactif ces NRs agissent-ils comme des répresseurs de la transcription génique par le recrutement de co-répresseurs (pour revue lire (297)). Les co-répresseurs les plus documentés sont N-CoR et SMRT. Par des motifs situés en position N-terminale, le co-répresseur contacte à la fois directement et indirectement des HDAC (298) ; (299). Les activités HDAC maintiennent la chromatine dans un état de condensation non permissif pour la transcription génique.

Ainsi, lorsqu'il n'y a pas de ligand, la présence constitutive sur les LXRE (*LXR response element*) des complexes RXR/LXR-Co-répresseur-HDAC agit comme un répresseur basal de l'expression génique. Pour plusieurs gènes cibles, chez les souris pour lesquelles les gènes codant les LXRs α et β ont été invalidés ($lxr\alpha;\beta^{-/-}$), on assiste à une levée de la répression basale de ces gènes cibles comme pour *akr1b7* (*aldo-keto-reductase 1b7*) (295) ou *star* (*steroidogenic acute regulatory protein*) (300).

c) En présence de ligand : les co-activateurs

De manière schématique, la fixation d'un agoniste de LXR ou de RXR dans la poche de liaison du ligand provoque le départ des co-répresseurs et la fixation de co-activateurs ce qui crée un environnement chromatinien permissif pour la transcription.

Parmi les co-activateurs, il faut distinguer : **1)** les facteurs remodelant la chromatine dont la famille la plus connue est la famille SWI/SNF (*mating type switching/sucrose nonfermenting*). Ces facteurs sont capables d'hydrolyser l'ATP pour déstabiliser les interactions entre l'ADN et les histones, permettant ainsi un relâchement de la chromatine et facilitant l'accès à l'ADN par les facteurs de transcription ; **2)** les facteurs modifiant les histones parmi lesquels on retrouve certaines HAT : SRC-1 (*Nuclear Receptor Coactivator 1*), GRIP-1 *(Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1),* CBP (*c-AMP Response Element Binding Protein*), p300, PGC1α (*PPAR-Gamma,*

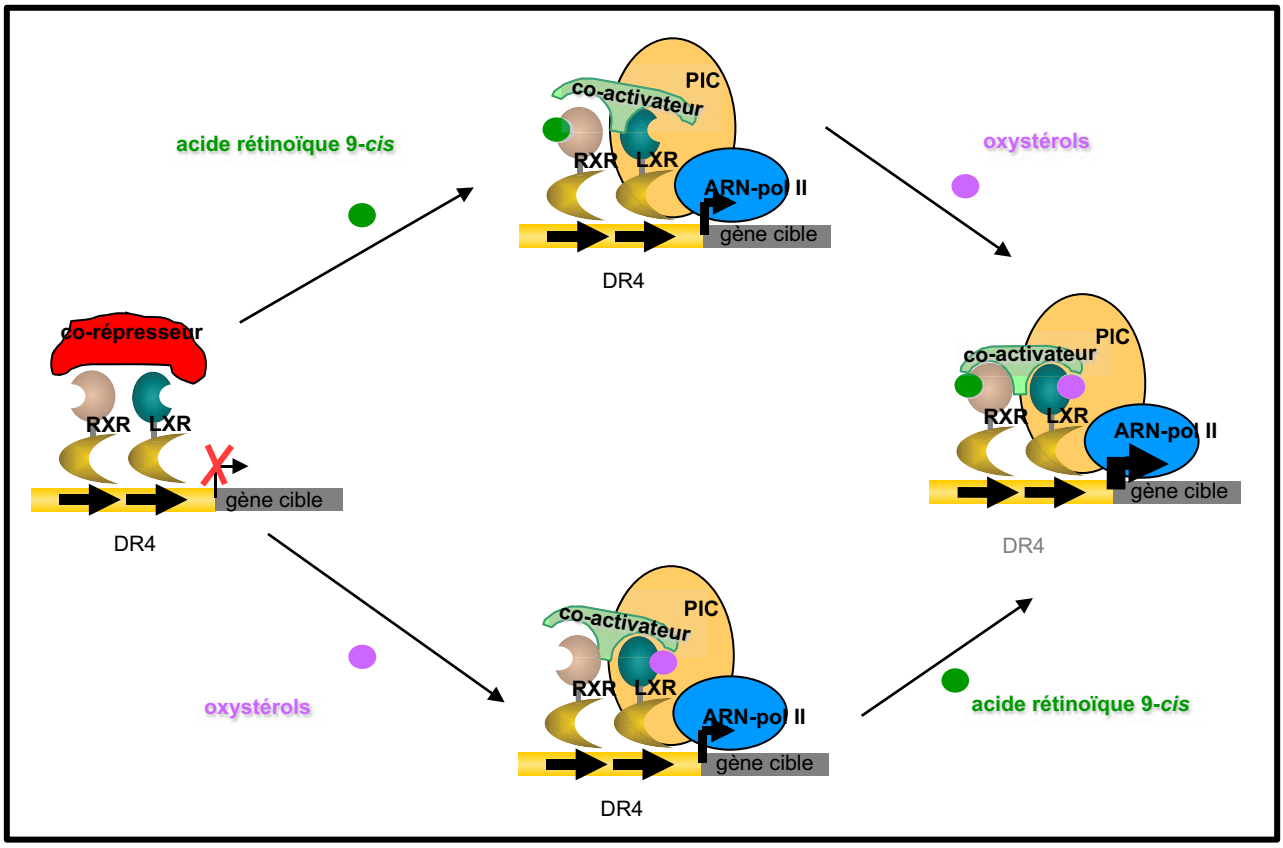


Figure 35 Mécanisme d'action de l'hétérodimère RXR/LXR sur la transcription d'un gène cible. L'hétérodimère RXR/LXR peut être activé à la fois par l'acide rétinoïque 9-cis et/ou un oxystérol. La double induction entraîne une activité additive ou synergique sans doute par un recrutement plus efficace de coactivateurs. ARN-pol II : ARN polymérase II ; PIC : Pre-Initiation-Complex ; DR4 : Direct Repeat 4 ; LXR : Liver X Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor. Modifié d'après Peet et al., 1998a (302).

Coactivator-1), TRRAP (*Transformation/Transcription Domain-Associated Protein*) ainsi qu'un facteur affectant la méthylation des histones : Rap250 (*Nuclear Receptor-Activating Protein*).

Au final, le recrutement du complexe de pré-initiation de la transcription entraîne l'activation de l'expression des gènes cibles (301) (Figure 35). Il faut noter que l'hétérodimère LXR/RXR est dit permissif car il peut être activé par un ligand de RXR seul ou de son partenaire LXR. En présence des deux ligands, l'activation est additive voire synergique selon le gène cible considéré.

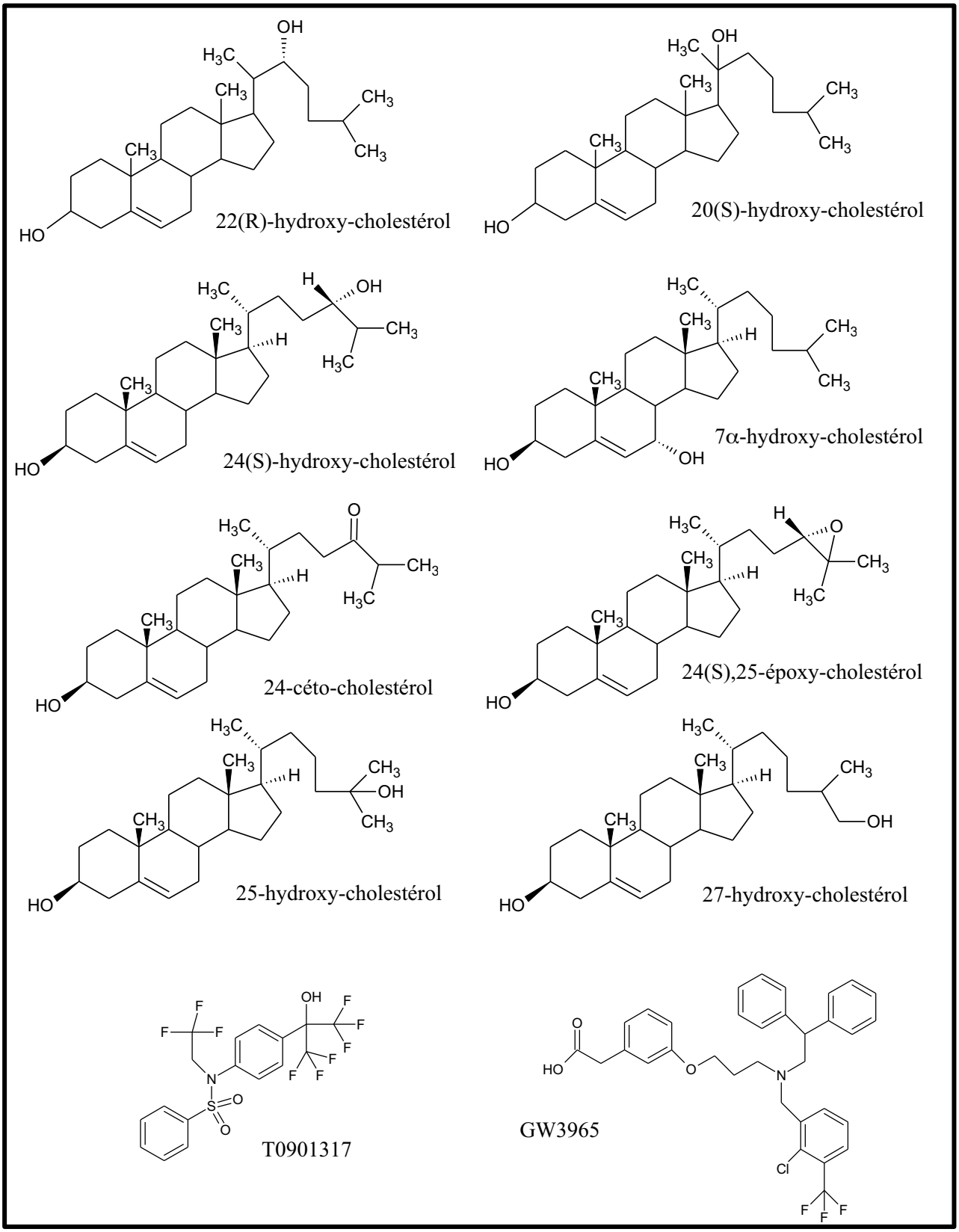


Figure 36: Quelques agonistes naturels et synthétiques des LXRs. Tous ces ligands n'ont pas la même affinité pour les LXRs et donc pas le même pouvoir de transactivation de gènes cibles. Les ligands synthétiques ont une affinité de l'ordre de 10^{-7}M contre 10^{-5}M pour les ligands naturels. Modifié d'après Souidi *et al*., 2004 (285).

C. Régulation de l'activité transcriptionnelle des LXRs

1. Les agonistes naturels

La plupart des agonistes naturels des LXRs sont des oxystérols, dérivés du cholestérol, produits par oxydation ou hydroxylation (pour revue lire (303)). Ces molécules peuvent dans l'organisme avoir deux origines : une origine endogène, par synthèse chimique et enzymatique, et une origine exogène, par apport alimentaire. On peut schématiquement considérer les oxystérols comme des précurseurs des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes. Les oxystérols ayant révélé les meilleurs facteurs d'induction des LXR sont : le 22(R)-hydroxy-cholestérol, le 20(S)-hydroxy-cholestérol, le 24-hydroxy-cholestérol et le 7α-hydroxy-cholestérol (304).

2. Les agonistes synthétiques

Parmi les fonctions physiologiques attribuées aux LXRs, leur rôle hypocholestérolémiant crée un challenge thérapeutique dans la découverte de molécules à destinée anti-athérosclérotique (voir chapitre D, page 59). Toutefois, par l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de triglycérides, les LXRs ont un rôle hypertriglycéridémiant, rendant l'utilisation des ligands agonistes actuels impossible en thérapeutique humaine (301). C'est pourquoi le développement de molécules activatrices des LXRs pouvant exercer un rôle hypocholestérolémiant sans effet sur le métabolisme des triglycérides est actuellement un domaine d'intérêt.

Parmi les nombreux composés qui ont été développés sur la base d'étude *in silico* des relations entre structure et activité, le T0901317 (*N*-(2,2,2-trifluoroéthyl)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluorométhyl-éthyl)-phényl]-benzènesulfonamide) est resté longtemps le ligand synthétique le plus utilisé dans les études fondamentales des LXRs. Ce composé présente toutefois l'ensemble des caractéristiques d'un ligand agoniste du récepteur nucléaire PXR (*Pregnane X Receptor*) (305). Un autre composé possédant un fort pouvoir agoniste de LXRα et LXRβ et complètement inactif sur le récepteur nucléaire PXR (305) est actuellement largement utilisé en recherche fondamentale : le GW3965. (figure 36 ; (285)).

3. Les ligands inhibiteurs et antagonistes

Les LXRs ayant un fort pouvoir hypocholestérolémiant, les efforts des compagnies pharmaceutiques sont plutôt centrés sur le développement de ligands synthétiques activateurs plutôt qu'inhibiteurs. Cependant, au cours de cribles de composés pouvant se fixer théoriquement dans la poche hydrophobe de LBD et potentiellement capables d'activer les LXRs, certaines molécules synthétiques antagonistes ont été identifiées. Par exemple, le 22(S)-hydroxy-cholestérol est capable de déplacer un ligand connu du LBD des LXRs, suggérant une liaison directe de la molécule (306). Il existe également des antagonistes naturels notamment le 7-cétocholestérol et le 5α,6α-époxy-cholestérol qui sont des composants des LDLs oxydés. Sous leur forme 3-sulfatée, ces deux composés naturels sont des inhibiteurs des LXRs (307). Enfin, les acides gras poly-insaturés connus pour être des ligands agonistes de PPARα et PPARδ (308), (309) sont capables d'exercer un effet antagoniste sur LXRα (310) et sur LXRβ (311).

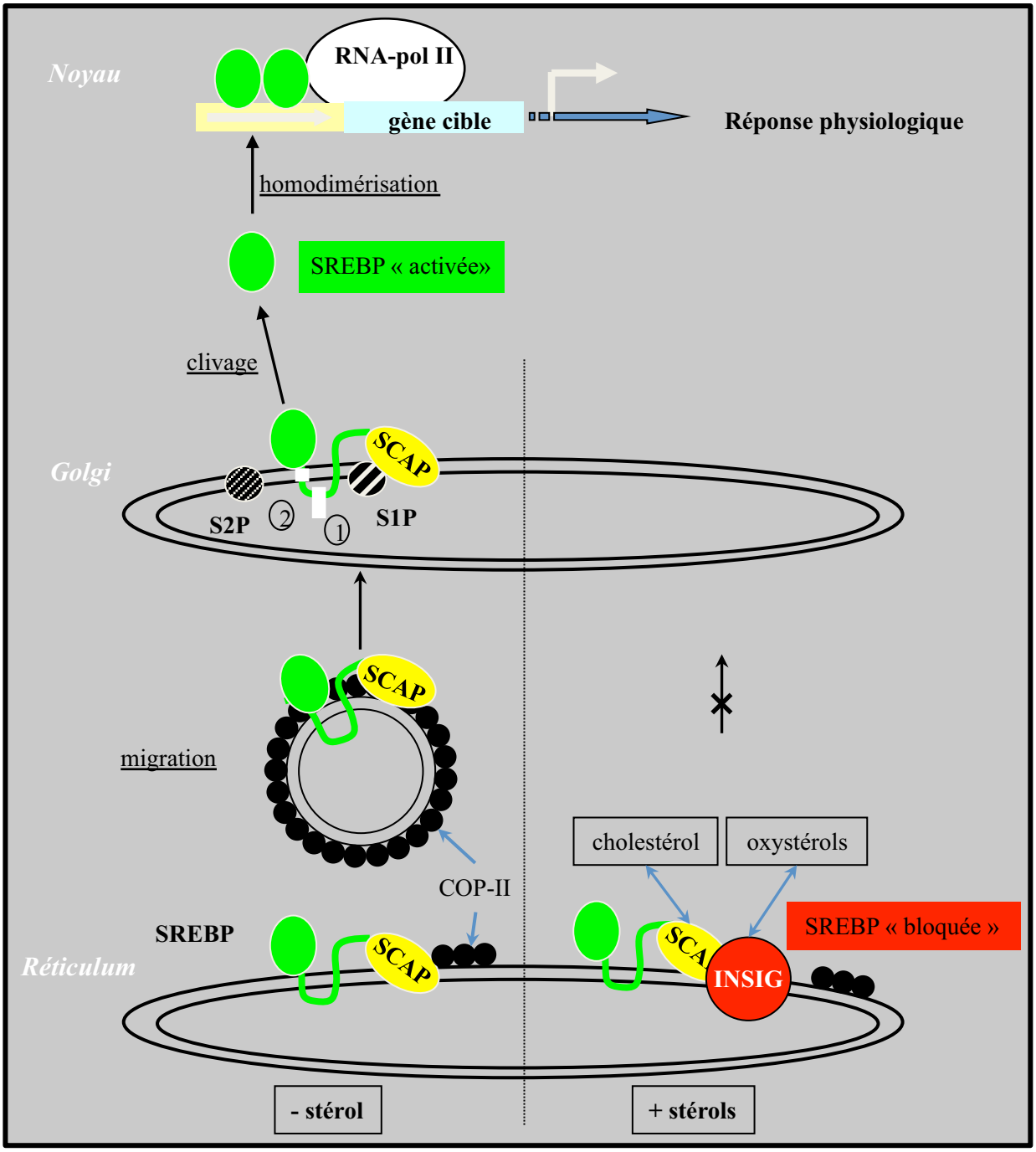


Figure 37 : Le mécanisme d'action des SREBP. En l'absence de stérol, dès sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, SREBP s'associe aux protéines SCAP. Ces dernières contactent des protéines COP-II, permettant au complexe SREBP/SCAP de migrer vers l'appareil de Golgi dans des vésicules bordées de COP-II. A ce niveau, SREBP est clivée en deux temps par les protéases S1P puis S2P, libérant le domaine N-terminal de la protéine. Ce dernier transloque dans le noyau et dimérise. Les dimères formés se fixent sur les SRE et activent la transcription des gènes cibles. Lorsque la concentration en stérols intracellulaires augmente, la fixation du cholestérol à SCAP ou des oxystérols à INISG empêche la formation des complexes SCAP/COP-II, séquestrant SREBP dans le réticulum endoplasmique. Adapté d'après Souidi et al., 2004 (285).

D. Fonctions physiologiques régulées par les LXRs

Ces dernières années, la recherche des gènes cibles des LXRs a permis de les associer à de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'immunité dans laquelle ils jouent un rôle anti-inflammatoire (312), le métabolisme énergétique avec un contrôle de l'homéostasie lipidique et glucidique (313) et la stéroïdogenèse (314). Ici nous présenterons seulement le rôle des LXRs dans la gestion de l'homéostasie lipidique, acides gras et cholestérol.

1. Le métabolisme des acides gras

a) Les cibles directes

L'administration de T0901317 à des souris provoque une augmentation des ARNm des gènes *acc*, *fas* et *scd-1* au niveau du foie (315). Cette augmentation, qui n'est pas induite chez les souris *lxr*$\alpha;\beta^{-/-}$, s'accompagne d'une hypertriglycéridémie marquée. Par la suite, plusieurs études ont montré une activation directe des trois gènes *acc* (316), *fas* (317) et *scd-1* (318) *via* un élément de réponse fonctionnel dans leur promoteur. Les LXRs, activés par le T0901317, ont au total un effet hypertriglycéridémiant.

b) SREBP-1c

Les facteurs de transcription SREBP (*sterol response element binding protein*) sont des régulateurs clés du métabolisme des lipides. Trois SREBPs sont actuellement connus : SREBP-1a et 1c sont issus de promoteurs alternatifs d'un même gène et SREBP2 provient d'un gène distinct (pour revue lire (319, 320)). Les stérols peuvent contrôler les SREBP à deux niveaux. La protéine SREBP est synthétisée sous forme d'un précurseur associé à la membrane du réticulum endoplasmique. Dans des cellules où la concentration en cholestérol est faible, immédiatement après sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, SREBP s'associe aux protéines SCAP (*Srebp Cleavage Activating Protein*). Cette association permet la migration du complexe SCAP/SREBP vers l'appareil de Golgi, dans des vésicules bordées de protéines COP-II (*Coat Protein complex-II*). La protéine SREBP y est clivée par la protéase S1P (*Site 1 protease*) (Figure 37). Un second clivage par la protéase S2P permet la libération du domaine N-terminal de SREBP de la membrane. Ce domaine, de type bHLH-Zip, est le facteur de transcription *stricto sensu*. Il traverse la membrane nucléaire et stimule la transcription de ses gènes cibles en se fixant sur les SRE situés dans les régions promotrices. Lorsque la concentration en cholestérol augmente, le cholestérol membranaire contacte SCAP, qui recrute une protéine INISG

(i*nsulin induced gene*). Cette association bloque la liaison entre SCAP et COP-II (321), séquestrant SREBP dans le réticulum endoplasmique.

Des travaux du groupe de Brown et Goldstein ont montré que les oxystérols ligands des LXRs sont capables de se lier aux protéines INSIGs, permettant la formation du complexe SCAP/INSIG (322).

Le second niveau du contrôle des SREBPs par les stérols est dépendant des LXRs. En effet, les deux isoformes des LXRs peuvent activer l'expression du gène *srebp1c* par leur fixation à un LXRE (323). Cette activation transcriptionnelle, confirmée *in vivo*, n'est pas retrouvée chez les souris déficientes en LXRs. Ainsi, les ligands des LXRs peuvent-ils stimuler indirectement les gènes cibles de SREBP1c, notamment *acc*, *fas*, *sdc-1* et le gène codant la *glycerol-3-phosphate acyltransferase*, responsable de l'étape initiale de la synthèse des glycérolipides.

c) ChREBP

ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) est un facteur de transcription récemment identifié activé par un régime riche en glucides (324). En condition de concentration faible en glucose, ChREBP est localisé dans le cytoplasme (325). Lorsque la concentration en glucose augmente, ChREBP est déphosphorylé, permettant son entrée dans le noyau et l'activation de ses gènes cibles par fixation à des séquences ChRE dans les régions promotrices. Ce facteur de transcription peut activer directement l'expression des gènes *fas* et *acc* par fixation dans leur promoteur, stimulant ainsi la lipogenèse hépatique *in vivo* (326). Des travaux récents montrent que ChREBP est une cible transcriptionnelle directe de LXRα (327). Les auteurs ont identifié deux LXREs fonctionnels dans le promoteur du gène codant ChREBP. *In vivo*, le T0901317 stimule son expression hépatique chez des souris sauvages et l'induction est perdue chez les souris déficientes en LXRs. Le traitement par ce ligand active l'expression de gènes cibles communs à ChREBP, SREBP1c et LXR. Toutefois, il est important de noter que l'induction des gènes cibles hépatiques de ChREBP par un régime riche en glucides est conservée chez les souris invalidées pour les LXRs (328) démontrant que dans ce contexte, l'activation de ces gènes est indépendante de LXR. Cette dernière étude s'oppose aux travaux de Mitro *et al*. qui avaient précédemment montré une induction de l'expression de gènes de la lipogenèse par le glucose par fixation directe aux LXRs (329).

Qu'ils agissent directement ou indirectement sur l'expression des gènes de la lipogenèse, les LXRs sont capables d'activer la synthèse d'acides gras, ce qui leur confère une activité hypertriglycéridémiante.

---

2. Le métabolisme du cholestérol

a) La synthèse des acides biliaires

Initialement, la découverte des oxystérols comme ligands potentiels des LXRs a laissé supposer que ces récepteurs pourraient contrôler le métabolisme du cholestérol. Ainsi, un LXRE fonctionnel a-t-il été découvert dans le promoteur du gène *cyp7a1* (330). C'est par l'invalidation du gène *lxrα* chez la souris que Peet *et al*. (294) ont pu établir un lien fonctionnel *in vivo* entre LXRα et CYP7A1. Les souris transgéniques, nourries avec un régime contenant 2 % de cholestérol pendant 90 jours développent une stéatose hépatique (« foie gras »). Cette hépatomégalie résulte d'une accumulation d'esters de cholestérol dans le cytoplasme des hépatocytes. Les auteurs ont montré que le phénotype est causé par l'absence de régulation du gène *cyp7a1*. L'excès de cholestérol n'est ainsi plus catabolisé en acides biliaires et s'accumule dans les cellules hépatiques des souris *lxrα*$^{-/-}$. De manière intéressante, la présence de LXRβ au niveau hépatique n'est pas capable de compenser la perte de l'isoforme α. Ainsi, LXRα permet une diminution du taux de cholestérol intracellulaire en stimulant son catabolisme hépatique et son élimination sous forme d'acide biliaire.

b) La synthèse de novo

L'invalidation du récepteur LXRα (*lxrα*$^{-/-}$) augmente l'expression basale de plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (294) tels que *HMG CoA synthase*, *HMG CoA Reductase*, *farnesyl diphosphate synthase* et *sqs* (*squalene synthase*). On peut également noter une augmentation d'ARNm SREBP-2, un facteur de transcription régulateur des gènes codant ces enzymes. L'augmentation des transcrits *HMG CoA synthase*, *diphosphate synthase* et *sqs* est également présente chez les souris *lxrβ*$^{-/-}$ (331). *In vivo*, l'administration de T0901317 à des souris sauvages provoque une diminution des transcrits *HMG CoA Synthase* et *sqs* au niveau hépatique (315). Au total, les deux isoformes des LXRs inhibent la synthèse endogène du cholestérol.

c) Le captage du cholestérol circulant

Récemment la découverte de *idol* (*inducible degrader of LDLR*) comme nouveau gène cible des LXRs a permis la mise en évidence de leur rôle dans la régulation du captage de LDL par les cellules. IDOL est une E3 ligase qui ubiquityle LDLR au niveau du domaine cytoplasmique, ce qui conduit à sa dégradation par la protéasome. En culture de cellules, l'activation des LXRs entraîne une augmentation d'expression de *idol*, le dégradation de LDLR et ainsi une diminution du captage de LDL par les cellules. A l'inverse, l'absence de régulation de *idol* par LXR est responsable d'une forte accumulation de LDLR dans l'intestin grêle et le foie de souris *lxrα;β*$^{-/-}$ (332). Les LXRs participent

donc au contrôle du captage de LDL par les cellules *via* ce mécanisme de régulation post-traductionnel de LDLR mettant en jeu l'E3 ligase IDOL.

d) Le transport inverse

Le transport inverse du cholestérol désigne sa prise en charge des organes périphériques et son retour au foie où il est métabolisé. Le contrôle du transport inverse du cholestérol par les LXRs s'effectue à deux niveaux.

Les transporteurs de type ABC (*ATP Binding Cassette*) sont des protéines transmembranaires capables de multimériser et de former une structure de type « canal ». Grâce l'hydrolyse de l'ATP, ces transporteurs permettent le transport actif unidirectionnel d'un substrat spécifique au travers des membranes. Dans cette vaste famille, ABCA1 exerce un rôle clé dans le métabolisme lipidique. La découverte de mutations dans le gène *abca1* chez des familles de patients atteints de la maladie de Tangier a permis d'identifier son rôle prédominant dans le métabolisme du cholestérol (333). Le traitement de macrophages humains par du 22(R)-hydroxy-cholestérol ou de l'acide 9-*cis* rétinoïque active l'expression d'*abca1* (334). *In vivo*, cette régulation, présente au niveau des macrophages et de l'intestin grêle chez les souris sauvages, est abolie chez les souris *lxr*$\alpha;\beta^{-/-}$ (335). De plus, alors que chez des souris sauvages le T0901317 inhibe l'absorption intestinale de cholestérol et son accumulation au niveau hépatique, il n'a aucun effet chez les souris *lxr*$\alpha;\beta^{-/-}$. Un régime riche en cholestérol ainsi qu'un traitement par du T0901317 provoquent *in vivo* une augmentation de l'expression des gènes *abcg5* et *abcg8* (336). Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris *lxr*$\alpha;\beta^{-/-}$. Par la suite, d'autres transporteurs de type ABC dont le gène est contrôlé par les LXRs ont été associés au transport inverse du cholestérol, notamment *abcg1* (337) et *abcg4* (338).

Les apolipoprotéines sont, pour rappel, des protéines permettant la prise en charge des lipides dans la circulation sanguine. Les gènes codant les apolipoprotéines APO E/CI/CII/CIV, qui entrent dans le composition des HDL, sont directement régulés par les LXRs. Cette régulation est abolie chez les souris *lxr*$\alpha;\beta^{-/-}$ (339, 340). Les LXRs stimulent donc le retour hépatique du cholestérol *via* les HDL (pour revue lire (341)).

---

*Au total, par **1)** la stimulation à la fois de l'export cellulaire du cholestérol intracellulaire et de son retour hépatique et **2)** l'inhibition de sa synthèse endogène et de son captage sous forme de LDL, les LXRs permettent le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Le rôle hypocholestérolémiant des LXRs est le plus étudié et tous les efforts des compagnies pharmaceutiques visent à activer de manière sélective cette fonction.*

III. Conclusion et projet de recherche

En France, le cancer de la prostate est une pathologie de l'homme âgé qui représente le premier cancer en terme d'incidence et la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme. Son incidence varie énormément selon les pays concernés et les nombreux facteurs impliqués dans le cancer de la prostate rendent son étiologie complexe.

D'un coté, il existe des composantes génétiques (Figure 38) que l'on peut néanmoins qualifier de « mineures » puisqu'il reste difficile de trouver des polymorphismes génétiques héréditaires associés à une forte pénétrance du cancer de la prostate par rapport à d'autres types de cancers. En revanche l'expression d'un nombre important de gènes est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses de prostate. Ces gènes sont souvent qualifiés d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur et certains d'entre eux sont des régulateurs clés du développement de la prostate. Les études se sont alors concentrées pour trouver l'origine de ces dérégulations encore non élucidée pour la plupart de ces gènes.

Depuis quelques années l'attention se porte de plus en plus sur l'étude de certains acteurs épigénétiques capables de participer au contrôle de l'expression des gènes par remodelage de la chromatine. Ces acteurs sont responsables de la mise en place, notamment au cours des processus développementaux, et de la conservation des empreintes épigénétiques qui sont fondamentales pour le maintien de l'intégrité prostatique à l'âge adulte. Une activité anormale d'un ou de plusieurs de ces acteurs entraîne des modifications d'empreintes épigénétiques et ainsi un profil d'expression génique anormal pouvant être associé à la carcinogenèse. Dans le cancer de la prostate, on retrouve ainsi une forte expression/activité de l'ADN méthyl-transférase DNMT1 et de l'histone méthyle transférase EZH2 associée à la répression d'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs verrouillés par hyperméthylation.

La question se pose donc alors de comprendre quels sont les facteurs liés aux changements d'expression/activité de ces acteurs épigénétiques. Parmi ces facteurs, de plus en plus d'études montrent la capacité de la composante environnementale et nutritionnelle à modifier les empreintes épigénétiques, ce qui constitue une piste intéressante au vu de l'augmentation croissante des données qui révèlent l'impact de ces facteurs sur le risque de développement du cancer de la prostate.

D'un autre coté, les données accumulées à ce jour permettent de considérer la consommation de lipides et notamment de cholestérol comme un élément à risque dans le cadre du développement du cancer de la prostate et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les études épidémiologiques montrent 1) que la forte incidence du cancer de la prostate observée dans les pays occidentaux peut, en partie, s'expliquer par la nature des régimes alimentaires riches en cholestérol par rapport aux pays

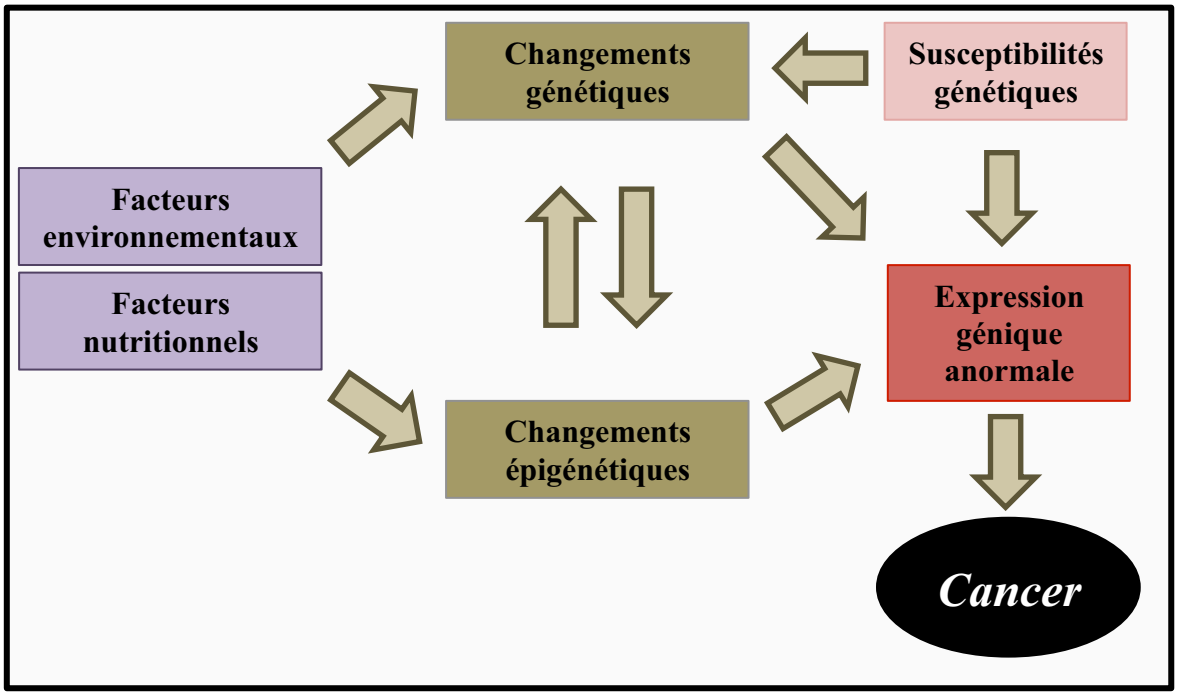


Figure 38 : Impact des altérations génétiques et épigénétiques par des facteurs environnementaux et nutritionnels sur le développement du cancer. Les changements d'expression de gènes observés dans les cellules cancéreuses peuvent être le résultats de diverses causes telles que des changements génétiques somatiques ou hérités et des dérégulations épigénétiques. Certains facteurs environnementaux et nutritionnels sont potentiellement capables de modifier l'expression des gènes impliqués dans le cancer *via* ces changements génétiques et épigénétiques.

asiatiques très peu touchés par ce cancer ; 2) la prise d'agents hypocholestérolémiants comme les statines est associée à une diminution du risque de développer un cancer agressif de la prostate. Ensuite, les études fondamentales révèlent que le cholestérol s'accumule fortement dans les cellules tumorales. Ce stockage résulte de différents dérèglements d'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et favorise la croissance tumorale observée dans des modèles de culture cellulaire et de xénogreffe.

En parallèle, ces dernières années ont confirmé le rôle fondamental des LXRs « senseurs » du cholestérol intracellulaire en agissant comme « soupape de sécurité » vis-à-vis de l'excès en cholestérol.

Dans ce contexte (Figure 38), nous nous sommes posé plusieurs questions faisant l'objet de deux projets de recherche menés au cours de ma thèse et qui sont présentés dans les chapitres I (page 67) et II (page 86) suivants :

1) Le cholestérol est-il un facteur impliqué dans l'initiation et la progression tumorale *via* des mécanismes mettant en jeu la modification d'empreintes épigénétiques au niveau de la prostate ? Quel rôle pour LXR ?

Pour cela nous avons caractérisé le phénotype prostatique des souris *lxrα;β-/-* nourries avec un régime riche en cholestérol. Les résultats montrent que la forte accumulation de cholestérol observée dans la prostate de ces animaux est associée à une augmentation d'expression de l'histone méthyle transférase EZH2 responsable de la répression de certains gènes suppresseurs de tumeur. Cet effet « épimutagène » du cholestérol conduirait à l'hyperprolifération des cellules épithéliales prostatiques et ainsi à la formation de néoplasie, signe précoce de développement tumoral. L'expression des LXRs dans un fond génétique sauvage s'oppose à l'accumulation de cholestérol et prévient l'initiation du développement tumoral suggérant donc un rôle protecteur des LXRs vis-à-vis de ce type de pathologie.

2) Les LXRs peuvent-ils moduler la croissance des cellules tumorales prostatiques?

Pour cela nous avons utilisé des cellules cancéreuses humaines en culture et un modèle *in vivo* de xénogreffes en souris *Nude* afin de mimer au mieux le contexte tumoral. L'activation pharmacologique des LXRs par un agoniste synthétique (T0901317) diminue la quantité de cholestérol intratumoral *via* une activation de ABCG1 et inhibe le développement de la croissance tumorale. En culture de cellules nous avons montré que cette chute de cholestérol intracellulaire réduit la taille des *rafts* lipidiques et diminue ainsi la signalisation AKT, capitale pour la survie cellulaire. Au final, par

ce mécanisme, l'activation des LXRs entraîne la mort des cellules tumorales et ralentit leur progression. Ces donnés appuient ainsi le rôle délétère du cholestérol dans les mécanismes tumoraux et permettent d'envisager les LXRs comme cibles thérapeutiques dans le cadre du cancer de la prostate.

Résultats

Chapitre I :

Le cholestérol est-il un facteur impliqué dans l'initiation et la progression tumorale via *des mécanismes épigénétiques au niveau de la prostate ? Quel rôle pour LXR ?*

Présentation du contexte scientifique

Les données bibliographiques montrent une association entre les niveaux de cholestérol circulants et le risque de cancer de la prostate. D'un côté, l'augmentation des taux de LDL plasmatique semble favoriser le risque de développer des tumeurs de hauts grades (260). A l'inverse, une faible cholestérolémie est associée à une réduction du risque de cancers avancés (score de Gleason 8-10) (261). De plus, des études rétrospectives montrent que des patients traités par des statines dans le cadre de maladies cardio-vasculaires présentent une diminution du risque de développer un cancer de la prostate de haut grade (263, 264).

Plusieurs arguments expérimentaux permettent de considérer le cholestérol comme un agent favorisant le développement tumoral. En effet, un régime riche en cholestérol favorise la croissance tumorale en modèle de xénogreffes en inhibant la mort cellulaire par apoptose *via* des mécanismes impliquant les *rafts* lipidiques (276). A l'inverse, le traitement de cellules tumorales en culture par des statines, agents hypocholestérolémiants, favorise la mort cellulaire (276). A ce jour, toutes ces études ont été réalisées sur des modèles *in vitro,* ou en xénogreffes sur des souris *Nude,* de cellules prostatiques déjà tumorales. L'utilisation de ces modèles permet d'évaluer les effets du cholestérol uniquement sur la progression tumorale et non sur des évènements plus précoces tels que l'initiation ou la promotion du cancer. L'impact du cholestérol sur les stades précoces de développement tumoral reste donc inconnu.

En parallèle, le développement tumoral prostatique est associé à des changements d'ordre métabolique notamment au niveau de l'homéostasie du cholestérol. En effet, plusieurs dérégulations qui incluent une entrée incontrôlée de LDL associée à la perte des mécanismes régulateurs de LDLR (247) ou une augmentation d'expression des enzymes de la synthèse endogène de cholestérol (271), pourraient être responsables d'une accumulation de cholestérol intracellulaire dans les tumeurs (267, 268). Puisque le cholestérol est un élément constitutif important des membranes plasmiques, ces changements métaboliques peuvent être considérés comme de simples conséquences d'importants besoins en cholestérol pour la synthèse des membranes lors de la division des cellules tumorales. En revanche, aucun argument ne permet d'exclure que la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol soit un événement précoce, voire causal, dans l'initiation et la progression du cancer.

Puisque les LXRs sont capables de contrôler les voies de synthèse et d'entrée du cholestérol dans les cellules, nous avons voulu étudier l'impact d'un régime riche en cholestérol sur la physiopathologie prostatique de souris invalidées pour les LXRs.

Article 1: Intracellular cholesterol overload induced by diet upregulates *ezh2* expression and initates prostate cancer development.

Article en cours de préparation.

Intracellular cholesterol overload induced by diet upregulates *ezh2* expression and initiates prostate cancer development

AJC Pommier[1,2,3] *et al.*

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France; [2]CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 AUBIERE, France; [3]Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

Abstract

Prostate cancer progression is correlated with various metabolic homeostasis deregulations associated *inter alia* to cholesterol accumulation within the tumor cells. Several evidences, performed to date only on tumor cell models, strongly suggest that cholesterol could promote prostate cancer progression. However, whether cholesterol is able to initiate prostate cancer remains unknown. Deregulated pathways leading to cholesterol accumulation within the cells involve several enzymes controled by the nuclear receptors LXR (liver X receptors). Thus, given this key regulator action of LXRs in cholesterol homeostasis, we analyzed effect of cholesterol enriched diet on the non tumoral prostate of *lxr-/-* mice. *Lxr-/-* mouse fed a high cholesterol diet accumulate cholesterol in prostatic cells leads to a neoplasic phenotype associated to: 1) high proliferation level of prostate epithelial cells, 2) gene expression pattern similar to prostate cancer cells, 3) overexpression of the histone methyltransferase EZH2 and 4) repression expression of its downstream target *nkx3.1* and *msmb* tumor suppressor genes. In addition, human prostate cancer PC3 cells reveal an increase of *ezh2* expression level and proliferation rate when exposed to LDL cholesterol. We conclude that cholesterol accumulation increases repression activity of EZH2 leading to the repression of *nkx3.1* and *msmb* tumor suppressor genes. Consequently, prostatic cells loss regulation of proliferation thus promoting the development of neoplasia. These data demonstrate for the first time that cholesterol is able to induce prostate cancer initiation *in vivo* and promote prostate cancer progression *in vitro* through mechanisms involving epigenetic modifications. Thus, high amount of intracellular cholesterol observed in solid human tumors could be an early event in carcinogenesis by stimulation of *ezh2* expression, found highly overexpressed in human prostate cancer.

Keywords: Cholesterol, LXR, EZH2, prostate cancer, tumor suppressor, epigenetic.

Introduction

Among the various environmental risk factors found abundantly in western lifestyle associated with the occurrence of many diseases such as obesity, cardiovascular diseases or cancer, epidemiological analyses revealed a correlation between high lipid consumption and incidence of prostate cancer. Recent clinical and fundamental evidences point out the effect of cholesterol in favor of tumor progression. While hypercholesterolemia is associated with an increased risk of advanced prostate cancers (1, 2), patients treated for cardio-vascular disorders with hypocholesterolemic agents such as statins exhibit a lower risk of aggressive prostate cancer (3). Furthermore, high cholesterol diet increases tumor growth in LNCaP xenograft model whereas statin exposure leads to LNCaP cell death (4). These are consistent with previous observations that showed high cholesterol content in solid tumors and benign prostate hypertrophy (5, 6). Cholesterol accumulation within cells may be the result of several deregulations in cholesterol homeostasis such as a high synthesis level through mevalonate pathway, low reverse transport and increase of cholesterol uptake by tumor cells. In plasma , cholesterol is transported as low density lipoprotein (LDL) to peripheral tissues where uptake is mediated through LDL receptor (LDLR). Previous studies showed that aggressive prostate cancer cells present an absence of feedback regulatory system to control LDL uptake by LDLR (7) and suggest that high intracellular level of cholesterol could be involved in aggressiveness of tumor cells. However, cholesterol accumulation could be considered as a simple consequence of high proliferation rate level of the cells that require new component to build *de novo* plasma membrane. Thus association between cholesterol and cancer progression is still debated and mechanisms potentially involved are not completely understood. Moreover, whether cholesterol accumulation within cells is an early event in cancer development that

Address correspondence to: Dr Silvère Baron, "Génétique Reproduction et Développement", UMR CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France
Phone: (33) 4 7340 7412; Fax: (33) 4 7340 7042
E-mail: Silvere.BARON@univ-bpclermont.fr

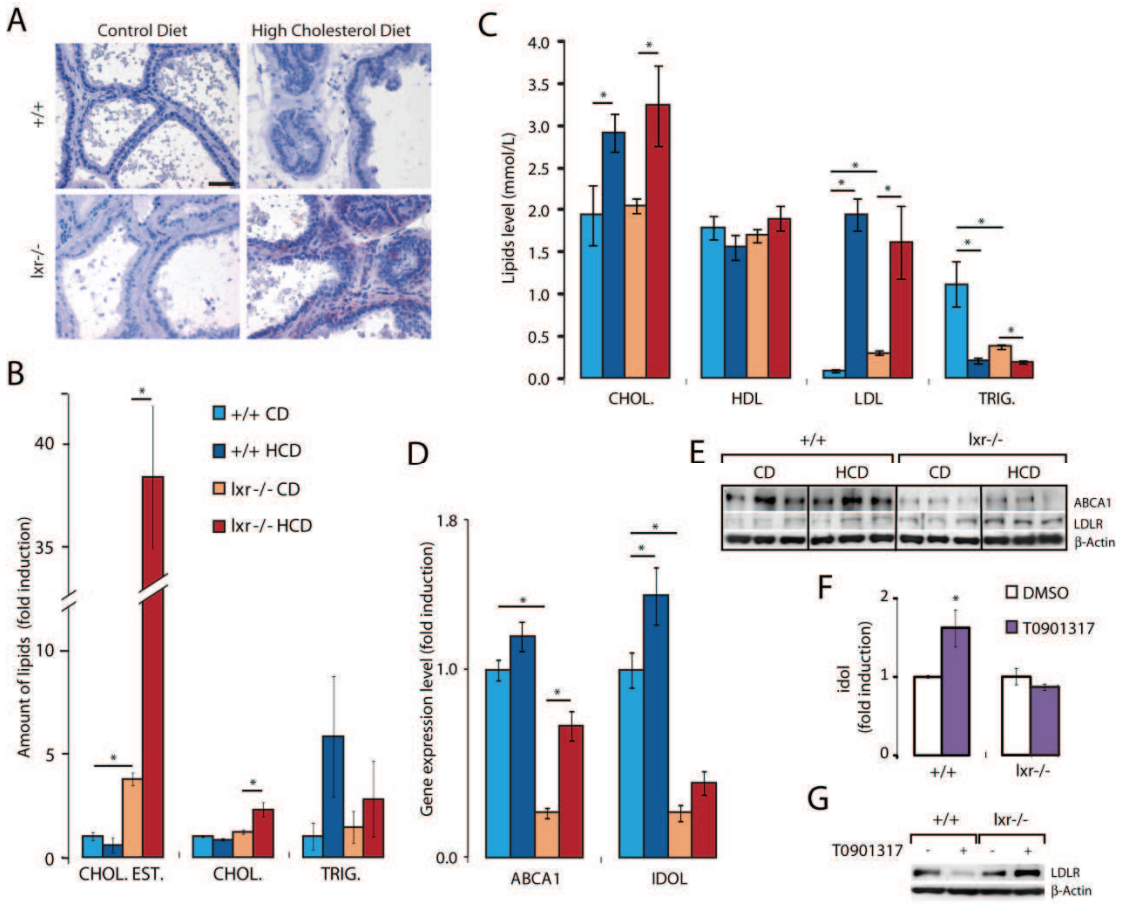


Figure 1: High cholesterol diet induces cholesterol ester accumulation in prostate of *lxr-/-* mice. 5 month wild type and *lxr-/-* mice were fed either a Control Diet (CD) or a High Cholesterol Diet (HCD) for 5 weeks. Neutral lipid accumulation in latero-dorsal prostates was observed after Oil-Red-O coloration (A) and lipids were quantified by thin layer chromatography (n=3 per group) (B). (C) Plasma concentrations of triglycerides (TRIG.), cholesterol (CHOL.), LDL-cholesterol and HDL-cholesterol were determined (n=9 to 13 per group). (D-E) ABCA1, IDOL and LDLR levels were determined by quantitative RT-PCR (n=9 to 13 per group) and/or Western blot analysis. Wild type and *lxr-/-* Murine Prostatic Epithelial (MPE) cells were treated by 10 µM of T0901317 or vehicle (DMSO) for 24 hrs (n=3 per group). *Idol* expression was analyzed by quantitative RT-PCR (F) and LDLR accumulation by western blot (G). Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05. Scale bar = 50µm.

could initiate carcinogenesis is still unknown.

Zelcer et *al*. published that regulation of cholesterol uptake by LDLR is controled by molecular pathway involving liver X receptors (LXR) known to play a crucial role in cholesterol homeostasis (8). LXRα (NR1H3) and LXRβ (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily and bind to naturally occurring oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols (9, 10). Interestingly, previous works showed that pharmacological LXR activation leads to tumor growth reduction in xenograft model by both inhibition of proliferation (11) and induction of cell apoptosis (12). LXR stimulation activates cholesterol reverse transport *via* upregulation of ABCG1 expression resulting in a low cholesterol level within tumor cells. These data support previous observations that cholesterol can be involved in prostate cancer progression (13) and suggest a crucial impact of LXR pathway on deleterious effects of cholesterol.

Given that, we analyzed in this study the effect of a cholesterol rich diet on wild type and *lxr-/-* mice prostates in order to deepen the role of cholesterol and LXR in the physiopathology of prostate gland. High cholesterol content was observed in prostate of *lxr-/-* mice fed a cholesterol rich diet leads to the upregulation of the histone methyltransferase *ezh2* expression and neoplasic phenotype associated to gene expression pattern similar to cancer cell signature. Functional LXR in wild type mice protect from cholesterol accumulation in prostatic cells and prevent prostatic neoplasm induced by cholesterol rich diet through mechanism involving regulation of uptake and efflux of cholesterol.

Results

Mice lacking LXR showed LDLR-IDOL pathway defects and ABCA1 expression deregulation leading to cholesterol accumulation in prostate

Most of recent publications underline the role of cholesterol both in prostate cancer risk and prostate cancer progression. Given that LXRs act as central sensors of intracellular cholesterol, we investigated potential phenotype in latero-dorsal prostate of *lxr-/-*

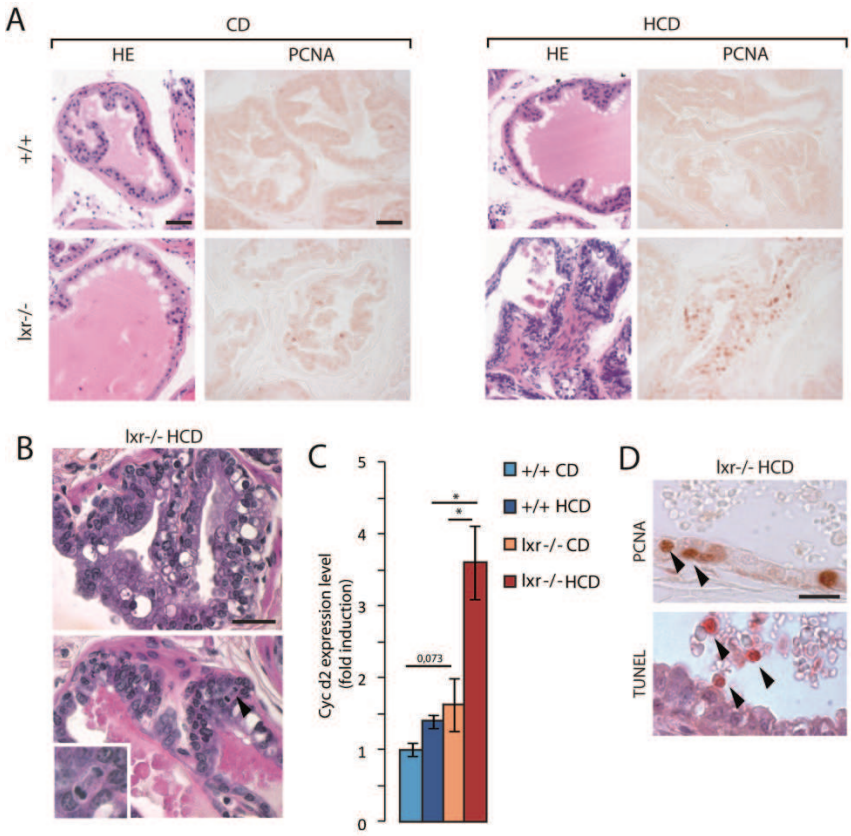


Figure 2: High cholesterol content in *lxr-/-* mice prostate results in abnormal increase of epithelial cell proliferation rate associated with epithelium neoplasic phenotype. (A) Tissue architecture and proliferative cell nuclei were analyzed by Hematoxyline/Eosine (H&E) and PCNA immuno staining respectively. Scale bar = 50µm. (B) Magnification of prostate epithelium of *lxr-/-* mice fed a HCD. Head arrow indicates mitotic cell, scale bar = 25µm. (C) RT-PCR quantitative of *cyclin D2* expression was performed to quantify proliferation rising (n=9 to 13 per group). (D) Magnification of proliferative (PCNA) and apoptotic nuclei (TUNEL), indicated by head arrows, in prostate of *lxr-/-* mice fed a HCD. Scale bar = 10µm. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05

mice fed either control (CD) or high cholesterol diet (HCD). Positive Oil Red O staining indicates high level of neutral lipids in prostate of *lxr-/-* mice only when fed a HCD (Fig 1A). Qualitative analyze by thin layer chromatography reveals a slight accumulation of cholesterol esters in prostate of *lxr-/-* mice, which is largely amplified under HCD (Fig 1B). While HCD induces an increase of cholesterol (especially LDL cholesterol) in both *lxr-/-* and wild type mouse plasma (Fig 1C), prostates from wild type mice do not accumulate cholesterol suggesting that *lxr-/-* mouse prostate present an aberrant LDL-cholesterol uptake activity and cholesterol storage. In one hand, expression of the recent novel LXR target gene *idol* (8), encoding an ubiquitin ligase that triggers LDLR to proteasome degradation, is strongly downregulated in *lxr-/-* mice prostate and does not respond to the HCD (Fig 1 D). Conversely upregulation of *idol* by LXR in wild type mice prostate fed a HCD allows regulation of LDLR protein level that remains stable (Fig 1E). Thus, absence of *idol* regulation leads to high level of LDLR protein level and increase of LDL-cholesterol uptake in *lxr-/-* mice prostate fed a HCD (Fig 1E). In the other hand, western blot analysis reveals that ABCA1 protein level is lower in *lxr-/-* than wild type control mouse prostate even in HCD condition despite the increase of *abca1* mRNA (Fig 1D-E). These data clearly indicate that the lack of *idol* and *abca1* expression control in *lxr-/-* prostatic cells make them unable to manage high cholesterol exposure leading to aberrant LDL uptake and high cholesterol storage. Using mouse epithelial cells derived from mouse prostate explants (MPE), we demonstrated that LXR-IDOL-LDLR pathway is functional in prostatic cells as the synthetic LXR agonist T0901317 induces *idol* expression and, consequently, decreases LDLR protein accumulation in wild type cells (Fig 1F-G). This cholesterol regulation feedback is completely abolished in *lxr-/-* MPE demonstrating a LXR dependant mechanism (Fig 1F-G). Taken together, these results show that latero-dorsal prostate of *lxr-/-* mice fed a high cholesterol diet exhibits a strong deregulation of intracellular cholesterol homeostasis leading to abnormal accumulation of cholesterol esters.

Intracholesterol accumulation is associated to prostatic neoplasia phenotype and cancer molecular signature

In order to investigate the effects of cholesterol accumulation on tissue architecture, we performed histological analysis on mouse prostate by H&E staining. *Lxr-/-* mouse latero-dorsal prostates

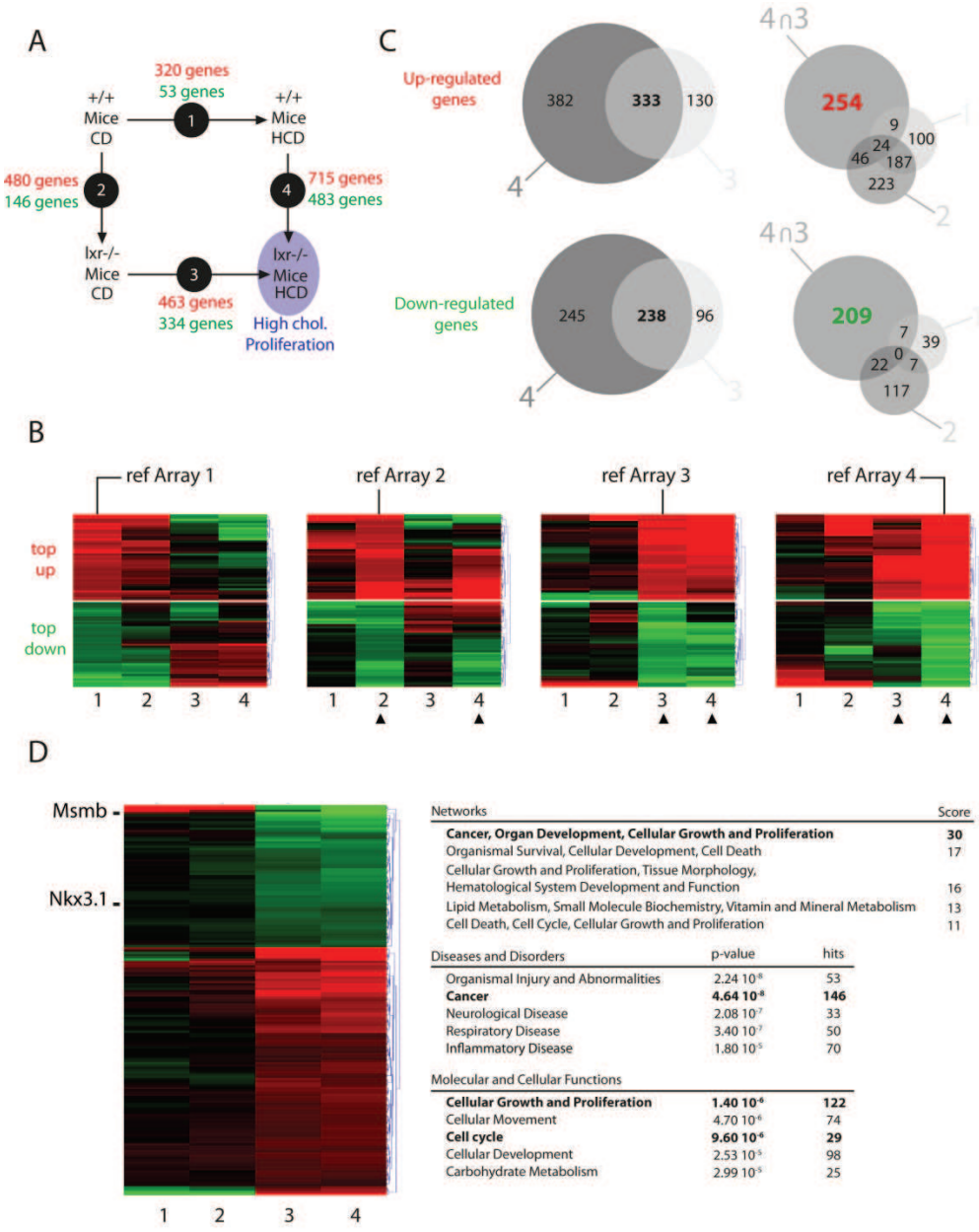


Figure 3: Transcriptome profiling reveals gene expression pattern similar cancer signature in prostate of *lxr-/-* mice fed a HCD. (A) Comparison of prostate gene expression pattern between wild type and *lxr-/-* mice fed or not a HCD was performed using Agilent microarray approach. Arrays 1 and 3 reveal genes deregulated by high cholesterol diet in wild type and *lxr-/-* prostate mice respectively. Arrays 2 and 4 exhibit genes deregulated by the absence of LXR whatever the diet was (B) Change in gene expression of 40 top up (red) and down (green) regulated genes of each array were compared by hierarchical clustering to other arrays. (C) Using Venn diagram approach we focused on common deregulated genes only between arrays 3 and 4 that were not deregulated in arrays 1 and 2 (254 up and 209 down), representing gene involved in neoplasic phenotype. (D) Gene ontology allowed to identify cancer, organ development, cellular growth and proliferation as top networks and to focus on target genes deregulated in prostate of HCD fed *lxr -/-* mice involved in these mechanisms.

reveal a massive destructuration of the epithelial layer characterized by dysplasia, hyperplasia signs and the presence of mitosis figures in epithelium (Fig 2A-B) suggesting the presence of proliferation and cell death. We performed PCNA staining in order to evaluate proliferation rate and neoplasia development. Immunohistochemistry reveals that *lxr-/-* mouse epithelium under HCD exhibit a large number of proliferative PCNA stained nuclei. Quantification of *cyclin d2* expression level confirmed increase of proliferation level in prostate of *lxr-/-* mouse fed a HCD compare to those fed a CD or to wild type mouse (Fig 2C). TUNEL experiments showed the presence of apoptotic nuclei in prostatic lumen of *lxr-/-* HCD fed mice that seem to emerge from epithelium. Abse nce of apoptotic positive nuclei directly into the epithelium suggests that high proliferation rate leads to cell detachment from epithelium and cell death in lumen thereafter (Fig 2D; Supplementary data 1).

To identify the molecular pathways deregulated by high cholesterol content in prostate leading to epithelial cell hyperproliferation, transcriptome analysis between each genotype and each diet condition was performed (Fig 3A). Arrays 1 and 3 reveal genes deregulated by high cholesterol

diet in wild type and *lxr-/-* prostate mice respectively. Arrays 2 and 4 exhibit genes deregulated by the absence of LXR whatever the diet was. 320 up and 53 down "diet effect" genes are deregulated by HCD in wild type mice prostate versus 463 up and 334 down in *lxr-/-*. 480 up and 146 down "genotype effect" genes are deregulated by the lack of LXR in mice prostate of CD group versus 715 up and 483 down in HCD group. Next, we compared gene expression pattern of 40 top up and down deregulated genes of each array by hierarchical clustering analysis. Interestingly, the pictures obtained showed high similarity of deregulated gene expression profile between arrays 3 and 4 that correspond to conditions leading to neoplasic phenotype in "high cholesterol prostate" (Fig 3B). These common genes between arrays 3 and 4 were considered as "phenotype genes". Another similarity was observed between arrays 2 and 4 when the 40 top genes of array 2 were compared to other arrays (Fig 3B). These genes typically correspond to genes deregulated by "genotype effect". Given the fact that the lack of LXR only (array 2), or HCD in wild type mice (array 1) do not impair neither cholesterol content nor prostate histology, we postulated that genes deregulated in these arrays were not involved in neoplasia development. Thus we performed Venn diagram approach to exclude the "genotype effect" genes deregulated in array 2, and the "diet effect" genes deregulated in array 1, from the "phenotype gene" list commonly deregulated in arrays 3 and 4 (Fig 3C). By this method, we identified and clusterized a set of 254 up and 209 down deregulated genes closely related to the phenotype (Fig 3 C-D). We next used the Ingenuity software to identify relevant networks and functions in which these genes could be involved. Cancer was strongly pointed out by gene ontology analysis with a high p-value in both "networks" and "diseases and disorders" lists (Fig 3D). Moreover, "cellular growth and proliferation" and "cell cycle" appeared in top significant molecular and cellular function. Examination of gene identity in the cancer cluster (Supplementary data 2) leads us to focus on two important tumor suppressor genes in prostate cancer, *nkx3.1* and *msmb*. Down regulation of *nkx3.1* and *msmb* expression observed on microarray was confirmed by qPCR analysis (Fig 4A). Because downregulation of key suppressor genes seems to be a master event in proliferation deregulation, we examined *in vivo* epithelial proliferative cells for NKX3.1 level in *lxr-/-* mouse prostate fed a HCD. IHC co-staining against NKX3.1 and mKi67 reveals that proliferative cells harbour less nuclear accumulation of NKX3.1 (Fig4B).

Ezh2 expression is sensitive to high cholesterol cell contents and repress expression of nkx3.1 and msmb *in* lxr-/- *mice prostate*

Individual qPCR data analysis of *nkx3.1* and *msmb* gene expression profile in prostate of *lxr-/-* mice fed a HCD, revealed that both gene expression

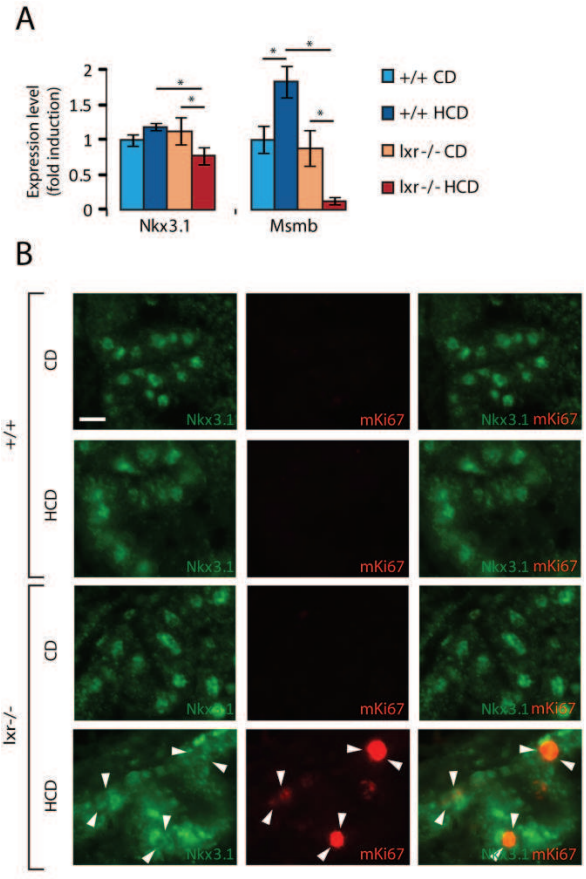


Figure 4: *Nkx3.1* and *msmb* tumor suppressor genes are down regulated in prostate that accumulates high cholesterol level. (A) *Nkx3.1* and *msmb* expression was analyzed by RT-PCR quantitative. (B) mKi67 and NKX3.1 coimmuno-staining reveals the loss of *nkx3.1* expression in proliferative cell nuclei. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05. Scale bar = 10µm.

exhibited a significant correlation indicating that they were probably co-regulated (Fig 5A). Recent data demonstrated that *nkx3.1* and *msmb* gene are transcriptionnaly repressed by the histone methyltransferase EZH2. EZH2 is the major enzyme that trimethylates lysine-27 of histone H3 (H3-K27) in Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) leading to the inactivation of targeted genes. We investigated the potential involvement of EZH2 in the downregulation of *nkx3.1* and *msmb* gene expression. Western blot and RT-qPCR reveal overexpression of *ezh2* in the "high cholesterol prostate". Moreover, individual data analysis demonstrated that upregulation of *ezh2* expression is closely correlated to *nkx3.1* and *msmb* repression level (Fig 5B). These results strongly suggest that *ezh2* overexpression inhibits *nkx3.1* and *msmb* expression by H3K27me3 imprinting on their promoter in *lxr-/-* mice fed with a HCD.

To exclude the effect of HCD on paracrine factors from stroma compartment known to be involved in stimulation of epithelial cells *in vivo,* we analyzed the direct effect of serum from *lxr-/-* mice fed either CD or HCD on wild type and *lxr-/-* MPE cells. Serum from mice fed a CD had no effect on

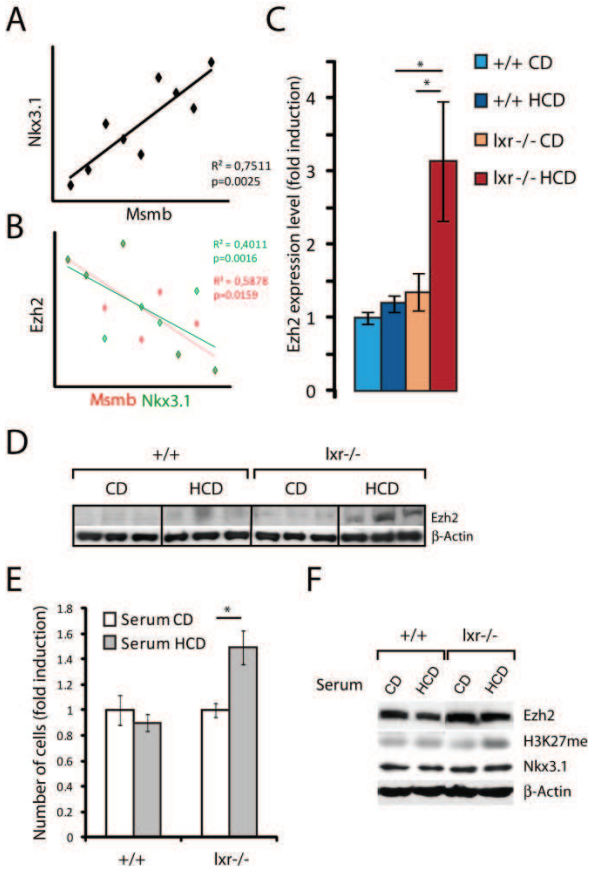


Figure 5: Upregulation of *ezh2* expression is correlated to co-repression of tumor suppressor gene *nkx3.1* and *msmb* in cells exposed to high cholesterol level. (A-B) Analysis of *nkx3.1-msmb* and *ezh2-nkx3.1-msmb* expression correlations was performed using Stat View software and significativity was determined by ANOVA test. (C-D) *Ezh2* expression was analyzed by RT-PCR quantitative (n=9 to 13 per group) and western blot. (E) Wild type and *lxr-/-* MPE were treated for 48 hr with 3% serum from *lxr-/-* mice fed either a control diet (CD) or a high cholesterol diet (HCD) and cell number was determined by flow cytometer analysis (n=3 per group). (F) EZH2, H3K27me3 and NKX3.1 levels were quantified by western blot. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05

MPE cells proliferation whatever the genotype. However, serum from HCD fed *lxr-/-* mice, containing high amount of LDL (Supplementary data 3), stimulated cell proliferation and increased global H3K27 trimethylation in *lxr-/-* MPE only (Fig 5E-F). No effect was observed on wild type cells indicating that, contrarily to *lxr-/-* MPE, LXR controls LDL uptake as demonstrated in Figure 1. Surprisingly, unlike *in vivo* experiment, both NKX3.1 and EZH2 protein accumulation remain unchanged whatever the treatment. We hypothesized that *ezh2* upregulation happened earlier and that the existence of EZH2 feedback regulation makes this deregulation invisible after 48 hrs of treatment. Altogether these results indicate that uncontrolled high LDL uptake in *lxr-/-* epithelial prostatic cells induces increase of proliferation rate associated with deregulation of H3K27me3 imprinting on tumor suppressor genes.

LDL exposure of human PC3 cells results in an increase of proliferation and ezh2 expression

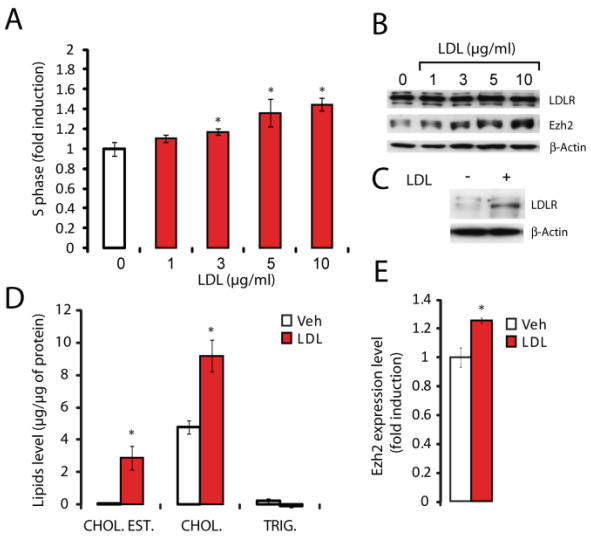


Figure 6: LDL exposure enhances *ezh2* expression level and increases proliferation of PC3 prostate cancer cells. (A) PC3 cells were treated with different doses of native LDL for 48 hr and proliferation was analyzed by quantification of S-phase cell percentage using flow cytometer. LDLR protein accumulation was analyzed by western blot after either a 12 hr at 3µg/ml of LDL (C) or a 48 hr (B) treatment. (B-E) *Ezh2* expression was quantified by western blot and quantitative RT-PCR (3µg/ml of LDL) after 48 hr of treatment. (D) Lipids were quantified by thin layer chromatography in PC3 cells upon 3µg/ml of LDL treatment. For each experiment n=3 per condition. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05

Advanced prostate cancer cells exhibit loss of LDLR feedback regulation mechanism leading, as in *lxr-/-* cells, to a high LDL uptake (7). Given that, we examine whether LDL cholesterol exposure could modulate *ezh2* expression and proliferation in human prostate cancer PC3 cells. Human LDL cholesterol treatment on PC3 cells enhanced S phase entry and leads to an increase of proliferation (Fig 6A). We next investigated *ezh2* expression and found that LDL enhanced its mRNA and protein accumulation (Fig 6B and E). Futhermore, LDLR accumulation is sensitive to LDL treatment (Fig 6C) suggesting that LDL uptake is a key point to enhance *ezh2* expression and stimulate proliferation. Indeed, LDL cholesterol induction results in an increase of intracellular cholesterol levels in PC3 (Fig 6D). These results suggeste that LDL uptake is the initial process involved in proliferation and that, beside its involvement in initiation of tumor development, cholesterol could promote prostate cancer progression by stimulation of *ezh2* expression as well.

The neoplasic phenotype of lxr-/- *fed a high cholesterol diet is reversible after 4 weeks of control diet*

Because histone marks are known to be plastic and particularly reversible, we next investigated whether a recovery period of 4 weeks of CD feeding could abolish the neoplasia phenotype of *lxr-/-* mice

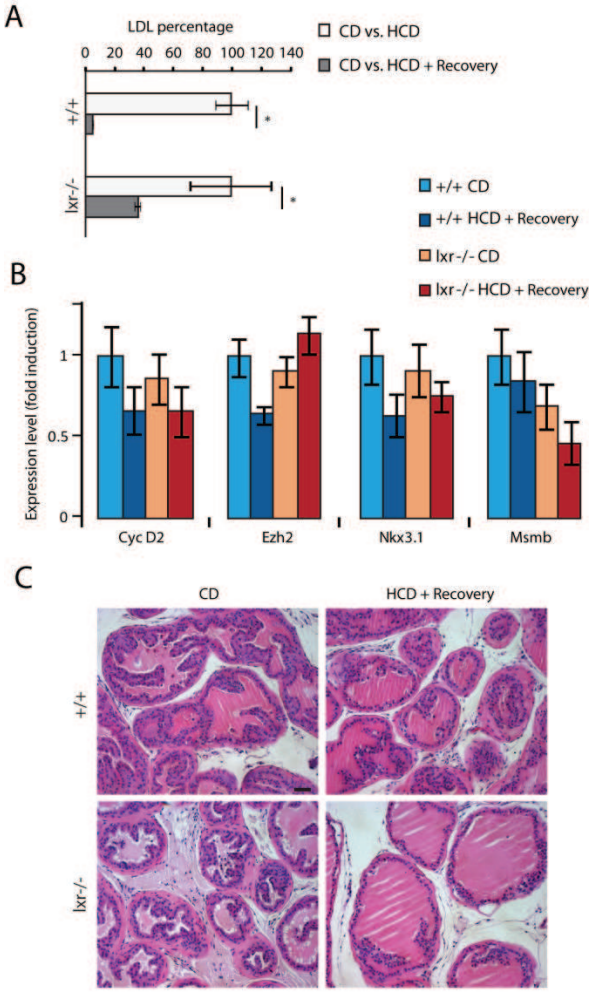


Figure 7: After a 4 week diet recovery ezh2 and tumor suppressor gene expression returns to basal levels, hyperproliferation is abolished and prostate homeostasis appears healthy. (A) Percentage of LDL plasma enrichment in mice fed a CD versus HCD before and after a 4 week recovery period. (B) Gene expression analysis by RT-PCR quantitative (n= 6 to 9 animals per group). (C) Hematoxylin/Eosine staining of dorsal prostate of wild type and *lxr-/-* mice fed for 4 weeks with control diet (recovery) after 5 weeks of control (CD) or high cholesterol diet (HCD). Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05 Scale bar = 25µm.

fed a the HCD for 5 weeks. Plasma lipid analysis revealed that 4 weeks of CD feeding were sufficient to restore physiological cholesterolemia, even if the diminution was slightly lower in *lxr-/-* (60%) than wild type mice (90%) (Fig 7A). Expression of *ezh2* and its downstream target genes *nkx3.1* and *msmb,* returned to a basal level after recovery period (Fig 7B). As shown by *cyclin D2* expression, epithelial cell hyperproliferation observed after 5 weeks of HCD feeding in *lxr-/-* mouse is completely abolished after 4 weeks of CD recovery (Fig 7B). Finally, histological analyses showed similar features between wild-type and *lxr-/-* whatever the treatments (Fig 7C). These observations indicate that the phenotype of neoplasia is completely reversible when cholesterolemia returns to a basal level.

Discussion

Alterations of epigenetic marks are extensively studies in human prostate cancer. Nevertheless, environmental factors causing these events and molecular mechanisms involved remain largely unknown. Dietary factors, especially lipids, are strongly suspected to affect cancer incidence. Epidemiological studies suggest that high levels of LDL increase cancer incidence. Case-control study reveals that high LDL cholesterol in plasma was associated with 60% increased risk for prostate cancer (2). These data pointed out that LDL exposition could affect both cancer risk and progression. Interestingly, high intra-cellular cholesterol levels are observed in several solid carcinoma (5, 6). It is well known that tumor cells exhibit cholesterol homeostasis deregulation such as a high *de novo* synthesis or a high LDL uptake that could explain their cholesterol accumulation (14, 15). These deregulations could be the simple consequence of high cholesterol necessary to sustain growth, proliferation and resistance against apoptosis (4). Until now, whether cholesterol homeostasis deregulation is involved in tumor development is unknown. Here we demonstrate for the first time that cholesterol accumulation is able to initiate mechanisms involved in tumor development *in vivo.* Indeed, *lxr-/-*transgenic mice exhibited cholesterol metabolism deregulation resulting in prostate cholesterol accumulation provide useful model to investigate the link between circulating cholesterol and cancer. When these mice are fed a high cholesterol diet, the lack of *idol* and *abca1* genes expression regulation by LXR leads to high LDL uptake and low HDL reverse transport responsible of cholesterol accumulation within the prostate epithelial cells. Associated with results showing high proliferation of prostate overloaded in cholesterol, these data indicate that cholesterol storage deregulation, observed in human cancer cells as well, could be sufficient to deregulate epithelial cell cycle. Interestingly, even when fed a control diet, *lxr-/-* mouse present a slight higher amount of cholesterol and cholesterol ester in prostate than wild type mouse. These observations are associated to a weak increase of *cyclin d2* expression. Nevertheless, we failed to show a significant increase of cell proliferation, neither in latero-dorsal nor in ventral prostate (data not shown) of *lxr-/-* mice observed by Kim *et al.* in the ventral prostate (16). The differences in analysis methods or in genetic background between the two *lxr-/-* mouse strains could explain this discrepancy. Besides, hypertriglyceridemia has also been shown to be a risk factor for prostate cancer (17, 18). Indeed, circulating fatty acid such as remnant lipoproteins has been reported to enhance tumor cell growth (19). Here, we show that the high cholesterol diet feeding on *lxr-/-* mice results in a decrease of circulating triglycerides that exclude hypertriglyceridemia to be involved in the neoplasic phenotype. Beyond

plasmatic fatty acids, numerous studies pointed *de novo* lipogenesis in carcinogenesis process (20). Here again we have not observed any variation in triglyceride amount, neither between wild type and *lxr-/-* mice prostate fed a HCD, nor in PC3 cells exposed to LDL. Thus the neoplasic phenotype results essentially from cholesterol overload in prostatic epithelial cell. Moreover, our conclusions are consistent with experimental studies demonstrated that statins, an inhibitor of cholesterol synthesis, inhibit growth of prostate cancer cells *in vitro* or in xenografts models (4). Also, retrospective analysis clearly highlights a reduction of advanced prostate cancer risk in long term statins users (21, 22). Taken together, these observations point out cholesterol as a central actor in carcinogenesis initiation, promotion and aggressiveness.

Molecular mechanism resulting from chronic cell exposition to high levels of circulating cholesterol *in vivo* remains elusive. Here, we took the advantage of the *lxr-/-* mice model exhibiting genetic susceptibility for cholesterol accumulation in prostate. We observed that *lxr-/-* mice fed a high cholesterol diet develop neoplasic epithelium with a strong dysplasia and harbor a transcriptome signature of prostate cancer. In these mice, correlation analysis showed that the downregulation of tumor suppressor genes *nkx3.1* and *msmb* are closely coregulated with the overexpression of *ezh2.* In human*,* the histone methyltransferase EZH2 was scored as the most significant up-regulated gene in metastatic prostate cancer (23). Functional studies allow to consider EZH2 as an oncogene like protein that alters the genomic expression program by chromatin hypersilencing. Indeed, *ezh2* overexpression induces cell proliferation and enhances tumor growth *in vitro* (23, 24). Conversely, inhibition of EZH2 blocks cell cycle, reduces tumor growth and decreases metastasis formation (23, 25). *Msmb* and *nkx3.1* promoters are known to be directly targeted by EZH2 (26, 27). NKX3.1 was extensively studied in prostate cancer since it was identified in locus 8p21, a chromosomic region frequently deleted in prostate carcinoma (28). Invalidation of *nkx3.1* is sufficient to induce prostatic intraneoplasia in mouse (29) demonstrating its crucial role of tumor suppressor gene. *Msmb* encodes the prostatic secretory protein of 94 amino acids (PSP94) that is secreted in prostate lumen and functions as a suppressor of tumor growth and metastasis (26). Altogether, these data strongly support that *ezh2* overexpression could be the *primum movens* of hyperproliferation induction observed in prostate cells of *lxr-/-* mice or in PC3 cells exposed to LDL, in part *via* the repression of *Msmb* and *nkx3.1* expression.

The reversibility of the phenotype, observed after 4 weeks of CD recovery can be interpreted in two different ways. Firstly, the return to a control level of *nkx3.1* and *msmb* expression with the abolishment of *ezh2* overexpression could indicate that H3K27me3 repressive mark is reversible which is consistent with literature (30). In this case, when cholesterol level turns back to the control level, proliferative cells do not transmit it transcriptional memory to their daughter cells excluding thereby the involvement of highly repressive and heritable epigenetic system such as DNA methylation, known to interplay with PRC2 complex (31). Nevertheless, this hypothesis cannot be excluded. Indeed, the increase of apoptotic nuclei, observed in the prostates of *lxr-/-* mouse fed a HCD, suggests the existence of protective mechanism leading to neoplasic cell death. In this case, we could hypothesize that, after abolishment of *ezh2* overexpression, all H3K27me3 imprinted proliferative cells were eliminated by apoptose thus explaining the normal expression of *nkx3.1* and *msmb* and the reversion of the neoplasia phenotype.

In all cases, present work raises the question by which molecular mechanism cholesterol accumulation results in *ezh2* upregulation. EZH2 regulation reveals a high complexity regarding literature that describes multiple step of control: transcriptional, posttranscriptional and posttranslational. Three main hypotheses could be evocated to explain *ezh2* overexpression. Firstly, ETS genes have been emerged as central elements in prostate carcinogenesis, especially through translocations rearrangements (i.e. TMPRSS2:ERGa) leading to over-expression of ERG (32, 33). ETS transcription factors ERG, ESE1 and ESE3 have been recently demonstrated to be potent regulator of *ezh2* gene transcription (27). These results propose a link between ETS transcription factors and epigenetic regulation of *nkx3.1* gene expression by EZH2. Secondly, recent publications indicate that *ezh2* overexpression in prostate cancer is tightly correlated with genomic deletion of the locus encoding the microRNA miR-101 (34). Overexpression of miR101 in DU145 prostate carcinoma cells decrease cell invasion and *in vitro* and attenuates DU145 tumor growth in a mouse xenograft model by EZH2 extinction (34). Thirdly, dietary lipids have been already described to suppress expression of EZH2 in breast cancer cells (35). Omega-3 polyunsaturated fatty acids such as EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid) treatment leads to both downregulated EZH2 and decreased H3K27 trimethylation. The authors propose this downregulation involves posttranscriptional mechanisms, proteasome-dependent. Thus, ETS or miR-101 and post translational pathway could be relevant candidates to investigate molecular mechanism underlying *ezh2* overexpression in *lxr-/-* mice fed a HCD.

In summary, this study established cholesterol overload in prostate epithelial cell is associate *in vivo* to deregulation of key epigenetic mechanisms, which control cell homeostasis. Our results link cholesterol cell contents to EZH2

deregulation and its downstream target tumor suppressor genes *nkx3.1* and *msmb*. These observations indicate that to decrease circulating LDL cholesterol could present a preventive dietary intervention to reduce prostate cancer risk. Moreover, our findings suggest that deregulation of cholesterol metabolism leading to abnormal cholesterol storage in prostate could promote the initiation of cancerous lesion. Because cholesterol regulation pathways are deregulated in many other cancers such as breast, colorectal or leukemia (14, 15, 36) our results raise an emerging fundamental question: which role for the key regulators of cholesterol homeostasis, LXR, and their targets genes in *human* cancers?

Material and methods

Mice study

Lxrα and lxrβ double knock-out mice (*lxr-/-*) and their wild-type controls were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and housed in a temperature-controlled room with a 12-h light/dark cycle. Mice were fed *ad libitum* with water and control diet (CD ; Global-diet 2016S) until 5 months of age. Then, mice were fed either a control diet or isocaloric high cholesterol diet (Cocoa butter-diet TD.88051) from Harlan (Gannat, France) for 5 weeks. For recovery protocol, mice were afterwards fed with control diet for 4 weeks before sacrifice. Blood plasma samples were obtained just before necropsy by heart puncture on anesthetized mice. Prostates were removed and were either O.C.T embedded, or fixed in an alcohol, formaldehyde 37% and acetic acid mixture (7.5:2:0.5 ; v/v) and then embedded in paraffin for histological analysis, or were snap-frozen in liquid nitrogen for lipid, protein and RNA analyses. All animals were maintained in a controlled environment and animal care was conducted in compliance with the national standards and policies (C 63 014.19). All experiments were approved by Regional Ethic Committee.

MPE establishment

Culture procedure was derived from methods developed for mouse vas deferent epithelial cells by Manin et *al.(37)*. MPE cells were harvested from the dorsal prostatic lobes from *lxrα;β-/-* mice and their wild-type controls. Dorsal prostatic lobes were obtained from 20- to 30-day-old mice under microscope. Fragments were kept in a sterile phosphate buffer solution (PBS) and minced with a razor blade. Minced tissue was transferred onto cell culture inserts (BD Falcon TM) coated with a thin layer of ECM (Extra Cellular Matrix) gel (Sigma), platted onto 35 mm culture dishes, and cultured in "complete" medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F12 (50:50, GIBCO) supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS) (Biowest ; Nuaillé ; France), cholera toxin (10 ng/ml), epidermal growth factor (5 ng/ml), gentamycin (100 µg/ml), insulin (5 µg/ml), transferin (10 µg/ml), glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), ethanolamine (0.6 µg/ml), cAMP (25 µg/ml), selenium (17.3 ng/ml) and hydrocortisone (10 nM)] at 37°C in a humidified air 5% CO_2 incubator. The ECM was set by incubation at 37°C for 30 min. Growth medium was changed every 2 days. Cells emerging from the explants were mainly epithelial cells. Upon confluency, cells were re-plated in the same conditions at a split ratio of 1:2 until they survived senescence which typically occurred about six passages. After this point, cells were transfer onto 100-mm culture dishes every 3-4 days at a 1:5 to 1:10 split ratio. Studies on MPE cells were performed when cells became homogenously epithelial from 15 to 30 passages.

Cell culture and treatment

MPE cells were trypsinized and seeded at 0.6 x 10^5 in 6-well plates or 3 x 10^5 in 100-mm culture dishes. After 12 hr, cells were starved for 24 hr and treated in minimal medium [(DMEM) /F12 (50:50, GIBCO) supplemented with gentamycin (100 µg/ml), glutamine (2 mM)], with either 10 µM of T0901317 (Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux, France) or vehicle (DMSO) for 24 hr or 3% of serum for 48 hr from *lxrα;β-/-* mice fed either with control or high cholesterol diet.

PC3 cells were cultured at 37°C in 5% CO_2 atmosphere in DMEM medium (Invitrogen) containing 100 µg/ml penicillin and streptomycin supplemented with 10% FBS and 2 mM glutamine. Cells were trypsinized and seeded at 0.8 x 10^5 in 6-well plates or 4 x 10^5 in 100-mm culture dishes. After 12 hr, cells were starved for 24 hrs and treated with native human low density lipoprotein RP-032 (Source Bioscience LifeSciences, Nottingham, UK) in FBS depleted medium for 12 to 48 hr.

Cells were harvested and protein, RNA, lipid extraction or flow cytometry analyses were performed.

Prostate immunostaining/immunofluorescence labeling and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis

Prostate immunostaining was performed as follow: paraffin sections were dewaxed and rehydrated through a graded series of ethanol and double distilled water baths. Tissue sections were incubated in 0.1M citrate buffer (pH 6.0) for 5 min in a microwave at 350 W. Unspecific epitopes were saturated using BSA 1%, FBS 1% diluted in PBS 1X during 30 min at room temperature. PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or NKX3.1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) primary antibodies were diluted in PBS 1X, BSA 0.1% and incubated at 4°C overnight. For PCNA staining, secondary HRP-conjugated antibody (Sigma) was incubated 1 hr at room temperature and revealed using NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). For NKX3.1 and mKi67 co-

immunostaining, secondary Alexa 488 conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen) was incubated 1 hr at room temperature. After PBS washes, the second mKi67 primary antibody diluted in PBS 1X, BSA 0.1% was incubated at 4°C overnight and secondary Alexa 555 conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen) was incubated 1 hr at room temperature. Cell nuclei staining was obtained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml.

Apoptosis nuclei were visualized using TUNEL reaction with 0.3U/µl of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT ; Euromedex, Souffelwegersheim, France), 6.7mM biotin-11-dUTP (Euromedex), 26.7mM dATP (Promega, Charbonnière, France) in TdT buffer for 1 h à 37°C. Positive nuclei were revealed by addition of extravidin coupled alkalin phosphatase and FastRed TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich) substrate for 25 min. Nuclei counter staining was performed using Mayer hematoxylin for 30 sec.

Cross-sectional areas of the prostate were snap using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope and Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Le Pecq, France).

cDNA Microarray analysis and acquisition of data.

Total RNA was isolated using NucleoSpin® RNA II column kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The quantity of each total RNA sample was determined by spectrophotometry and the size distribution was assessed using an Agilent Bioanalyzer. Five hundred ng of total RNA were converted into labeled cDNA using fluorescent nucleotides coupled (either Cy3 or Cy5) and the Low DNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) following the manufacturer's protocol. cDNA quality was check using an Agilent Bioanalyzer. Equal amounts of Cy3 and Cy5-labeled cDNA (750 ng) from two different samples were hybridized to Agilent Whole Mouse Genome microarrays and dye swap was performed to overcome fluorochrome interferences. The hybridized array was then washed and scanned and data were extracted from the scanned image using Feature Extraction version 9.5 (Agilent Technologies). For each microarray, log ratio, fold-change, log ratio p-value were determined Using Rosetta Resolver Gene Expression Analysis System.

Comparison of microarrays and gene clustering

Venn diagram approach and gene ontology were built using Ingenuity Systems, Inc IPA 8.7 – 3203. Gene expression change was considered consistent when p-value of log ratio was lower than 10^{-6}. Hierarchical clustering analysis was performed using MultiExperiment Viewer v4.5 software (38).

qPCR

Total RNA was isolated using the same procedure than for microarray. cDNA was synthesized with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. The qPCR was performed on an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette). Four µl of 1:50 diluted cDNA template were amplified by MESA GREEN MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) to measure duplex DNA formation. Primer sequences were: mIdolfw AGCGGCCTCTACCGAGCCAT ; mIdolrv CGCCAAGTGGCCCTTCAGGT ; mABCA1fw GGAGCTGGGAAGTCAACAAC ; mABCA1rv ACATGCTCTCTTCCCGTCAG ; mCycD2fw TCCCGCAGTGTTCCTATTTC ; mCycD2rv CTGGGGCTTCACAGAGTTGT ; mEzh2fw CCTCTGAAGCAAATTCTCGG ; mEzh2rv ACATCCTCAGTGGGAACAGG ; mNkx3.1fw GGAGGACCCACCAAGTATCC ; mNkx3.1rv ATGGCTGAACTTCCTCTCCA ; mMsmbfw AGTCCTGCTTTGCCACCATG ; mMsmbrv CGTGCAGTTCTTCTTCCAGGGAGT ; m18Sfw GGGAGCCTGAGAAACGGC ; m18Srv GGGTCGGGAGTGGGTAATTT ; hEzh2fw ACCAGTTTGTTGGCGGAAGCG ; hEzh2rv CCAAGTCACTGGTCACCGAACAAG ; h36b4fw GTCACTGTGCCAGCTCAGAA ; h36b4rv TCAATGGTGCCTCTGGAGAT.

Western blot analysis

Proteins were extracted in Hepes 20 mM, NaCl 0.42 M, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM and NP40 1% supplemented with PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich), Complete 1X (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), NaF 0.1 mM and Na_2VO_3 0.1mM (Sigma-Aldrich). Lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 15000 g. Forty µg of total proteins were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against either beta-Actin (Sigma-Aldrich), ABCA1 (Novus), EZH2 (Cell Signaling ; Montigny-Le-Bretonneux, France), LDLR (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), H3K27me (Millipore, Billerica, MA, USA), NKX3.1 (Novus). A second 1h-incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti mouse IgG (P.A.R.I.S, Compiègne, France) was performed. Peroxidase activity was detected with the Western Lightning System (Perkin-Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France).

Lipid analysis

Lipid staining of each organ collected was performed on 8 µm thick cryosections with 1,2-propanediol (Sigma) for 1 min and in Oil-Red-O (Sigma) for 4 min as described (39). Lipids were extracted as previously described (12) and analyzed on high-performance thin layer chromatography plates. Blood concentrations of triglycerides, cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol were determined on an automated clinical chemistry analyzer (Roche Diagnostics) according to manufacturer's instructions.

Flow cytometry analysis

Cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in RNase A (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1 hr at 4°C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter fluorescence-activated cell sorter. Proliferation amount was determined by evaluating S-phase nuclei percentage or cells counting. At least 15,000 events were measured for each sample.

Statistical Analysis

For statistical analysis, Student's *t* test was performed to determine whether there were significant differences between the groups. A *p* value of 0.05 was considered significant.

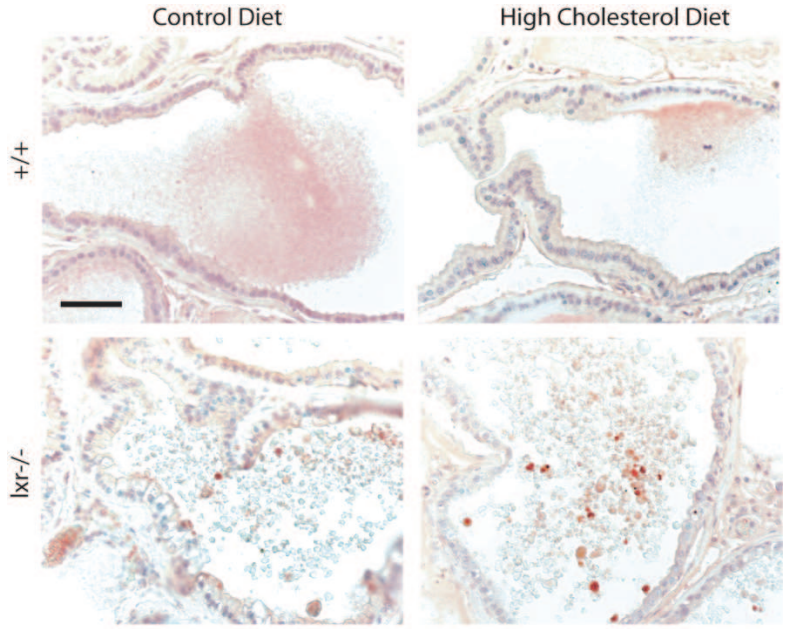
Acknowledgements

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale and Fondation BNP-Paribas research grants. A. Pommier and E. Viennois are respectively founded by MNERT and Région Auvergne grants, G. Alves is founded by Région Auvergne program. We thank J.P. Saru and A. De Haze for molecular biology technical assistance, C. Puchol and S. Plantade for animal facilities and Benoît Sion for lipid analysis.

References

1. Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Talamini, R., Negri, E., Montella, M., Franceschi, S., and La Vecchia, C. 2006. Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann Oncol* 17:1014-1017.
2. Magura, L., Blanchard, R., Hope, B., Beal, J.R., Schwartz, G.G., and Sahmoun, A.E. 2008. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 19:1259-1266.
3. Platz, E.A., Leitzmann, M.F., Visvanathan, K., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Giovannucci, E. 2006. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 98:1819-1825.
4. Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. 2005. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115:959-968.
5. Swyer, G. 1942. The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* 2:372-375.
6. White, C. 1909. On the occurence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 13:3-10.
7. Chen, Y., and Hughes-Fulford, M. 2001. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 91:41-45.
8. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. 2009. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325:100-104.
9. Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. 2003. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17:985-993.
10. Volle, D.H., and Lobaccaro, J.M. 2007. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 265-266:183-189.
11. Fukuchi, J., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Chuu, C.P., and Liao, S. 2004. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7686-7689.
12. Pommier, A.J., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., et al. 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29:2712-2723.
13. Freeman, M.R., and Solomon, K.R. 2004. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91:54-69.
14. Caruso, M.G., Notarnicola, M., Santillo, M., Cavallini, A., and Di Leo, A. 1999. Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res* 19:451-454.
15. Graziani, S.R., Igreja, F.A., Hegg, R., Meneghetti, C., Brandizzi, L.I., Barboza, R., Amancio, R.F., Pinotti, J.A., and Maranhao, R.C. 2002. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 85:493-497.
16. Kim, H.J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., and Gustafsson, J.A. 2009. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:558-563.
17. Giovannucci, E., Rimm, E.B., and Colditz, G.A. 1993. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:9.
18. Mills PK, B.W., Phillips RL, Fraser GE. 1989. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 64:598-604.
19. Sekine, Y., Koike, H., Nakano, T., Nakajima, K., Takahashi, S., and Suzuki, K. 2009. Remnant lipoproteins induced proliferation of human prostate cancer cell, PC-3 but not LNCaP, via low density lipoprotein receptor. *Cancer Epidemiol* 33:16-23.
20. Swinnen, J.V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., and Verhoeven, G. 2002. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 98:19-22.
21. Flick, E.D., Habel, L.A., Chan, K.A., Van Den Eeden, S.K., Quinn, V.P., Haque, R., Orav, E.J., Seeger, J.D., Sadler, M.C., Quesenberry, C.P., Jr., et al. 2007. Statin use and risk of prostate cancer in the California Men's Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2218-2225.
22. Jacobs, E.J., Rodriguez, C., Bain, E.B., Wang, Y., Thun, M.J., and Calle, E.E. 2007. Cholesterol-lowering drugs and advanced prostate cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2213-2217.
23. Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., et al. 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419:624-629.
24. Croonquist, P.A., and Van Ness, B. 2005. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene* 24:6269-6280.
25. Yu, J., Yu, J., Rhodes, D.R., Tomlins, S.A., Cao, X., Chen, G., Mehra, R., Wang, X., Ghosh, D., Shah, R.B., et al. 2007. A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 67:10657-10663.
26. Beke, L., Nuytten, M., Van Eynde, A., Beullens, M., and Bollen, M. 2007. The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. *Oncogene* 26:4590-4595.
27. Kunderfranco, P., Mello-Grand, M., Cangemi, R., Pellini, S., Mensah, A., Albertini, V., Malek, A., Chiorino, G., Catapano, C.V., and Carbone, G.M. 2010. ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One* 5:e10547.
28. Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., et al. 2000. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 60:6111-6115.

29. Kim, M.J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W.A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Cardiff, R.D., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. 2002. Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 62:2999-3004.
30. McGarvey, K.M., Greene, E., Fahrner, J.A., Jenuwein, T., and Baylin, S.B. 2007. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res* 67:5097-5102.
31. Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., et al. 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439:871-874.
32. Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C.S., Eeles, R., Martin, F.L., Phillips, D.H., Crundwell, M., et al. 2007. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26:2667-2673.
33. Petrovics, G., Liu, A., Shaheduzzaman, S., Furusato, B., Sun, C., Chen, Y., Nau, M., Ravindranath, L., Chen, Y., Dobi, A., et al. 2005. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 24:3847-3852.
34. Varambally, S., Cao, Q., Mani, R.S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., et al. 2008. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322:1695-1699.
35. Dimri, M., Bommi, P.V., Sahasrabuddhe, A.A., Khandekar, J.D., and Dimri, G.P. 2010. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31:489-495.
36. Tatidis, L., Masquelier, M., and Vitols, S. 2002. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Biochem Pharmacol* 63:2169-2180.
37. Manin, M., Veyssiere, G., Cheyvialle, D., Chevalier, M., Lecher, P., and Jean, C. 1992. In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 131:2378-2386.
38. Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., et al. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34:374-378.
39. Frenoux, J.M., Vernet, P., Volle, D.H., Britan, A., Saez, F., Kocer, A., Henry-Berger, J., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M., and Drevet, J.R. 2004. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 33:361-375.



Supplementary data 1: TUNEL staining of dorso-lateral prostate. Scale bar = 50µm

Symbol	Agilent		
ABP1	A_51_P212068	LGI1	A_52_P298394
AGR2	A_51_P209122	LHX6	A_52_P497908
AHR	A_51_P449133	LTF	A_51_P188141
ANLN	A_52_P512955	LYVE1	A_52_P686785
ANPEP	A_51_P231184	MAT2A	A_51_P500344
ANXA9	A_51_P451482	MCM10	A_51_P212682
APOA5	A_52_P292404	MFAP3L	A_52_P139569
BCL11A	A_51_P262998	MGP	A_51_P426270
BMP7	A_52_P278354	MME	A_52_P429723
C1R	A_52_P114260	MMP3	A_51_P255699
CA2	A_51_P455647	MS4A1	A_51_P277683
CAPG	A_51_P273921	MSMB	A_52_P125636
CASP7	A_51_P414548	MSX1	A_51_P218196
CCL21	A_51_P129480	MT1E	A_51_P246317
CCND2	A_51_P433228	MT1F	A_51_P294979
CD14	A_51_P172853	MYB	A_51_P375543
CD28	A_52_P162967	MYH4	A_52_P602147
CDH11	A_52_P437795	MYH8	A_51_P143296
CDKN2B	A_52_P498241	MYH10	A_52_P680681
CEBPD	A_51_P444447	NCOA4	A_51_P151983
CHRDL2	A_51_P505571	NEK6	A_51_P413539
CLIC5	A_51_P193993	NKX3-1	A_51_P409408
COLEC12	A_52_P527625	NOV	A_52_P105537
CRABP1	A_52_P185907	OSMR	A_51_P319460
CRYAB	A_51_P504423	PBK	A_51_P230098
CTGF	A_51_P157042	PDE3A	A_52_P421881
CXADR	A_51_P212308	PDZK1	A_51_P261737
CXCL9	A_51_P461665	PEX11A	A_51_P456957
CXCL13	A_51_P378789	PITX1	A_52_P522255
CXCL16	A_51_P374203	PKHD1	A_52_P377941
CYP2A6	A_52_P246252	PLA2G4A	A_51_P402760
CYP2B9	A_51_P467076	PLAT	A_51_P301566
CYP2B13	A_51_P492339	PLAU	A_52_P302433
CYR61	A_51_P252859	PLAUR	A_52_P681310
DACH1	A_52_P309022	PPP3CC	A_51_P245405
DEFB1	A_52_P321140	PRDX6	A_52_P388359
EDNRA	A_52_P156190	PRLR	A_51_P264673
ESR1	A_52_P237077	PTPRT	A_51_P395373
ESR2	A_52_P156314	QPCT	A_51_P497295
F2	A_51_P480311	RASGRP4	A_52_P122572
FGL1	A_52_P294510	RELN	A_51_P365369
FOS	A_52_P262219	RGS2	A_52_P378968
GABRG1	A_51_P396883	RXRG	A_51_P513311
GAD2	A_51_P452977	S100A9	A_51_P402943
GALNT3	A_51_P380005	S100A11	A_51_P155643
GJA1	A_52_P174915	SDF2L1	A_51_P280446
GPI	A_52_P347412	SELP	A_51_P211854
GREB1	A_51_P127695	SERPINF1	A_51_P517075
GSTO1	A_51_P155313	SLC12A8	A_51_P476618
GSTT1	A_51_P179664	SLC22A1	A_52_P229972
HDAC9	A_51_P204031	SLC26A3	A_52_P185162
HLA-A	A_51_P230269	SLC27A2	A_52_P154971
HOXB2	A_52_P15300	SLC5A3	A_51_P112762
HOXB6	A_51_P232207	SLC5A8	A_51_P107315
HPGD	A_51_P458778	SLC7A5	A_51_P273639
HS3ST3A1	A_51_P515120	SPHK1	A_52_P400436
HSP90B1	A_52_P590546	SPINK1	A_51_P365516
ICOSLG	A_51_P520966	SYNGR1	A_51_P270733
IDO1	A_51_P307150	SYT12	A_51_P384831
IFNG	A_52_P68893	SYT17	A_51_P469688
IGJ	A_51_P150710	TAF15	A_51_P257583
IL24	A_51_P401517	TBL2	A_52_P499206
INHBA	A_51_P239750	TGFBR2	A_51_P450573
INHBB	A_51_P325904	THBS1	A_52_P363951
IQGAP2	A_52_P65494	TIMP4	A_51_P355427
ITGB6	A_51_P161054	TLR4	A_51_P300806
ITLN1	A_51_P147987	TLR7	A_51_P371710
KCNK3	A_51_P292221	TMEM97	A_51_P284565
KDELR1	A_52_P596541	TMPRSS4	A_51_P446179
KLF8	A_52_P206861	TNNI2	A_51_P355122
KLF11	A_52_P474002	USP6NL	A_51_P442719
KLK2	A_51_P389929	WARS	A_52_P35174
LCN2	A_51_P510156	WNT1	A_51_P366435

© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Supplementary data 2: List of 154 genes deregulated in the cancer cluster

	CHO	HDL	LDL	TRI
Ser *lxr -/-* **CD**	1,2	0,84	0,32	0,32
Ser *lxr -/-* **HCD**	3,18	1,58	1,94	0,22

Supplementary data 3: Lipid concentration of plasma used on MPE cells. CHO (Cholesterol), HDL (High Density Lipoprotein), LDL (Low Density Lipoprotein), TRI (Triglyceride). Ser (Serum), CD (Control Diet), HCD (High Cholesterol Diet**).** Unit: mmol/L of plasma.

Conclusion

L'invalidation des LXRs conduit à la perte de régulation de l'homéostasie des lipides et ainsi à l'accumulation de cholestérol intracellulaire chez des souris nourries avec un régime hypercholestérolémiant. L'utilisation de ce modèle de souris permet donc d'étudier l'impact d'une surcharge en cholestérol intracellulaire induite par un régime dans un contexte encore non tumoral. Nos résultats indiquent très clairement que l'accumulation de cholestérol intraprostatique est associée à 1) une augmentation de l'expression du gène codant de l'histone méthyltransférase EZH2, 2) la répression de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur *nkx3.1* et *msmb*, 3) une prolifération cellulaire incontrôlée et 4) la formation de néoplasie. *In vitro*, l'augmentation de cholestérol intracellulaire induite par l'exposition des cellules PC3 aux LDL entraîne également une augmentation de l'expression de *ezh2* et une activation de la prolifération, ce qui indique donc une relation entre la présence de cholestérol intracellulaire et l'expression de *ezh2*. Ces données montrent donc qu'une surcharge en cholestérol peut initier les premières étapes du développement tumoral par des mécanismes épigénétiques mettant en jeu l'action répressive de l'histone méthyltransférase EZH2 sur des gènes suppresseurs de tumeur.

Chapitre II :

Les LXRs peuvent-ils moduler la croissance des cellules tumorales prostatiques ?

Présentation du contexte scientifique

L'activation des LXRs par leur agoniste synthétique T0901317 entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire de lignées tumorales prostatiques LNCaP, DU145 et PC3 (342). Cette diminution du cycle cellulaire est caractérisée par une diminution du nombre de cellules en phase S corrélée à une diminution de l'accumulation de SKP2 connue pour favoriser la dégradation, par le système ubiquitine-protéasome, de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que $p27^{Kip1}$. Le traitement de cellules LNCaP entraîne en effet une augmentation de $p27^{Kip1}$ qui est alors peu ou n'est pas dégradée par le protéasome pouvant ainsi expliquer l'effet inhibiteur du T0901317 sur le cycle cellulaire (342). Dans cette même étude, les auteurs montrent que dans les cellules LNCaP, l'activation des LXRs provoque une augmentation de l'accumulation de la cassette d'efflux de cholestérol ABCA1, ce qui pourrait alors suggérer que l'effet antiprolifératif des LXRs puisse être médié, du moins en partie, par l'activation de l'efflux de cholestérol.

En parallèle, dans les membranes plasmiques, le cholestérol se concentre au niveau des *rafts* lipidiques qui sont des microdomaines considérés comme des plateformes de signalisation impliquées notamment dans les processus de survie cellulaire. La présence de cholestérol augmente la taille et l'activité de ces domaines en favorisant leur coalescence (256).

Le cholestérol semble donc être un élément capable de favoriser le développement tumoral et ceci par différents mécanismes dont certains sont en cours d'étude tels que la modification d'empreintes épigénétiques (Chapitre I) et d'autres faisant intervenir la modulation de l'activité des *rafts* lipidiques. Ces données suggèrent donc que le blocage de l'accumulation de cholestérol au niveau des cellules tumorales puisse représenter une stratégie intéressante pour moduler la croissance tumorale.

Dans ce contexte et compte tenu de rôle clé des LXRs dans la régulation de la quantité de cholestérol intracellulaire, l'objectif de notre travail a été d'étudier l'impact de l'activation de ces récepteurs nucléaires sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la survie des cellules tumorales.

Article 2: Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells.

Article publié dans *Oncogene*, Volume 18, issue 18, pages 2712-2723, 6 mai 2010.

Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM.

Oncogene (2010) 29, 2712–2723
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/10 $32.00
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells

AJC Pommier[1,2,3], G Alves[1,2,3], E Viennois[1,2,3], S Bernard[4], Y Communal[5], B Sion[6], G Marceau[2,7,8], C Damon[1,2], K Mouzat[9], F Caira[1,2,3], S Baron[1,2,3,10] and JMA Lobaccaro[1,2,3,10]

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, Clermont-Ferrand, France; [2]CNRS, UMR 6247, GReD, Aubiere, France; [3]Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; [4]UPR 2228 CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France; [5]Département d'Oncogénétique, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; [6]Equipe d'Accueil EA975, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; [7]Clermont Université, Université d'Auvergne, Génétique Reproduction et Développement, Clermont-Ferrand, France; [8]Service de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France and [9]Service de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire, Nimes, France

Cholesterol is a structural component of lipid rafts within the plasma membrane. These domains, used as platforms for various signaling molecules, regulate cellular processes including cell survival. Cholesterol contents are tightly correlated with the structure and function of lipid rafts. Liver X receptors (LXRs) have a central role in the regulation of cholesterol homeostasis within the cell. Therefore, we investigated whether these nuclear receptors could modulate lipid raft signaling and consequently alter prostate cancer (PCa) cell survival. Treatment with the synthetic LXR agonist T0901317 downregulated the AKT survival pathway and thus induced apoptosis of LNCaP PCa cells in both xenografted nude mice and cell culture. The decrease in tumor cholesterol content resulted from the upregulation of ABCG1 and the subsequent increase in reverse cholesterol transport. RNA interference experiments showed that these effects were mediated by LXRs. Atomic force microscopy scanning of the inner plasma membrane sheet showed smaller and thinner lipid rafts after LXR stimulation, associated with the downregulation of AKT phosphorylation in these lipid rafts. Replenishment of cell membranes with exogenous cholesterol antagonized these effects, showing that cholesterol is a key modulator in this process. Altogether, pharmacological modulation of LXR activity could thus reduce prostate tumor growth by enhancing apoptosis in a lipid raft-dependent manner.
Oncogene (2010) **29,** 2712–2723; doi:10.1038/onc.2010.30; published online 1 March 2010

Keywords: LXRs; cholesterol; lipid rafts; apoptosis; prostate

Correspondence: Dr JMA Lobaccaro, UMR GReD CNRS 6247, Clermont Université, Campus des Cézeaux, 24 avenue des Landais, Aubière 63177, France.
E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr
[10]These authors contributed equally to this work.
Received 29 July 2009; revised 5 January 2010; accepted 15 January 2010; published online 1 March 2010

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of death from cancer in men over the age of 50 years. Among the various genetic and environmental risk factors, epidemiological analyses have revealed a positive association between hypercholesterolemia and the development of PCa (Bravi *et al*., 2006; Magura *et al*., 2008). It is well known that cancer cells produce more cholesterol and sphingolipids than do normal cells, especially in solid tumors (White, 1909; Swyer, 1942). This phenomenon has been explained by the rapidly proliferating cancer cells requiring new components to build *de novo* plasma membrane. In agreement with this, statins, a class of HMG-CoA reductase inhibitors, and their derivatives block PCa cell growth *in vitro* (Ukomadu and Dutta, 2003; Mo and Elson, 2004) and have been suspected to have benefits in PCa progression in patients undergoing long-term treatment (Shannon *et al*., 2005; Murtola *et al*., 2008).

Extensive studies on lipid rafts have underlined the crucial role of free cholesterol present in plasma membranes in raft-dependent signaling. Lipid rafts are characterized by liquid-ordered microdomains enriched in phospholipids and sphingolipids with highly saturated hydrocarbon chains (Simons and Toomre, 2000). Cholesterol is an important component of lipid rafts and is proposed to induce their coalescence and thus to determine the size of raft platforms (Solomon *et al*., 1996; Lawrence *et al*., 2003; Freeman and Solomon, 2004). This last point seems to be an important step in the distribution of membrane-associated proteins, in particular those involved in transduction signaling such as AKT/PKB. High levels of phosphorylated AKT protein, which has a crucial role in cell survival signaling, have been correlated with Gleason score (Liao *et al*., 2003) and associated with resistance to chemotherapy (Yuan and Whang, 2002). Consistent with this, LNCaP xenografts in athymic mice showed that both phospho-signaling and apoptotic resistance were strengthened by a cholesterol-rich diet (Zhuang *et al*., 2005), pointing out the crucial role of cholesterol in cell apoptosis resistance and cancer development.

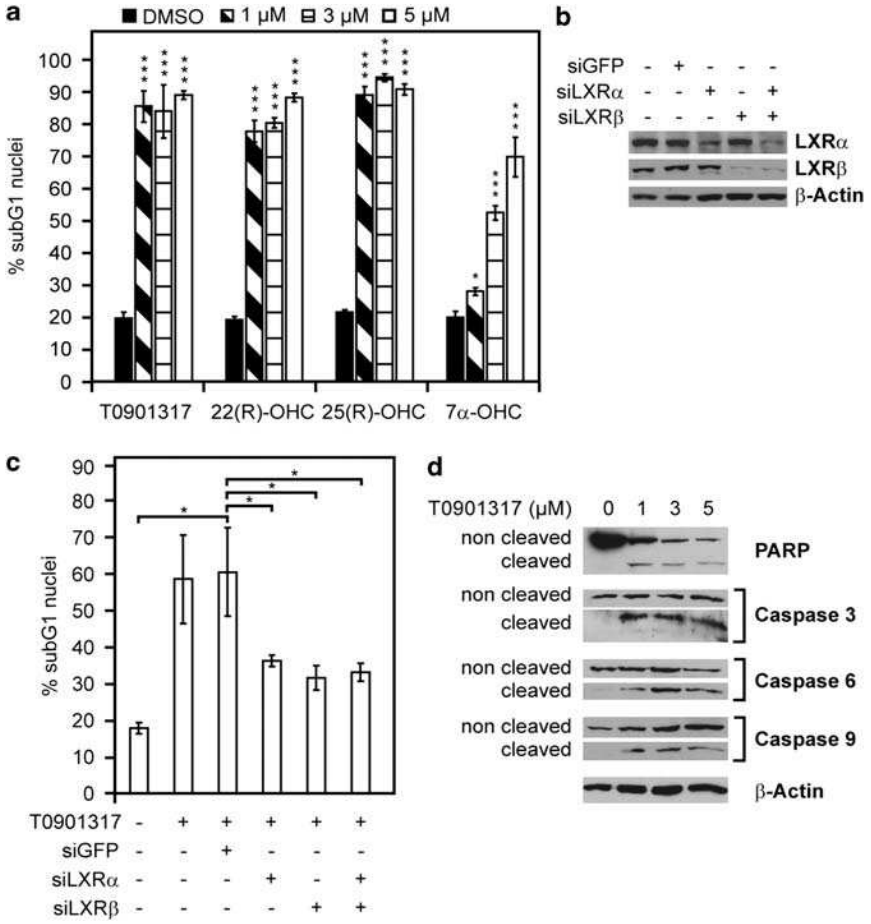


Figure 1 LXR activation induces apoptosis of LNCaP cells. (**a**) Percentage of subG1 nuclei from LNCaP cells treated with DMSO versus 1, 3, 5 μM T0901317, 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-OHC), 25(R)-hydroxycholesterol (25(R)-OHC) or 7α-hydroxycholesterol (7α-OHC) was quantified by flow cytometry. (**b**) LNCaP cells were transfected with small interfering RNA against LXRα and LXRβ for 48 h. Silencing was checked by western blot using LXRα and LXRβ antibodies. (**c**) After 48 h of *lxr* silencing, LNCaP cells were treated with T0901317 during 36 h and apoptosis was analyzed by flow cytometry. (**d**) Protein lysates from LNCaP cells incubated with DMSO or 1, 3 or 5 μM of T0901317 for 72 h were detected by western blot using anti-poly-ADP-ribosyl-polymerase, caspase 3, 6, 9 and β-actin antibodies. Data are means ± s.d. bars ($n = 3$) and are representative of three independent experiments. Student's *t*-test: $^{*}P < 0.05$; $^{***}P < 0.001$.

Liver X receptor-α (LXRα) (NR1H3) and LXRβ (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily, bind to naturally occurring oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols, and stimulate expression of target genes essentially involved in lipid metabolism (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003; Volle and Lobaccaro, 2007). Investigation of *lxr* knockout mice revealed prostatic stromal hyperplasia (Kim *et al*., 2009). LXR activation by synthetic ligands such as T0901317 can repress growth of human prostatic cell lines *in vitro* and slow down tumoral prostatic cell xenograft expansion *in vivo* (Fukuchi *et al*., 2004b). Given that LXRs are involved in cholesterol metabolism and that cholesterol has a crucial role in tumor development, we examined the effects of LXR ligands on LNCaP cells *in vitro* and *in vivo* in xenografted mice. We focused our investigations on lipid raft topography, AKT raft-dependent transduction pathway and apoptosis. We found that LXR activation resulted in stimulation of apoptosis that occurred after raft disruption and AKT dephosphorylation.

Results

LXR activation induces apoptosis by inhibition of the AKT survival pathway through an indirect mechanism

Cell death regulation is a key process in PCa development. We thus analyzed the effect of LXR agonist treatments on LNCaP apoptosis. LNCaP cells were treated for 72 h with increasing amounts of T0901317, 22(R)-hydroxycholesterol, 25(R)-hydroxycholesterol and 7α-hydroxycholesterol. All LXR ligands increased the subG1 nuclei fraction from 20 to 85% (Figure 1a). Even 7α-hydroxycholesterol, known to be a weak LXR agonist, significantly enhanced accumulation of subG1 nuclei. To determine which LXR isoform was involved and to confirm that apoptosis was mediated by LXRs, we silenced either LXRα or LXRβ using small interfering RNAs for each endogenous isoform (Figure 1b). LXRα and/or LXRβ knockdown significantly reduced accumulation of subG1 nuclei induced by T0901317. This showed that the effect of T0901317 was mediated by LXRs and that both isoforms were involved in

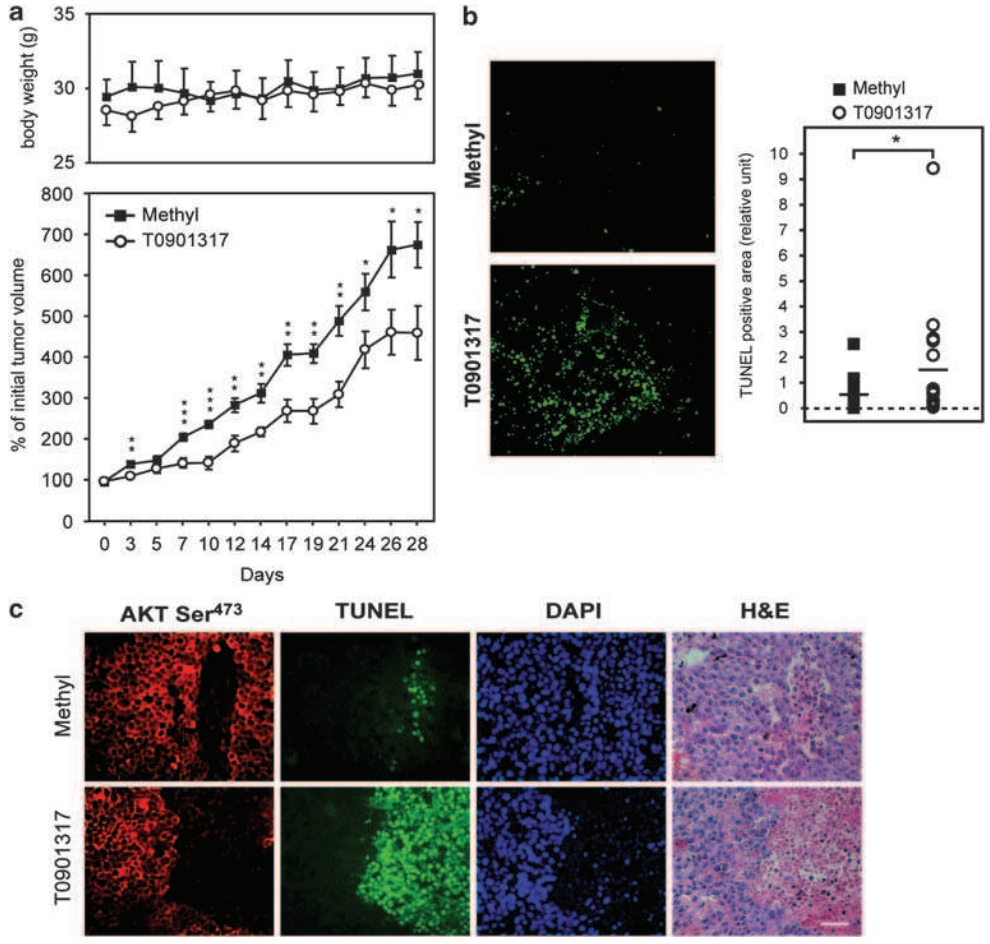


Figure 2 LXRs induce apoptosis in LNCaP xenografts and inhibit the AKT survival pathway. (**a**) Nude male mice were injected with LNCaP cells. Three weeks later, mice were treated with vehicle (methylcellulose) or T0901317 (20 mg/kg) once a day for a month. Mice were weighed (upper graph) and tumors were measured (lower graph) every 3 days. Data are means ± s.d. bars ($n = 16$). Student's *t*-test: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. (**b**) Apoptotic rate was analyzed by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method into xenografts after necropsy. Positive TUNEL-labeled area was quantified and reported to the total area by the signal threshold method. Data are means ± s.d. bars ($n = 13$). Mann–Whitney test: $*P < 0.05$. (**c**) LNCaP xenografts obtained from methylcellulose (top) or T0901317 (bottom) were (left to right): immunodetected for AKT Ser^{473}, TUNEL stained, 4,6-diamidino-2-phenylindole labeled and hematoxylin and eosin (H&E) colored (adjacent slides). Scale bar represents 40 μm.

induction of apoptosis (Figure 1c). Hence, in the following experiments we only used the T0901317 agonist to investigate LXR activation. Accumulation of cleaved caspases 3, 6, 9 and cleaved form of poly-ADP-ribosyl-polymerase indicated that T0901317 treatment activated cell death through the canonical apoptotic pathway (Figure 1d).

We next analyzed the effect of LXR activation *in vivo* on the basis of the growth of xenografted LNCaP cells. As previously described (Fukuchi *et al*., 2004b), T0901317-treated mice showed a significantly slower tumor growth without any effect on the body weight (Figure 2a). Decrease in tumor growth was confirmed by xenograft analysis during necropsy (Supplementary Data 1). TdT-mediated dUTP nick end labeling assay showed that the apoptotic cell index was significantly increased in tumors from T0901317-treated mice compared with vehicle-treated mice (Figure 2b). Nevertheless, even T0901317-treated xenografts exhibit more apoptotic staining (Figure 2b), and there is no correlation between the volume of the xenograft and the apoptotic index (data not shown). This indicates that T0901317 reduced xenograft growth not only by targeting apoptosis but also by other processes such as proliferation (Fukuchi *et al*., 2004b; Chuu *et al*., 2006) or angiogenesis (Walczak *et al*., 2004; Mouzat *et al*., 2009). PCa cells are characterized by a strong resistance to apoptosis involving deregulation of various key cell survival transduction pathways such as AKT signaling. LNCaP cells exhibit PTEN inactivation, leading to constitutive activation of the AKT pathway (Carson *et al*., 1999). We analyzed AKT phosphorylation on Ser^{473} as a marker of AKT activation in LNCaP xenografts. As observed in Figure 2c, AKT survival pathway was inhibited in apoptotic areas strongly suggesting that this event was concomitant with apoptotic program activation.

To investigate the relationship between LXRs, AKT and apoptosis, a time course experiment was performed with T0901317 on LNCaP cell cultures. SubG1 nuclei

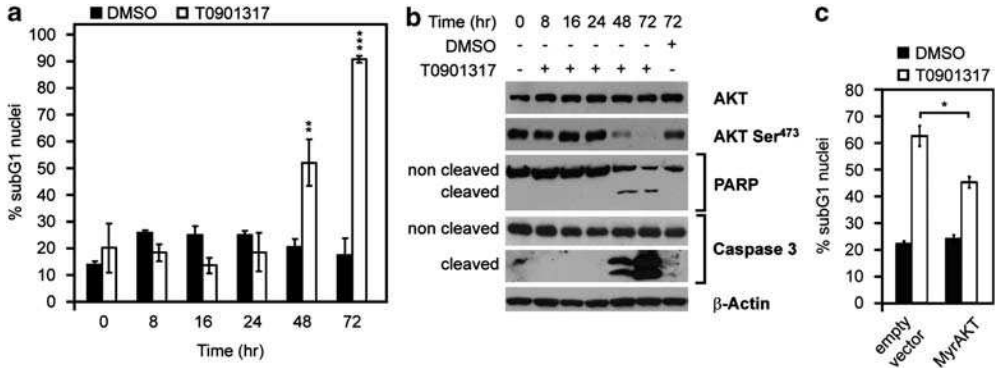


Figure 3 AKT transduction pathway is repressed by LXRs through an indirect mechanism. (**a**) Sub-G1 nuclei accumulation from LNCaP cells treated during a time course experiment with DMSO or T0901317 (3 μM). Data are means ± s.d. bars ($n = 3$) and are representative of three independent experiments. Student's *t*-test: $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. (**b**) Total proteins were analyzed by western blot to detect AKT, AKT ser^{473}, poly-ADP-ribosyl-polymerase, caspase 3 and β-actin proteins. (**c**) LNCaP cells were transfected with myrAKT expression vector or the corresponding empty vector and induced with DMSO or T0901317 (3 μM). Sub-G1 nuclei accumulation was analyzed by flow cytometry. Student's *t*-test: $^{*}P < 0.05$.

accumulation, poly-ADP-ribosyl-polymerase and caspase 3 cleavage were observed, concomitantly with a decrease in AKT phosphorylation on Ser^{473} (Figures 3a and b), only after 48 h of treatment, suggesting an indirect mechanism. Consistent with this, LNCaP transfection with a plasmid encoding a myristoylated AKT (constitutive positive AKT) resulted in a significant decrease in T0901317-induced apoptosis (Figure 3c). We concluded that LXRs induced apoptosis in part through a downregulation of the AKT cell survival signaling pathway in LNCaP cell cultures and xenografts, and presumably using an indirect mechanism.

LXRs stimulate cholesterol efflux through ABCG1 upregulation

Cholesterol is known to stimulate AKT phosphorylation (Zhuang *et al*., 2005). We therefore evaluated whether the effect of LXR activation on AKT signaling could be mediated by the modulation of the intracellular cholesterol contents. Cholesterol transporters ABCA1 and ABCG1 expression levels were analyzed by quantitative PCR and western blot. T0901317 treatment for 72 h induced ABCG1 but not ABCA1 mRNA and protein accumulation levels in LNCaP cells (Figure 4a). Time course analysis showed an increase in ABCG1 accumulation after 8 h of treatment (Figure 4b; Supplementary Data 2). Similar results were obtained from LNCaP xenografts: *abcg1* expression level exhibited a 2.7-fold increase, whereas *abca1* expression remained unchanged (Figure 4c). This upregulation was confirmed by immunohistochemistry for ABCG1 in xenografts (Figure 4d). Increase in ABCG1 expression strongly suggested that intracellular cholesterol concentration was reduced in T0901317-treated cells.

To confirm this hypothesis, free cholesterol levels were determined during a time course experiment in the presence of T0901317 in LNCaP cells. A significant and stable decrease in free cholesterol concentration was observed starting at 16 h (Figure 5a), which was consistent with earlier accumulation of *abcg1* at 8 h (Figure 4b and Supplementary Data 2). Increased cholesterol accumulation in the T0901317-treated cell culture supernatant indicated an increase in the cholesterol efflux (Figure 5b). Levels of both cholesterol esters and free cholesterol decreased in T0901317-treated mice tumors (Figure 5c). This decrease was correlated with the reverse cholesterol transport to the liver as indicated by higher total and high-density lipoprotein-cholesterol levels in the plasma of T0901317-treated mice (Figure 5d). Taken together, these results showed that LXRs stimulated early cholesterol efflux through ABCG1 transporter upregulation, which resulted in a subsequent inactivation of AKT pathways and stimulation of apoptosis.

LXR activation reduces lipid raft size in a cholesterol-dependent manner

Given that free cholesterol is the main component of lipid raft, we suspected that reduction of free cholesterol content in T0901317-treated cells could decrease the lipid raft domain size and subsequent downregulate AKT signaling. To confirm this hypothesis, we examined the topography of the inner membrane sheet of LNCaP cells using atomic force microscopy (AFM) to analyze membrane domain height and width. In control cells, membrane domains were abundant. Most of them displayed flotillin-2 staining (Figure 6a, top), indicating that they were lipid rafts. Repeated measurements, summarized in Figure 6b, revealed that, in dimethylsulfoxide (DMSO) conditions, the width and height of these domains range from 451 ± 126 and 52 ± 12 nm, respectively. These observations were consistent with previous studies on RBL-2H3 cells (Frankel *et al*., 2006). Interdomain membrane regions had an average thickness of ~7 nm, measured relative to the poly-L-lysine-coated substrate, thus corresponding to the phospholipid bilayer (Supplementary Data 3A). T0901317 treatment resulted in a dispersion of both membrane domains and flotillin-2 staining, thus leading to membrane flattening (Figure 6a, bottom). Given that flotillin-2 is a raft

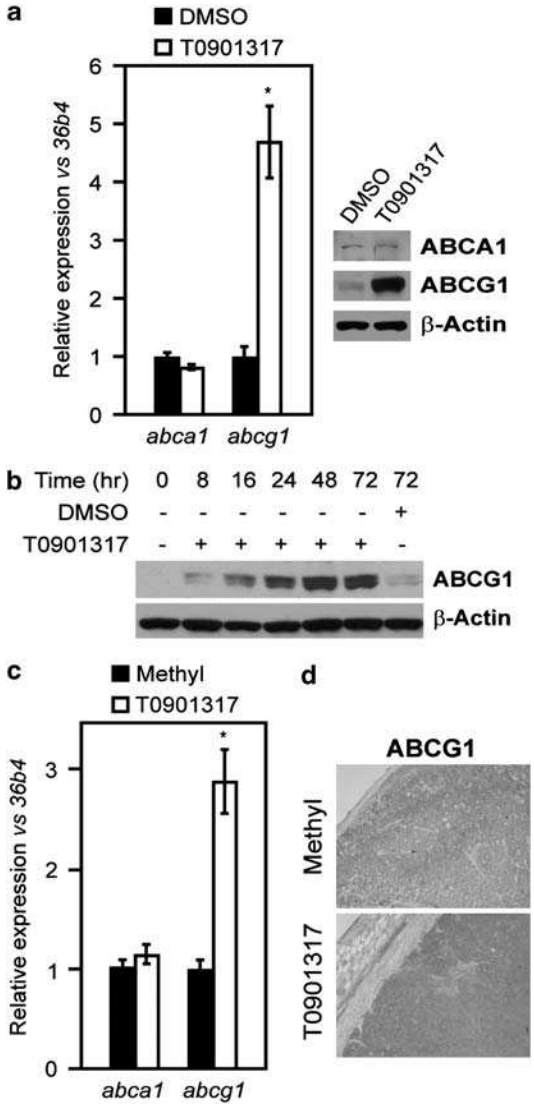


Figure 4 LXR activation enhances *abcg1* expression in LNCaP cells. (**a**) *abca1* and *abcg1* expression levels were analyzed in LNCaP cells treated with DMSO or T0901317 (3 μM) by qPCR and western blot. (**b**) ABCG1 protein accumulation during a T0901317 time course induction was analyzed by western blot. (**c**) *abca1* and *abcg1* expression levels were analyzed by qPCR on LNCaP xenografts. (**d**) Immunohistochemistry against ABCG1 on LNCaP xenografts. Student's *t*-test: $*P<0.05$.

resident protein, the decrease in its signal indicates raft dispersion in T0901317 conditions and strongly suggests structural changes in lipid rafts. Quantification of membrane domain sizes revealed that T0901317-treated cells harbored smaller domains compared with DMSO-treated cells regarding both width and height (Figure 6b, Supplementary Data 3B). Although domains exhibited a median width of 451 ± 126 nm and height of 52 ± 12 nm in DMSO conditions, T0901317 stimulation resulted in a reduction in size domains, 259 ± 88 for width and 24 ± 10 for height. These alterations were reversed by co-treatment with cholesterol with a width range of 512 ± 122 and a height range of 46 ± 18 nm. This emphasized that cholesterol was the central component by which LXRs could modulate the size of raft domains. Interestingly, cholesterol alone was also able to increase domain height (89 ± 26 vs 52 ± 12 nm) but did not appear to significantly alter domain width. Taken together, these results showed that LXR activation inhibited lipid raft coalescence by a mechanism involving cholesterol efflux.

Lipid raft alteration by LXRs blocks the AKT raft-dependent survival pathway

Raft coalescence is tightly associated with survival signaling transduction (Freeman and Solomon, 2004). For this reason, we investigated the raft-dependent signaling pathway phosphoinositide-3 kinase/AKT as a marker of survival signals inside lipid rafts. Lipid rafts were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation (Supplementary Data 4). Enrichment and contamination of cytosol/membrane and raft fractions were analyzed by flotillin-2 and β-tubulin detection. T0901317 treatment for 24 h dramatically decreased AKT phosphorylation in the raft fraction, whereas AKT phosphorylation was unaltered in the cytosolic and membrane fractions (Figure 7). This slowing of AKT phosphorylation in the lipid raft fraction was consistent with the timing of the membrane cholesterol depletion observed (Figure 5a) after 16 h of T0901317 induction.

Cholesterol antagonizes LXR-induced apoptosis by reactivation of the AKT survival pathway in lipid raft

We showed that cholesterol addition prevented raft disruption in T0901317-treated cells (Figure 6b). Thus, we hypothesized that, by maintaining AKT signaling activity in lipid rafts, cholesterol supplementation could antagonize LXR-induced apoptosis. We investigated phosphoAKT Ser^{473} and flotillin-2 subcellular localization by confocal microscopy. In control conditions, phosphoAKT Ser^{473} colocalized with lipid rafts as shown by flotillin-2 staining (Figure 8a), whereas T0901317 treatment decreased phosphoAKT Ser^{473} signal within the plasma membrane. Cholesterol supplementation restored the localization of phosphoAKT Ser^{473} within the rafts (see 'colocalization' column on Figure 8a). In parallel, western blot analysis indicated that cholesterol addition partially prevented AKT dephosphorylation on Ser^{473}, reduced accumulation of cleaved poly-ADP-ribosyl-polymerase (Figure 8b) and reversed the effect of T0901317 on sub-G1 nuclei accumulation (Figure 8c). Altogether, these results showed that the proapoptotic effects of activated LXRs were mediated by cholesterol depletion in rafts, which in turn inhibited activity of the AKT survival pathway and induced apoptosis.

Discussion

This study points out LXR isoforms and their ligands as key modulators of PCa cell survival. Our *in vitro* and *in vivo* analyses revealed that modulation of LXR

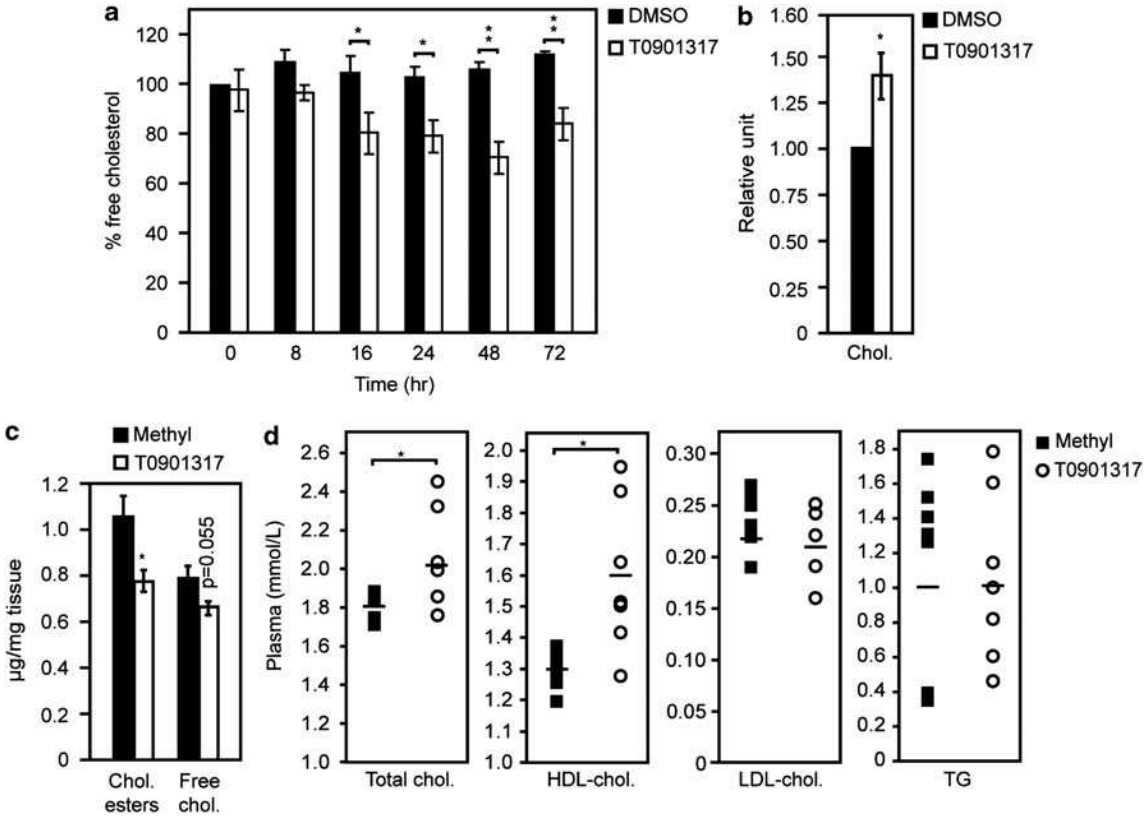


Figure 5 Upregulation of *abcg1* decreases free cholesterol content by activation of reverse cholesterol transport in xenografts. (**a**) Time course induction was performed on LNCaP cells treated with DMSO or T0901317 (3 µM) to analyze free cholesterol relative amount. (**b**) Cholesterol (Chol.) was measured in the medium after 48 h of T0901317 exposure to analyze cholesterol efflux. (**c**) Free and cholesteryl esters were quantified in LNCaP xenografts of methyl cellulose and T0901317-treated mice. Student's *t*-test: $*P<0.05$; $**P<0.01$. (**d**) Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride (TG) contents were analyzed by enzymatic colorimetric assay in plasma of nude mice. Data are means ± s.d. bars ($n=8$). Mann–Whitney test: $*P<0.05$.

activity triggered apoptosis of PCa cells. This effect involves both the increase in cholesterol efflux and the subsequent disruption of lipid rafts. We showed that LXR-mediated upregulation of ABCG1 stimulated reverse cholesterol transport. This resulted in a reduction in plasma membrane cholesterol steady-state levels. These observations were correlated with a decrease in the phosphorylated fraction of raft-associated AKT. We showed that cholesterol replenishment or MyrAKT expression prevented the cells from apoptosis in the presence of T0901317. Consistent with this mechanism, chronic T0901317 treatment induces downregulation of AKT and stimulates apoptosis of LNCaP-derived tumors in xenografted mice.

The major finding of this work is the role of LXRs as modulators of lipid raft signaling. Freeman and Solomon (2004) proposed that a critical cholesterol concentration in the membrane was required to allow raft coalescence. Sequestration of 'oncogenic' signaling proteins in a restricted area through raft coalescence could enhance their activity by exclusion of negative regulators outside the rafts (Yang *et al*., 1998). Moreover, expansion of the raft could tether AKT with upstream regulators such as DNA-dependent protein kinase. This kinase is known to be associated with the raft fraction and to phosphorylate AKT on ser^{473} residue (Hill *et al*., 2002). Transfecting LNCaP cells with MyrAKT partially, but not completely, blocked T0901317-induced apoptosis (Figure 3c). Consistent with this, MyrAKT has been described to be over-represented in lipid raft fractions indicating that myristoylation preferably anchored the kinase in rafts (Adam *et al*., 2007). Similar to MyrAKT, the subpopulation of AKT, which is cholesterol sensitive (raft resident), has been shown to phosphorylate distinct substrates from those targeted by AKT located elsewhere in the cell. These substrates have been shown to support most of the prosurvival effects of AKT (Adam *et al*., 2007). These observations could explain why MyrAKT expression failed to completely abolish apoptosis in T0901317-treated cells. Another possibility could be that LXR activation interferes with others raft-dependent survival pathways and acts by an AKT-independent mechanism.

As previously shown, inhibition of *de novo* cholesterol synthesis by simvastatin results in a decrease in raft-associated AKT phosphorylation without a concomitant effect on other AKT protein fractions (Zhuang

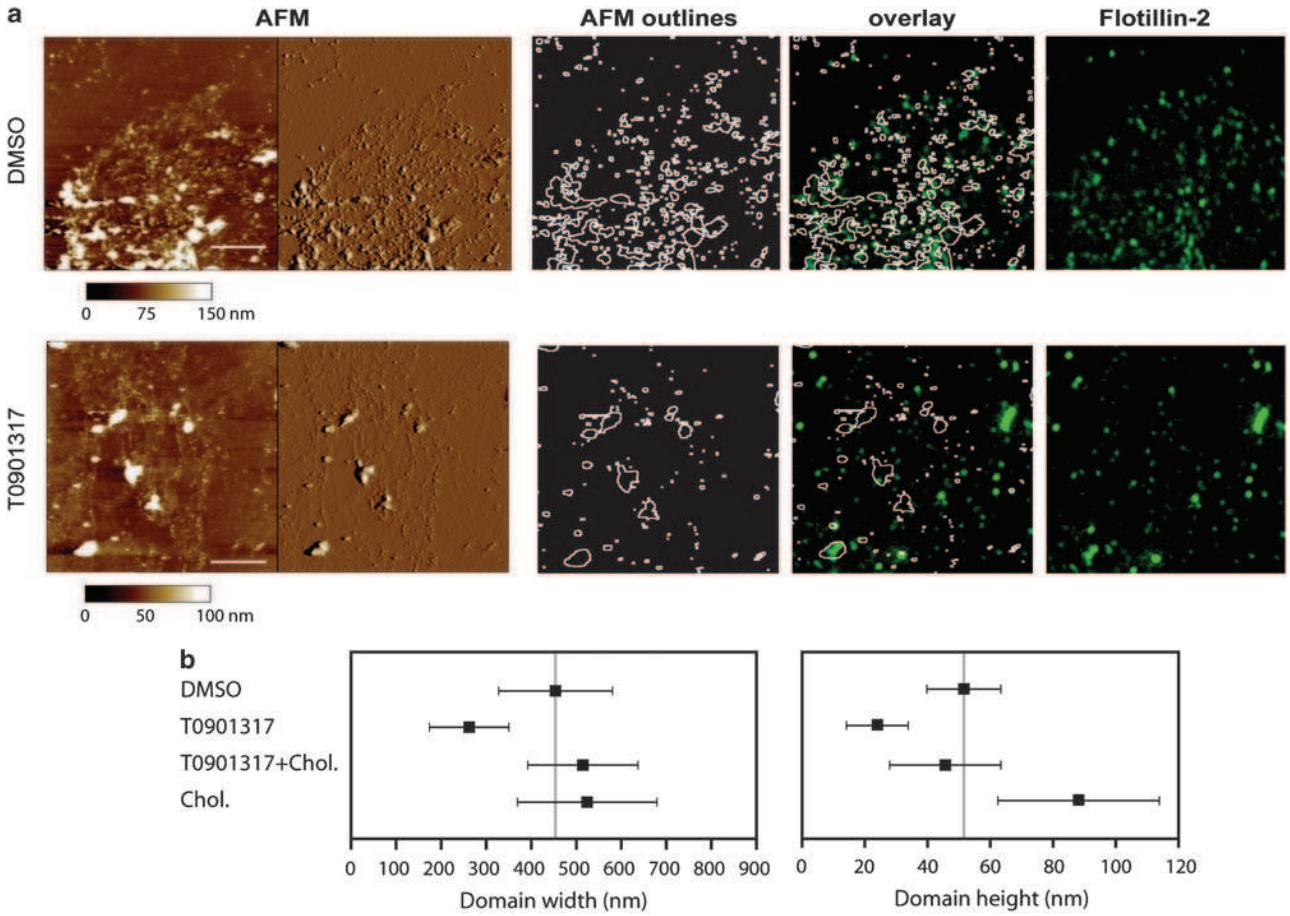


Figure 6 LXRs control lipid raft coalescence. (**a**) Simultaneous atomic force microscopy (AFM) and fluorescence images of inner membrane sheets were obtained after LNCaP cell preparation. Flotillin-2 detection and AFM scanning were performed on LNCaP cells treated with DMSO (top) or T0901317 (1 μM) (bottom); AFM pictures were outlined and overlaid with flotillin-2 staining. Scale bar represents 5 μm. (**b**) Means ± s.d. of height and width domains, measured by cross-section ($n = 30$), from LNCaP cells treated with DMSO, T0901317 (1 μM), T0901317 + Chol. (10 μM) or Chol. (10 μM) alone.

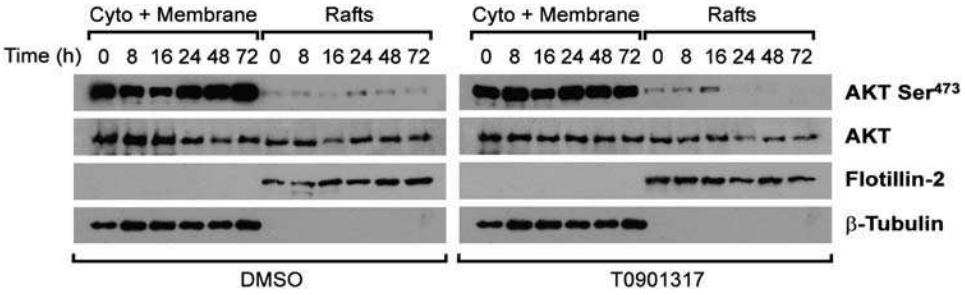


Figure 7 LXR activation inhibits AKT survival pathway in lipid raft. Cells were treated with DMSO or T0901317 (3 μM) during a time course experiment. After ultracentrifugation on a sucrose gradient, raft fractions and cytosolic + membrane fractions were collected and detected by western blot using antibodies against AKT Ser^{473}, AKT, flotillin-2 and β-tubulin.

et al., 2005). We observed a similar effect of T0901317 on LNCaP cells and consequently postulated that activation of LXRs could hamper raft coalescence. Chemical or RNA interference inhibition of squalene synthase, which switches the mevalonate/isoprenoid pathway toward sterol biosynthesis, was shown to decrease cholesterol concentration within lipid rafts and to induce growth arrest and cell death in LNCaP cells (Brusselmans *et al*., 2007). A potential target of raft dynamics modulation is the Hedgehog pathway. The Hegdehog receptor Patched and its positive regulator Smoothened localize to lipid rafts and this complex can be altered by depletion of membrane cholesterol (Karpen *et al*., 2001). Interestingly, this pathway is frequently activated in PCa and favors proliferation and metastasis (Fan *et al*., 2004; Karhadkar *et al*., 2004;

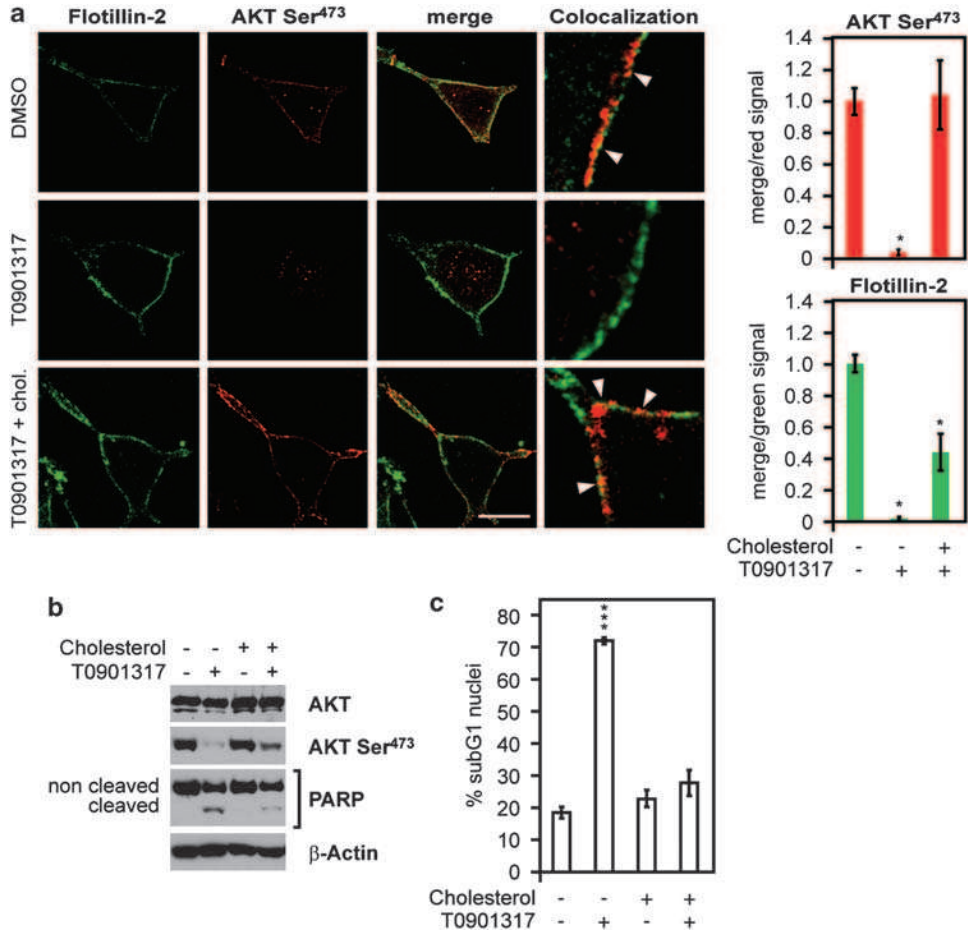


Figure 8 Cholesterol antagonizes LXR-induced apoptosis by 'reactivation' of the AKT survival pathway in lipid raft. (**a**) Flotillin-2 and AKT Ser^{473} subcellular localizations were analyzed by immunofluorescence staining, labeled in green and red colors, respectively, and observed by confocal microscopy. Experiments were obtained from LNCaP cells treated with DMSO, T0901317 (3 μM) or T0901317 + Chol. (10 μM). Scale bar represents 20 μm. Pictures represent a compilation of central slices of the Z stacks. Right column (named colocalization) illustrates magnification of only one slice of the central stack. Yellow dots indicate colocalization of both markers. Quantification of colocalized signals was realized using ImageJ software by quantifying the colocalized signal reported to AKT Ser^{473} staining (graph with red columns) or to flotillin-2 staining (graph with green columns). Student's *t*-test: $*P<10^{-7}$. (**b**) LNCaP cells were incubated for 48 h in the presence or absence of T0901317 (3 μM). After 24 h of treatment, 10 μM cholesterol was added to the cell medium. Proteins were collected and AKT, AKT Ser^{473}, poly-ADP-ribosyl-polymerase and β-actin were analyzed by western blot. (**c**) Sub-G1 nuclei accumulation was quantified by flow cytometry. Student's *t*-test: $***P<0.001$.

Sanchez *et al*., 2004). Covalent binding of cholesterol to the Hedgehog family signaling molecules is essential for pathway activity. Moreover, oxysterols have been reported to stimulate expression of two direct target genes of the Hedgehog pathway, glioma-associated oncogene homolog 1 and patched (Dwyer *et al*., 2007).

Fukuchi *et al* (2004b) reported the control of cell proliferation by LXRs. In their experiments, T0901317 decreased the percentage of cells in the S phase through an upregulation of p27kip1. The induction of ABCA1 expression by T0901317 led to the assumption that ABCA1 was the key regulator of the cell cycle in response to LXR activation (Fukuchi *et al*., 2004a). We observed induction of ABCG1 but not of ABCA1 in treated cells. Despite that difference, cholesterol efflux seems to be the common mechanism targeted by LXRs in both cases. This hypothesis was supported by experiments where cholesterol complementation prevented apoptosis of cells treated with T0901317 (Figure 8). This was further substantiated by the effect of methyl-β cyclodextrin, a cholesterol-depleting agent, which induces raft disruption and inactivation of AKT signaling (Li *et al*., 2006).

Beyond LXR activation, oxysterols are also known to regulate apoptosis in various tissues. It is noted that 25-OHC and 7-ketocholesterol induce macrophage apoptosis by targeting AKT degradation. This degradation stimulates the cleavage of mitochondrial BCL family proteins involved in apoptosis through cytoplasmic cytochrome *c* release (Yang and Sinensky, 2000; Rusinol *et al*., 2004). Oxysterols have also been identified as inducing apoptosis in a wide range of models such as human leukemia cell lines (Laffitte *et al*., 2003) or pancreatic β-cells (Choe *et al*., 2007; Meng *et al*., 2009). In these cells, the master lipogenic genes SREBP1c, fatty acid synthase and acyl CoA-carboxylase-α drive an increase in intracellular lipid accumulation, which

results in cell lipotoxicity. Paradoxically, PCa cells exhibit a high activation of the lipogenic pathway, which stimulates growth and proliferation. Accordingly, lipogenic enzymes have been found to be overexpressed in the earliest stages of PCa and in invasive carcinoma (Pizer *et al*., 2001; Swinnen *et al*., 2002; Rossi *et al*., 2003). Likewise, inhibition of acyl CoA-carboxylase-α by soraphen A as well as RNA interference against acyl CoA-carboxylase-α or fatty acid synthase induces growth inhibition and apoptosis (Brusselmans *et al*., 2005; Beckers *et al*., 2007). Production of long-chain fatty acids is thus required for cancer cell promotion. Altogether, these observations indicate that PCa progression is tightly linked to the activation of lipogenesis and concomitant inhibition of cholesterol efflux.

Our data raise the question of the role of circulating cholesterol levels in PCa progression. Epidemiological analyses revealed a positive association between hypercholesterolemia and PCa (Bravi *et al*., 2006; Magura *et al*., 2008). *In vitro*, statins and their derivatives block PCa cell growth (Ukomadu and Dutta, 2003; Mo and Elson, 2004; Sekine *et al*., 2008). Observational studies show a decreased risk of advanced PCa in patients using statins depending on the duration and dosage of the treatment (Demierre *et al*., 2005; Poynter *et al*., 2005; Shannon *et al*., 2005; Murtola *et al*., 2008). Thus, our present study highlights LXR agonists as potent mediators to stimulate cholesterol reverse transport and subsequently to lower cholesterol supply in PCa cells. As already described for statins, decreasing free cholesterol within the cell appears to be a promising way to control prostatic tumor cell survival. Given that reverse cholesterol transport induced by LXRs results in the disruption of lipid rafts and downregulates raft-associated signaling in PCa cells, our findings reinforce the potential use of LXR agonists as pharmacological agents in cancer prevention and anticancer therapy.

Materials and methods

Reagents

The ligands 22(R)-hydroxycholesterol, 25(R)-hydroxycholesterol and 7α-hydroxycholesterol were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France), and T0901317 from Cayman Chemical (Montigny-le-Bretonneux, France). All the ligands used in the cell culture were diluted in DMSO. Water-soluble cholesterol was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection

LNCaP cells were cultured at 37 °C in 5% CO_2 atmosphere in RPMI medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing penicillin and streptomycin (100 μg/ml) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, Nuaillé, France). For LXR RNA interference, LNCaP cells were transfected twice using the Metafecten transfectant reagent (Biontex Martinsried, Planegg, Germany) in 10% fetal bovine serum-supplemented medium with a single 400 pmol/ml small interfering RNA solution alone or in combination during 72 h. Cells were trypsinized and seeded at 2×10^5 in six-well plates. After 12 h, cells were incubated in a fetal bovine serum-depleted medium containing a DMSO or T0901317 solution for 36 h. To silence genes, the following primers were used: siLXRα 5′-AGCA GGGCUGCAAGUGGAATT-3′; siLXRβ 5′-CAGAUCCGG AAGAAGAAGATT-3′; siGFP 5′-ACUACCAGCAGAACA CCCCUUTT-3′. Cells were harvested and protein extraction or flow cytometry analyses were performed. For Myr AKT expression, 12 h after seeding at 2×10^5 cells in six-well plates, cells were transfected using Metafecten with 1 μg of the pCMV6-HA-myrAKT vector (kindly provided by Dr Nahed N Ahmed (Ahmed *et al*., 1997)). After 5 h of transfection, cells were treated for 48 h with 3 μM of T0901317 and the sub-G1 nuclei level analyzed by flow cytometry.

Western blot analysis

Proteins were extracted in HEPES 20 mM, NaCl 0.42 M, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, NP40 1%, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, Na_3VO_4 0.1 mM, NaF 0.1 mM and complete 1X (Roche Diagnostics, Meylan, France). Lysates were centrifuged at 4 °C for 15 min at 15000 *g*. Forty μg of total protein were subjected to denaturing SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary polyclonal antibodies raised against either human anti-ABCA1 or ABCG1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), β-actin or β-tubulin (Sigma-Aldrich), AKT, caspase-3, cleaved-caspase-3, caspase-6, cleaved caspase-6, caspase-9 and cleaved caspase-9 (Cell Signaling, Montigny-le-Bretonneux, France), endothelial growth factor receptor (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), Flotillin-2/ESA (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), poly-ADP-ribosyl-polymerase (Invitrogen), LXRα or LXRβ (Perseus Proteomics, Tokyo, Japan) or Phospho-AKT (Epitomics, Burlingame, CA, USA). A second 1h-incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit or mouse immunoglobulin G (P.A.R.I.S, Compiègne, France) was performed. Peroxidase activity was detected with the Western Lightning System (Perkin-Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France).

Quantitative PCR

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with MMLV-RT (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. The quantitative PCR was performed on an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Four μl of 1:50 diluted cDNA template were amplified by 0.75 U of HotMaster TaqDNA polymerase (Eppendorf, Brumath, France) using SYBR Green dye to measure duplex DNA formation. Primer sequences were as follows: ABCA1 5′-GCACTGAGGAAGATGCTGAA-3′ and 5′-AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTC-3′; ABCG1 5′-CAGG AAGATTAGACACTGTG-3′ and 5′-GAAAGGGGAATGG AGAGAAG-3′; 36b4 5′-GTCACTGTGCCAGCTCAGAA-3′ and 5′-TCAATGGTGCCTCTGGAGAT-3′. 36b4 was used as a housekeeping gene.

Cell immunofluorescence labeling

Cells were treated for 48 h with T0901317 or vehicle with or without cholesterol added for the last 24 h, rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS), and fixed in −20 °C methanol/acetone mixture (50/50: v/v) for 10 min. After rapid washes in PBS, cells were incubated in PBS Triton X-100 0.1% for 10 min. Anti-pAKT Ser473 (Epitomics) and/or anti-Flotillin-2/ESA (BD Transduction Laboratories) immunochemistry was performed in 1.5% normal goat serum/PBS at 4 °C overnight. After washing, the secondary Alexa 555

conjugated anti-rabbit immunoglobulin G and/or Alexa 488 conjugated anti-mouse immunoglobulin G (Invitrogen) was added in 1.5% normal goat serum/PBS for 2 h at room temperature. Slides were mounted with VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and were visualized by Zeiss LSM 510 Meta Confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Xenograft immunostaining and TdT-mediated dUTP nick end labeling analysis
Xenograft immunostaining was performed as follows: paraffin sections were dewaxed and rehydrated through a graded series of ethanol and double distilled water baths. Tissue sections were incubated in 0.1 M citrate buffer pH 6.0 for 5 min in microwave at 350 W. Unspecific epitopes were saturated using bovine serum albumin 1%, fetal bovine serum 1% diluted in PBS 1X at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS 1X, bovine serum albumin 0.1% and incubated at 4 °C overnight. Secondary Alexa 555 conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (Invitrogen) was incubated 1 h at room temperature. To identify apoptosis in tumor sections, TdT-mediated dUTP nick end labeling method was applied using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics). Cell nuclei staining was obtained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 μg/ml. Picture analysis was performed using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope. For apoptotic quantification, the ratio of apoptotic cells to total cells was measured by a threshold method using Image J 1.37v software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Flow cytometry analysis
Cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in RNase A (500 μg/ml), propidium iodide (50 μg/ml) solution and kept 1 h at 4 °C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter fluorescence-activated cell sorter (Beckman Coulter, Roissy, France). The percentage of apoptotic cells was determined by evaluating sub-G1 nuclei accumulation. At least 15 000 events were measured for each sample.

Lipid analysis
Lipids were extracted as previously described (Grizard *et al*., 2000). Blood concentrations of triglycerides, cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol were determined on an automated clinical chemistry analyzer (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Lipid raft analysis
Membrane lipid rafts were isolated by ultracentrifugation on sucrose gradients. Cells were washed twice in PBS, scraped into 350 μl of TNE-Triton X-100 1% buffer (10 mM TRIS, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA). After 5 s of sonication, 2 mg of protein were mixed with 85% sucrose in TNE buffer. A discontinuous sucrose gradient in TNE buffer was then formed by sequential layering, 42,5, 35 and 5% sucrose. Tubes were subjected to ultracentrifugation at 300 000 *g* for 19 h in Beckman Coulter Optima LE-80K swinging rotor SW 40Ti (Beckman) at 4 °C. Eleven fractions were collected from the top of the gradient. Samples were concentrated by methanol/chloroform precipitation (Wessel and Flugge, 1984) and analyzed by western blotting.

Athymic nude mice study
Six- to 8-week-old male Swiss nu/nu mice (Charles River, Chatillon-sur-Chalaronne, France) received subcutaneous injections of 3.10^6 LNCaP cells suspended in Matrigel (BD Bioscience). Three weeks after tumor implantation, either T0901317 or methyl-cellulose vehicle was daily *per os* administered during 1 month. Tumors were measured every 3 days using a caliper, and their volumes were calculated using the formula length × width × height × 0.52 (Umekita *et al*., 1996). Initial tumor volumes were $181 \pm 74\,mm^3$ before treatment. Mice were killed after 1-month treatment. Xenografts were removed and divided into several parts: one was fixed in an ethanol, formaldehyde 37% and acetic acid mixture (7.5:2:0.5; v/v) and embedded in paraffin for histological analysis, and others were snap-frozen in liquid nitrogen for lipid and RNA analyses. Blood plasma samples were obtained just before necropsy by heart puncture on anesthetized mice. All animals were maintained in a controlled environment and animal care was conducted in compliance with the national standards and policies (C 63 014.19). All experiments were approved by the Regional Ethics Committee (protocol CE11-08).

Preparation of plasma membrane sheets for atomic force microscopy/fluorescence
Plasma membranes were prepared as previously described (Frankel *et al*., 2006). Briefly, cleaned glass coverslips were coated with 0.2 mg/ml of poly-L-lysine for 30 min. Living cells were fixed in 0.5% paraformaldehyde in PBS in the presence of Hoechst 33942 for 10 min in the dark at room temperature. The monolayer of cells was inverted and applied onto the coated coverslip in the presence of HEPES buffer (25 mM Hepes pH 7, 25 mM KCl) for 10 min at room temperature in a wet atmosphere to make a 'sandwich.' Coverslips were then separated by flotation, producing a monolayer of membrane sheets, all oriented with the cytoplasmic face-up for simultaneous AFM/fluorescence imaging. Before AFM and fluorescence analyses, flotillin-2 was detected as described above.

Simultaneous AFM and fluorescence imaging
Atomic force microscopy was performed using a commercial AFM Bioscope (Nanoscope IIIa, Digital Instruments, Veeco, Santa Barbara, CA, USA) combined with an inverted optical microscope (Olympus IX 70, Rungis, France) and a fluorescence setup (Leica Camera DFC500, Leica Microsysteme, Nanterre, France). The coverslips with membrane sheets were mounted on a manual XY stage that allowed large range viewing of the sample with an Hg lamp. AFM was operated in contact mode in PBS using a long V-shape silicon nitride cantilever (320 μm in length), with a nominal spring constant of 0.01 mN/m (MLCT-AU microlevers, Veeco) to minimize the force applied to the sample (< 1 nN). The image fields (20 × 20 μm) were obtained at 0.5 Hz; thus, 5–10 min were required to scan the entire sample. The heights and widths of the domains were determined from the AFM topography images using the line profiling routines in Nanoscope software (v5.12, Veeco). The heights of domains ($n = 30$) were measured relative to the surrounding membrane, not relative to the substrate.

Statistical analysis
Student's *t*-test or Mann–Whitney's test was performed to determine whether there were significant differences between the groups. A *P*-value < 0.05 was considered significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue Allier contre le Cancer, FRM and Fondation BNP-Paribas research grants. A Pommier and E Viennois are funded by MNERT and Région Auvergne grants, respectively, and G Alves is funded by Région Auvergne program. We are grateful to ICCF—Imagerie Confocale Clermont-Ferrand—for the help in confocal analyses. We thank JP Saru and A De Haze for molecular biology technical assistance, and C Puchol and S Plantade for animal facilities. We also thank Dr P Val, Dr A Martinez, Dr L Morel and Dr C White for their help in the editing of the paper and for fruitful scientific discussions.

References

Adam RM, Mukhopadhyay NK, Kim J, Di Vizio D, Cinar B, Boucher K *et al*. (2007). Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt. *Cancer Res* **67**: 6238–6246.

Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3627–3632.

Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K *et al*. (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* **67**: 8180–8187.

Bravi F, Scotti L, Bosetti C, Talamini R, Negri E, Montella M *et al*. (2006). Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann Oncol* **17**: 1014–1017.

Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* **65**: 6719–6725.

Brusselmans K, Timmermans L, Van de Sande T, Van Veldhoven PP, Guan G, Shechter I *et al*. (2007). Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* **282**: 18777–18785.

Carson JP, Kulik G, Weber MJ. (1999). Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3′-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Res* **59**: 1449–1453.

Choe SS, Choi AH, Lee JW, Kim KH, Chung JJ, Park J *et al*. (2007). Chronic activation of liver X receptor induces \{beta\}-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis. *Diabetes* **56**: 1534–1543.

Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, 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 Res* **66**: 6482–6486.

Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. (2005). Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* **5**: 930–942.

Dwyer JR, Sever N, Carlson M, Nelson SF, Beachy PA, Parhami F. (2007). Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* **282**: 8959–8968.

Fan L, Pepicelli CV, Dibble CC, Catbagan W, Zarycki JL, Laciak R *et al*. (2004). Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology* **145**: 3961–3970.

Frankel DJ, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Johnson AE, Oliver JM, Wilson BS *et al*. (2006). Revealing the topography of cellular membrane domains by combined atomic force microscopy/fluorescence imaging. *Biophys J* **90**: 2404–2413.

Freeman MR, Solomon KR. (2004). Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* **91**: 54–69.

Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. (2004a). Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**: 7686–7689.

Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Hsu S, Ko AL, Fitzgerald ML *et al*. (2004b). Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**: 7682–7685.

Grizard G, Sion B, Bauchart DD, Boucher D. (2000). Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **740**: 101–107.

Hill MM, Feng J, Hemmings BA. (2002). Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol* **12**: 1251–1255.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A *et al*. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**: 707–712.

Karpen HE, Bukowski JT, Hughes T, Gratton JP, Sessa WC, Gailani MR. (2001). The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem* **276**: 19503–19511.

Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA. (2009). Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 558–563.

Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB *et al*. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5419–5424.

Lawrence JC, Saslowsky DE, Edwardson JM, Henderson RM. (2003). Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. *Biophys J* **84**: 1827–1832.

Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* **168**: 1107–1118 (quiz 1404-5).

Liao Y, Grobholz R, Abel U, Trojan L, Michel MS, Angel P *et al*. (2003). Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer. *Int J Cancer* **107**: 676–680.

Magura L, Blanchard R, Hope B, Beal JR, Schwartz GG, Sahmoun AE. (2008). Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* **19**: 1259–1266.

Meng ZX, Nie J, Ling JJ, Sun JX, Zhu YX, Gao L *et al*. (2009). Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest. *Diabetologia* **52**: 125–135.

Mo H, Elson CE. (2004). Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**: 567–585.

Mouzat K, Volat F, Baron S, Alves G, Pommier AJ, Volle DH *et al*. (2009). Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* **150**: 3369–3375.

Murtola TJ, Visakorpi T, Lahtela J, Syvala H, Tammela T. (2008). Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions. *Nat Clin Pract Urol* **5**: 376–387.

Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB. (2001). Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* **47**: 102–110.

Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS *et al*. (2005). Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* **352**: 2184–2192.

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T *et al*. (2003). Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **1**: 707–715.

Rusinol AE, Thewke D, Liu J, Freeman N, Panini SR, Sinensky MS. (2004). AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 1392–1399.

Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A *et al*. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12561–12566.

Sekine Y, Furuya Y, Nishii M, Koike H, Matsui H, Suzuki K. (2008). Simvastatin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **372**: 356–361.

Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, Beer TM, Derenick R, Palma A *et al*. (2005). Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* **162**: 318–325.

Simons K, Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31–39.

Solomon KR, Rudd CE, Finberg RW. (1996). The association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and heterotrimeric G protein alpha subunits in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6053–6058.

Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L *et al*. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* **98**: 19–22.

Swyer G. (1942). The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* **2**: 372–375.

Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* **17**: 985–993.

Ukomadu C, Dutta A. (2003). Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J Biol Chem* **278**: 4840–4846.

Umekita Y, Hiipakka RA, Kokontis JM, Liao S. (1996). Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11802–11807.

Volle DH, Lobaccaro JM. (2007). Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the 'foie gras', the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* **265-266**: 183–189.

Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L, Tontonoz P. (2004). Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J Biol Chem* **279**: 9905–9911.

Wessel D, Flugge UI. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141–143.

White C. (1909). On the occurence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* **13**: 3–10.

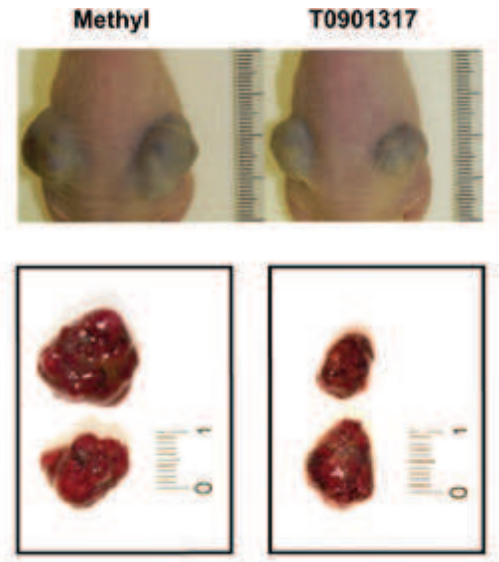
Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH *et al*. (1998). Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* **4**: 1873–1880.

Yang L, Sinensky MS. (2000). 25-Hydroxycholesterol activates a cytochrome *c* release-mediated caspase cascade. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 557–563.

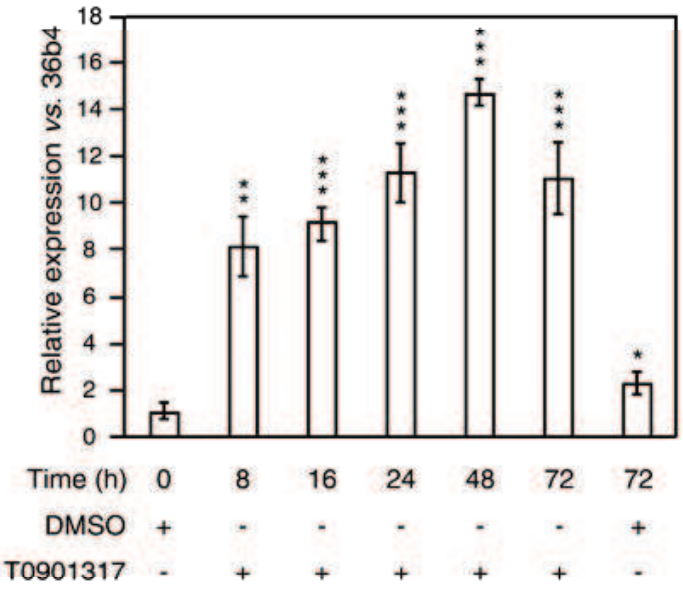
Yuan XJ, Whang YE. (2002). PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* **21**: 319–327.

Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* **115**: 959–968.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)



Supplementary data 1: Nude xenografts Nude male mice were injected with LNCaP cells. Three weeks later, mice were treated with vehicle(methyl-cellulose) or T0901317 (20 mg/kg) once a day for a month. Tumors were measured every 3 days. Two representative xenograft tumors from each group are shown; scales represent 1 cm.



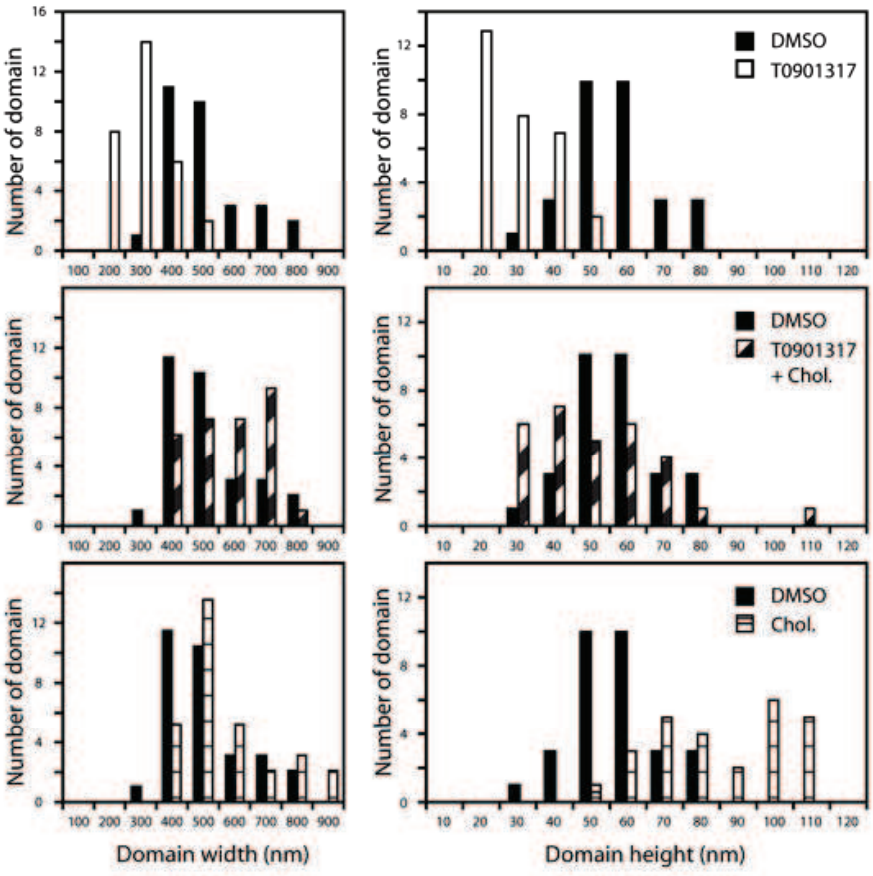
Supplementary data 2: *abcg1 expression was analyzed on LNCaP cells treated with* vehicle (DMSO) or 3 µM of T0901317 by qPCR during a time course induction.

A

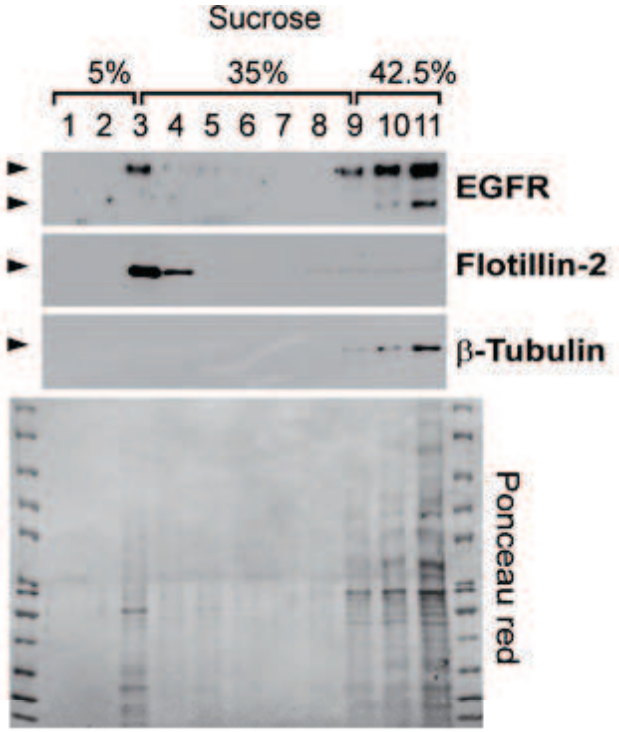
	Width (nm)	Height (nm)
Flat region membrane*		7.2+/-0.8
DMSO	451+/-126	52+/-12
T0901317	259+/-88	24+/-10
T0901317 + Chol.	512+/-122	46+/-18
Chol.	521+/-155	89+/-26

* relative to poly-L-lysine covered substrate

B



Supplementary data 3: **Raft analysis.** A. **S**tatistical analysis of heights and widths domains from LNCaP celles treated with DMSO, T0901317 (1µM), Chol. (10µM) or T0901317+Chol. B. histogram display distribution of domain heights and widths as mesure by cross serction (n=30). Y axis indicates the number of domains and X axis indicates the median size in nm of each group.



Supplementary data 4: Raft isolation. Cells were harvested and subjected to ultracentrifugation in discontinuous sucrose gradient. Cell lysate fractions were collected and analyzed by western blotting. “Low-sucrose” fractions exhibiting enrichment of the raft marker Flotillin-2 (fraction 3) or “high-sucrose” fractions with cytoplasm marker -Tubulin enrichment (fraction 11) were designated respectively as “raft fraction” and “cytoplasmic + membrane fraction”. As expected, EGFR protein was present in both raft and membrane fractions.

Conclusion

Nous montrons que l'activation des LXRs dans les cellules tumorales LNCaP entraine en cascade : 1) l'expression de la cassette d'efflux de cholestérol ABC, 2) une diminution de la quantité de cholestérol intracellulaire, 3) une réduction de la taille des *rafts* lipidiques, 4) l'inhibition de la phosphorylation de la kinase AKT, acteur clé dans les mécanismes de survie cellulaire et 5) la mort des cellules par apoptose. Une complémentation en cholestérol dans le milieu de culture cellulaire bloque l'entrée en apoptose des cellules induite par le T0901317. En effet, le co-traitement avec du cholestérol exogène s'oppose à la réduction de la taille des *rafts* et restaure la phosphorylation de AKT au niveau de ces domaines démontrant donc l'implication du cholestérol dans les mécanismes conduisant à la mort cellulaire suite à l'activation des LXRs. *In vivo*, le traitement par le T0901317 de souris *Nude* xénogreffées diminue le cholestérol intratumoral en stimulant l'expression de la cassette d'efflux ABCA1 et en favorisant le transport inverse *via* les HDL. Ainsi, par ce mécanisme, l'activation pharmacologique des LXRs augmente la mort des cellules par apoptose et réduit la croissance tumorale permettant d'envisager les LXRs comme potentielles cibles thérapeutiques dans le cadre du cancer de la prostate.

Discussion et perspectives

Le but de ces travaux était 1) de mesurer l'implication du cholestérol et des récepteurs nucléaires LXRs dans les processus conduisant à la carcinogenèse prostatique et 2) d'étudier le potentiel thérapeutique des LXRs dans cette pathologie. D'un côté nous montrons que l'accumulation de cholestérol observée dans les cellules prostatiques des souris *lxr-/-* entraîne la répression d'expression de gènes suppresseurs de tumeur, potentiellement *via* des mécanismes épigénétiques, et conduit à l'initiation du développement tumoral. L'absence de ce phénotype chez les souris sauvages, capables de maintenir l'homéostasie intracellulaire du cholestérol, démontre le rôle protecteur des LXRs. D'un autre côté, nos travaux indiquent que le traitement de souris par un agoniste des LXRs conduit à un ralentissement de la croissance tumorale. L'activation pharmacologique de ces récepteurs diminue la quantité de cholestérol intracellulaire et se traduit par une inhibition de la voie de survie AKT *via* un mécanisme faisant intervenir les *rafts* lipidiques.

Ainsi, nos données expérimentales permettent de conclure : 1) qu'une accumulation de cholestérol intracellulaire induit les processus d'initiation tumorale par des mécanismes pouvant mettre en jeu des acteurs épigénétiques comme EZH2, et 2) que les LXRs s'opposent à la fois à l'initiation mais également à la progression tumorale en inhibant l'accumulation de cholestérol intracellulaire.

Ces résultats soulèvent plusieurs questions, les suivantes seront abordées dans cette discussion :

1) Le cholestérol est-il un agent « épimutagène » ?
2) Quelle est la relation entre le cholestérol et EZH2 ?
3) L'invalidation des LXRs serait-elle suffisante pour initier des processus tumoraux?
4) Les LXRs sont-ils à l'origine de la carcinogenèse prostatique chez l'homme?
5) Existe-t-il une association entre l'obésité et le cancer de la prostate ?

I) Le cholestérol est-il un agent « épimutagène » ?

L'implication de EZH2 dans les processus carcinogéniques est précisément décrite et nous incite à penser que la dérégulation de son expression est un événement causal dans la mise en place de la néoplasie prostatique des souris *lxr-/-* nourries avec un régime riche en cholestérol. En effet, les données bibliographiques montrent que EZH2 possède toutes les propriétés d'un oncogène. Sa surexpression stimule la prolifération cellulaire, augmente l'invasion des cellules bénignes *in vitro* (172, 174, 343) et favorise la croissance tumorale *in vivo* (344). A l'inverse, son inhibition induit un arrêt du cycle cellulaire (172, 344) et bloque la croissance tumorale (173) ainsi que la formation de métastases (345). L'augmentation de son expression observée dans les tumeurs prostatiques humaines (172) suggère donc fortement son implication dans la carcinogenèse.

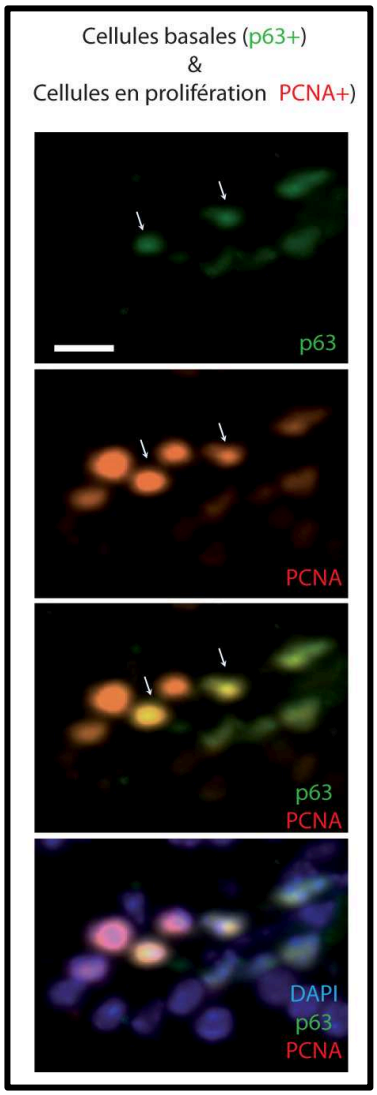


Figure 39 : L'accumulation de cholestérol au niveau de la prostate des souris *lxr-/-* conduit à une hyperprolifération des cellules épithéliales basales, positives pour p63, et de cellules plus différenciées, négatives pour ce marqueur. Marquage d' immunofluorescence sur coupe de prostate dorsale de souris *lxr-/-* âgées de 6 mois et nourries avec un régime riche en cholestérol pendant 5 semaines. Les cellules en prolifération, positives pour PCNA, sont marquées en rouge et les cellules basales, positives pour le marqueur p63, en vert. Les noyaux cellulaires sont visualisés par un marquage au DAPI en bleu. Les flèches désignent les cellules co-marquées pour PNCA et p63. La barre d'échelle représente 10µm.

Nos résultats montrent que l'accumulation intracellulaire de cholestérol dans la prostate des souris *lxr-/-* et dans les cellules PC3 est associée à une augmentation de l'expression de *ezh2*. En corrélation avec la répression des gènes suppresseurs de tumeur *nkx3.1* et *msmb*, connus pour être ciblés par EZH2, ces résultats suggèrent donc fortement la mise en place de modifications épigénétiques conduisant à un profil transcriptomique semblable à celui retrouvé au cours de la carcinogenèse humaine et pouvant ainsi expliquer le phénotype néoplasique des prostates ayant accumulées du cholestérol.

Pour démontrer *stricto senso* l'implication du captage non régulé de LDL *via* LDR et valider l'hypothèse selon laquelle la surcharge en cholestérol intracellulaire est à elle seule responsable de la surexpression de *ezh2* et de la mise en place de la néoplasie, nous proposons respectivement :

- d'invalider LDLR au niveau prostatique chez les souris *lxr*-/-. Une absence de phénotype suite à un régime riche en cholestérol chez ces souris démontrerait le rôle clé du captage de LDL par LDLR dans la mise en place de l'hyper-prolifération des cellules.
- d'utiliser d'autres modèles murins pour mimer l'accumulation de cholestérol au niveau des cellules prostatiques. Par exemple, nous pourrions envisager de nourrir avec un régime riche en cholestérol des souris surexprimant LDLR ou invalidées pour IDOL spécifiquement au niveau de la prostate. La complémentarité de ces modèles permettrait ainsi de s'affranchir de potentiels effets « colatéraux » dus à la perte fonctionnelle des LXRs chez les souris *lxr-/-* et de valider l'accumulation de cholestérol comme unique évènement responsable du phénotype néoplasique.

Pour l'instant, afin d'évaluer le potentiel « épimutagène » du cholestérol sur les souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol, il est nécessaire d'identifier les cellules hyper-prolifératives au niveau de l'épithélium prostatique et d'évaluer leur capacité à transmettre leur dérégulations épigénétiques.

1) Quelles sont les cellules hyper-prolifératives au niveau de l'épithélium prostatique des souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol ?

Une des caractéristiques du phénotype néoplasique observé au niveau des prostates des souris *lxr-/-* surchargées en cholestérol est la formation de foyers, ou bourgeons, regroupant plusieurs cellules en prolifération (Figure 39). Le co-marquage des cellules en cours de division (positives pour PCNA), et des cellules basales (positives pour p63) montre la présence de deux types de cellules en prolifération : une population de cellules exprimant p63 et une autre population négative pour ce marqueur (Figure 39).

Au niveau de l'épithélium prostatique, une première sous-population regroupe les cellules luminales différenciées et identifiées par un marquage $CK8^{+}$; $p27^{kip1+}$ $CK5^{-}$; $p63^{-}$. La deuxième sous-population de cellules épithéliales, en contact avec la lame basale, est identifiée par un marquage

positif pour $p63^{+}$; $CK5^{+}$; $p27^{kip1-}$; $CK8^{-}$, $ki67^{-}$ (346). Il s'agit des cellules basales qui assurent le renouvellement extrêmement lent de l'épithélium prostatique, quiescent en conditions physiologiques. Un faible pourcentage de cellules basales est constitué de cellules progénitrices, positives pour le marqueur de surface SCA-1 et de cellules souches $SCA\text{-}1^{+}$ et $CD133^{+}$. En conditions normales, ces cellules souches ont la propriété de se diviser de manière asymétrique pour s'auto-renouveler et former en parallèle des cellules basales capables de se différencier.

Ce co-marquage p63 et PCNA indique donc que l'accumulation de cholestérol au niveau de la prostate est capable d'induire la prolifération à la fois des cellules basales ($p63^{+}$) et d'autres cellules négatives pour p63. La position des cellules $PCNA^{+}$; $p63^{-}$ entre les cellules basales et proche de la lumière des acini, suggère fortement qu'il s'agisse de cellules plus différenciées telles que les cellules épithéliales intermédiaires. Des marquages immuno histochimiques supplémentaires sont nécessaires, notamment avec les anticorps SCA-1 et CD133, pour analyser plus précisément la nature des cellules basales et déterminer si les cellules souches sont hyper-prolifératives, mais également avec des anticorps ciblant les cellules luminales, tels que CK8 et $p27^{kip1}$ afin de préciser l'identité des cellules $PCNA^{+}$; $p63^{-}$.

Dans tous les cas, la proximité des cellules en division peut suggérer que l'hyper-prolifération des cellules présentes dans ces foyers est issue de la perte des mécanismes régulateurs du cycle cellulaire d'une seule cellule « progénitrice » ou du moins basale, positive pour p63, capable de transmettre ses dérèglements au cours d'une division asymétrique donnant ainsi lieu à la formation d'une cellule négative pour p63, toujours capable de proliférer. Plusieurs arguments appuient cette hypothèse.

L'origine des cellules cancéreuses chez l'homme reste très controversée. Il a été initialement suggéré que les cellules épithéliales luminales (347, 348) étaient à l'origine de la carcinogenèse puisque les cellules cancéreuses exprimaient les marqueurs de différenciation AR, CK8, CK18, et PSA mais n'exprimaient pas p63. De plus, les cellules exprimant les marqueurs de cellules basales tels que CK5 étaient rarement observées dans les tumeurs. D'après ces données, les cellules cancéreuses proviendraient donc du compartiment épithélial intermédiaire de cellules ayant acquis les capacités d'auto-renouvellement (349). En revanche, des données plus récentes reposent la question de l'implication des cellules souches/progénitrices dans la carcinogenèse. Premièrement, les cancers avancés sont androgéno-indépendants et les cellules qui composent les métastases sont phénotypiquement semblables aux cellules basales (350). De plus, Craft *et al*. montrent que les tumeurs androgéno-indépendantes sont originaires d'une expansion clonale de cellules AR^{-}. Deuxièmement, l'altération génomique de type fusion TMPRSS2-ETS (page 27) observée dans 50 % des tumeurs prostatiques (351) et 20% des néoplasies intra-épithéliales (352) est également retrouvée au niveau des cellules souches CD133+ (353). Ainsi, l'origine des cellules cancéreuses n'est pas clairement établie chez l'homme mais l'implication des cellules souches/ progénitrices n'est pas exclue.

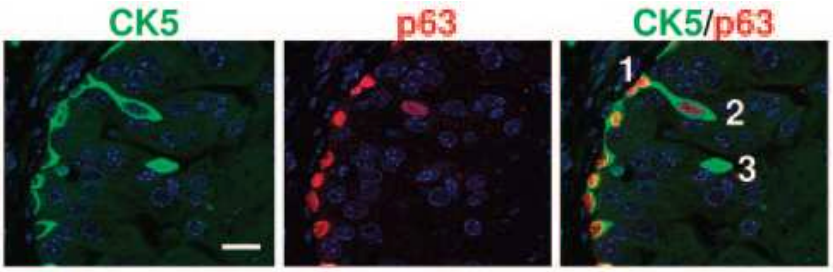


Figure 40 : Exemple de division asymétrique d'une cellule épithéliale basale au niveau de la prostate dans le modèle de souris *pten-/-*. Co-marquage d'immunofluorescence sur coupe de prostate dorsale de souris *pten-/-*. CK5 en vert, et p63 en rouge, marquent les cellules basales. (1) Une cellule basale en contact avec la lame basale qui exprime p63 et CK5. (2) Une cellule issue de la division asymétrique de la cellule précédente (1) exprimant CK5 et faiblement p63. Cette cellule est en train de perdre le contact avec la lame basale. (3) Une cellule exprimant uniquement CK5 et ayant perdu le contact avec la lame basale. La barre d'échelle représente 20 µm. D'après Wang et al, 2006 (346).

Le modèle de carcinogenèse prostatique murin *pten-/-* présente, comme chez les souris *lxr-/-* nourries avec un régime riche en cholestérol, des cellules prolifératives sous forme de bourgeons au cours du développement cancéreux. D'ailleurs, on peut noter que le profil transcriptomique de ces deux modèles est très comparable (données non montrées). Dans la prostate dorsale des souris *pten-/-*, les images d'immunofluorescence de Wang *et al.* illustrent l'exemple de la division asymétrique d'une cellule basale qui donne lieu à la formation de cellules très particulières. En effet, une des cellules issue de la division perd le marquage p63 tout en conservant l'expression de CK5 en quittant la lame basale (figure 40) (346). Dans l'épithélium prostatique sain de souris sauvages, toutes les cellules positives pour CK5 le sont également pour p63. La présence de cellules $p63^-$; $CK5^+$ est donc complètement anormale (Figure 40). Aux stades avancés de la progression tumorale, une grande partie des cellules exprimant CK5 ne sont plus marquées pour p63 et migrent vers la lumière de la glande (346). En parallèle, le comptage des différents types cellulaires dans la prostate des souris *pten-/-* âge de 7 semaines (stade de néoplasie intra-épithéliale avancée) révèle une augmentation modérée du pourcentage de cellules exprimant p63 mais une nette élévation du nombre de cellules positives pour SCA-1 (346). Ceci indique que dans ce modèle, la carcinogenèse est associée à une augmentation de la prolifération des cellules basales et particulièrement des cellules progénitrices capables de se diviser de manière asymétrique et ainsi de se retrouver fortement représentées. En revanche, le nombre de cellules positives uniquement pour p63 n'augmente que modérément car les cellules issues de cette division asymétrique semblent perdre le marquage p63 en quittant la lame basale.

L'ensemble de ces données montrent donc que l'accumulation de cholestérol au niveau de la prostate des souris *lxr-/-* augmente la capacité proliférative des cellules progénitrices basales qui pourraient se diviser de manière asymétrique pour former des cellules $p63^-$, conservant une activité de prolifération à l'origine des bourgeons de cellules proliférantes. Néanmoins, comme mentionné ci-dessus, des co-marquages histologiques sont nécessaires afin de confirmer l'identité et le lignage des cellules prolifératives. De plus, il serait intéressant d'évaluer, par des techniques de quantification précises telles que la cytométrie en flux, la proportion des différents types cellulaires qui composent l'épithélium prostatique des souris *lxr-/-* surchargé en cholestérol afin de mettre en évidence l'expansion d'une population précise pouvant être à l'origine du phénotype néoplasique.

2) Peut-on envisager l'existence d'une transmission de la « mémoire transcriptionnelle » depuis les cellules progénitrices dans ce modèle ?

Si l'hypothèse de la division asymétrique est avérée, alors la conservation des capacités prolifératives par les cellules issues de cette division signifie que les cellules progénitrices sont capables de transmettre, du moins en partie, leurs dérégulations transcriptionnelles responsables d'une activité de prolifération incontrôlée. Ce type de mécanisme est tout à fait envisageable au niveau des cellules somatiques puisqu'ils sont connus pour être impliqués au cours du développement lors du

lignage, de la différenciation et du maintien des caractères cellulaires différenciés (354). On parle de « mémoire transcriptionnelle » ou de « mémoire cellulaire » pour évoquer le maintien épigénétique de l'expression des gènes. Les mécanismes impliqués dans la mise en place de cette mémoire transcriptionnelle sont complexes et font l'objet d'intenses recherches. La méthylation de l'ADN par les DNMTs (355, 356) et la modification post-traductionnelle des histones par les protéines du groupe des Polycomb (357, 358) sont les principaux systèmes épigénétiques impliqués dans la répression génique transmissible lors de la mitose. La surexpression de l'histone méthyltransférase *ezh2,* observée au niveau des prostates néoplasiques des souris *lxr-/-* associée à la présence de foyers de prolifération, suggère donc la mise en place de modifications épigénétiques (répressives) conduisant à un profil d'expression génique transmissible et favorable à la division.

Ceci serait cohérent avec l'hypothèse émergente, évoquée en introduction bibliographique (page 37), selon laquelle des perturbations épigénétiques ayant lieu précocément dans des cellules progénitrices donneraient lieu à la formation d'une population polyclonale de précurseurs à l'origine du développement tumoral. Dans ce cas, le cholestérol pourrait être considéré comme un agent « épimutagène » à l'origine de l'initiation du développement tumoral.

Cependant, lorsque les souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol sont replacées sous régime contrôle pendant quatre semaines, l'expression de *ezh2*, le niveau de prolifération ainsi que l'homéostasie de l'épithélium prostatique redeviennent comparables à ceux des souris témoins. D'après cette observation, nous serions tentés d'exclure l'hypothèse des cellules « progénitrices capables de transmettre un patrimoine épigénétiquement modifié par le cholestérol ». En effet dans cette situation, malgré les 4 semaines de régime contrôle et en dépit du retour au niveau basal de l'expression de *ezh2*, nous aurions dû observer une persistance de la prolifération des cellules déjà affectées par les modifications épigénétiques. Ici, le retour au niveau basal de l'expression de *ezh2* et de ces cibles *nkx3.1* et *msmb* témoigne davantage une plasticité des mécanismes mis en jeu dans l'hyperprolifération induite par le cholestérol. Les données de la littérature montrent un dialogue entre la modification des histones et la méthylation de l'ADN. En effet, EZH2 est capable d'interagir avec les DNMT pour favoriser la méthylation de l'ADN (186). Ce processus semble être mis en jeu afin de pérenniser la répression génique comme dans l'inactivation du chromosome X par exemple (359-361). En parallèle, des travaux récents montrent que la répression transcriptionelle des gènes hyperméthylés persiste après l'inhibition de EZH2 par siRNA en culture de cellules. A l'inverse, dans ces conditions, les gènes faiblement méthylés au niveau de l'ADN se ré-expriment (187). Ces données montrent donc que, contrairement à la méthylation de l'ADN qui semble plus pérenne, les changements de marques d'histones peuvent être réversibles et, dans le cas présent, permettent le « déverrouillage » des promoteurs des gènes codant *msmb* et *nkx3.1* et ainsi, le rétablissement de la quiescence de l'épithélium. Ce cas de figure exclurait donc l'implication de la méthylation de l'ADN dans la mise en place de la néoplasie. Ainsi, nous pouvons imaginer que les cellules récupèrent leurs mécanismes régulateurs du cycle cellulaire lorsqu'elles se retrouvent exposées à des quantités physiologiques de

cholestérol intracellulaire, permettant un retour d'expression de *ezh2* au niveau basal. Mais alors dans ce cas, comment expliquer la formation de foyers de prolifération ?

Une autre hypothèse peut être envisagée. En effet, nous observons une quantité importante de cellules en apoptose dans la lumière des prostates de souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol. Les images histologiques indiquent un détachement des cellules épithéliales. Durant les 4 semaines de régime de « récupération », il est possible que les cellules initialement hyperprolifératives se soient détachées pour aller mourir par apoptose dans la lumière des prostates conduisant alors à l'élimination des cellules « épigénétiquement modifiées ». Ainsi, l'hypothèse des cellules progénitrices serait relancée et l'implication de la méthylation de l'ADN à reconsidérer. Dans tous les cas, la présence de cellules apoptotiques suggère l'existence de mécanismes protecteurs de l'intégrité tissulaire limitant le développement de la néoplasie dans ce contexte.

Au regard de ces données, plusieurs perspectives sont envisageables. Tout d'abord, afin de valider l'implication de EZH2 dans la mise en place du phénotype néoplasique :

- Nous devons montrer un enrichissement de la marque H3K27me3 sur les promoteurs des gènes codant *nkx3.1* et *msmb* dans les prostates de souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol.
- Sur des temps de régime plus courts, nous proposons d'étudier la cinétique des événements conduisant à la mise en place de la néoplasie chez les souris *lxr-/-* exposées au cholestérol. Une augmentation d'expression de *ezh2* précédant la répression des gènes suppresseurs de tumeur et la prolifération des cellules appuierait une relation de cause à effet.
- Dans l'optique d'inverser le phénotype néoplasique, il serait très pertinent de traiter les souris avec un inhibiteur de EZH2 tel que le DZNeP pendant la période de régime.
- Il serait intéressant de pouvoir prolonger le temps d'exposition des souris *lxr-/-* au régime riche en cholestérol afin d'étudier l'évolution de la néoplasie. En effet, il est possible qu'à long terme, la forte activité de prolifération des cellules conduise fatalement à l'apparition de mutations pouvant toucher des gènes oncogéniques ou suppresseurs de tumeur, conduisant alors à la formation de carcinomes. Pour cela nous proposons l'utilisation de souris invalidées pour les LXRs spécifiquement au niveau de la prostate. En effet, l'absence d'expression des LXRs au niveau du foie dans notre modèle de souris « KO total » est responsable d'une stéatose hépatique conduisant à la mort des animaux exposés au régime riche en cholestérol sur une période supérieure à 6 semaines.

II) Quelle est la relation entre le cholestérol et EZH2 ?

C'est une question majeure qui se pose au regard de nos travaux. Plusieurs hypothèses, schématisées sur la Figure 41, peuvent être envisagées pour expliquer la dérégulation d'expression de *ezh2* observée dans les cellules exposées au cholestérol.

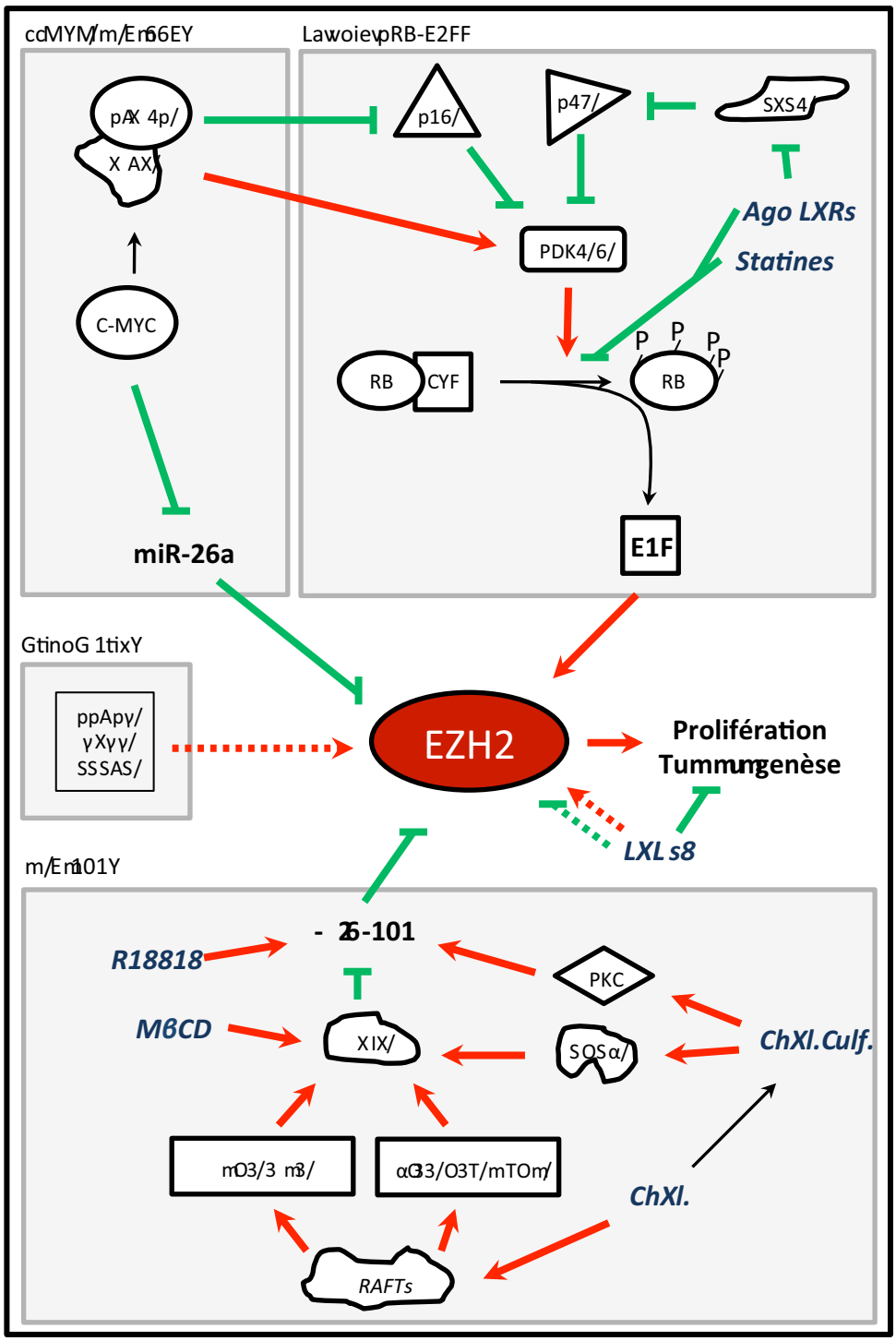


Figure 41 : Schéma synthétisant les différentes hypothèses des voies moléculaires pouvant être mises en jeu dans le contrôle de l'expression de *ezh2*. Pour la description, se référer au texte. Les activations sont figurées en rouge et les inhibitions en vert. Les traits pleins symbolisent un lien bibliographique, les pointillés sont des liens hypothétiques. Les pointes de flèches symbolisent une activation et les « T », une inhibition.

1) La voie pRB-E2F

Bracken *et al.* montre un contrôle transcriptionnel positif de l'expression de *ezh2* par la protéine E2F. Ce facteur de transcription, régulé négativement par pRB (*retinoblastoma protein*), permet l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. L'inactivation de pRB par mutation, perte d'hétérozygotie ou diminution d'expression est fréquemment observée dans les cancers et conduit à une hyperactivation de E2F (147). Les auteurs proposent un modèle selon lequel cette hyperactivation de E2F induit l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et stimule en parallèle l'expression de *ezh2* favorisant ainsi la carcinogenèse (174). Le traitement de cellules tumorales mammaires par la lovastatine, agent hypocholestérolémiant, inhibe l'expression et l'activité E2F, potentiellement par une inhibition de la phosphorylation de pRB (362). De plus, l'activation de LXRs dans le même type de cellules induit l'inhibition de la phosphorylation de pRB (363). Malgré l'absence de données à ce sujet, l'augmentation de l'expression de la cassette d'efflux de cholestérol ABCA1 suggère une diminution de la quantité de cholestérol dans ces cellules suite à l'activation des LXRs, similaire à celle retrouvée dans les cellules LNCaP par nos travaux (364). Ces données laissent donc penser que la voie de signalisation pRB-E2F, capable d'activer l'expression de *ezh2*, peut être sensible aux variations de cholestérol intracellulaire.

Par ailleurs, on ne peut pas exclure l'hypothèse d'une dérégulation de CDK4 et CDK6, responsables de la phosphorylation de pRB (365). De même, plus en amont, nous pouvons envisager que les variations de quantité de cholestérol intracellulaire soient associées à une dérégulation de $p16^{Ink4A}$ et/ou $p27^{kip1}$ qui inhibent l'activité de CDK4 et CDK6 (365). En accord avec ces données, l'activation de l'efflux de cholestérol dans les cellules LNCaP par des agonistes de LXRs entraine une augmentation de niveau protéique de $p27^{kip1}$ *via* une répression de SKP2 responsable de sa dégradation par le protéasome (342). En parallèle, le traitement de cellules de médulloblastome par la lovastatin est associé à l'augmentation du niveau de $p27^{kip1}$ (366).

L'ensemble de ces données montrent que la variation en quantité de cholestérol intracellulaire, induite par l'activation des LXR ou par des statines, peut activer à différents niveaux la voie de signalisation pRB-E2F pouvant ainsi expliquer la modulation de l'expression de *ezh2*. Ainsi, il est possible d'envisager une augmentation de la phosphorylation de pRB et/ou d'activité des protéines E2F ayant pour conséquence la surexpression de *ezh2* au niveau des cellules prostatiques des souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol et dans les cellules PC3 exposées aux LDL.

2) c-MYC/miR-26a

Dans des cellules de lymphomes, l'expression de *ezh2* est indirectement contrôlée par l'oncogene c-MYC *via* miR-26a. En effet, la surexpression de c-MYC conduit à l'inhibition de miR-26a, responsable de la répression de *ezh2* et se traduit par une diminution de la prolifération cellulaire

(175). c-Myc est surexprimé dans 70 % des tumeurs humaines par altération des voies de signalisation ou par des aberrations génétiques telles que des amplifications et des translocations du gène (367, 368).

De manière intéressante, C-MYC, en s'hétérodimérisant avec MAX (*Max MYC associated factor X*) stimule l'expression de *cdk4* et de *cyclin d2* et favorise la dégradation protéasomale de $p16^{Ink4A}$ conduisant ainsi à l'activation de la voie pRB-E2F (367).

Ces données suggèrent que l'activation de C-MYC pourrait conduire à la stimulation de l'expression de *ezh2* par deux mécanismes, l'inhibition de miR-26a et l'activation de la voie pRB. Contrairement à la voie de signalisation pRB-E2F, le traitement par la lovastatine ne modifie pas le niveau de C-MYC (366). De plus, l'expression de *c-myc* n'est pas modifié par le T0901317 dans les cellules LNCaP (342), ce qui amène à penser que C-MYC n'est pas sensible aux variations de cholestérol intracellulaire et qu'il ne serait donc pas impliqué dans les mécanismes conduisant à la surexpression de *ezh2*.

3) miR-101

Un autre microRNA, miR-101, est également capable de contrôler l'expression de *ezh2* et la prolifération cellulaire (176, 369). Varambally *et al.* montrent que la perte génomique mono- ou bi-allélique du gène codant ce miR, observée dans 37,5% des cancers localisés et 66,7% des cancers métastasiques de la prostate est corrélée à l'augmentation d'expression de *ezh2* (176). Quels sont les facteurs connus pour être impliqués dans régulation de l'expression de miR-101 ?

 Une étude montre que le traitement de cellules tumorales prostatiques par un androgène de synthèse, le R1881, pourrait stimuler l'expression de miR-101 (370), ce qui suggère que les androgènes s'opposeraient à l'expression de *ezh2*. D'un côté, ceci est cohérent puisque la progression tumorale prostatique est associée à la perte de l'androgéno-dépendance des cellules et à l'augmentation de l'expression de *ezh2*. D'un autre côté, concernant le lien entre le cholestérol et l'expression de *ezh2*, ce résultat est difficile à interpréter. En effet le cholestérol peut être utilisé localement pour la synthèse de testostérone par les cellules tumorales prostatiques humaines qui possèdent l'équipement enzymatique pour cette transformation (371). Ainsi on peut suggérer que l'augmentation de cholestérol intracellulaire observée dans les tumeurs humaines puisse conduire à une augmentation de la synthèse locale d'androgènes et donc à une stimulation de miR-101. Dans ce cas, il est difficile d'envisager une augmentation de l'expression de *ezh2* au cours de la progression tumorale. Or, les données de la littérature montrent une surexpression de *ezh2* au fur et à mesure de l'avancée de la pathologie. De plus, l'existence d'une voie métabolique permettant la synthèse d'androgènes à partir du cholestérol au niveau des cellules prostatiques murines n'est pas décrite à ce jour. Cette hypothèse n'est donc pas en accord avec les données de la littérature et nous incite à

exclure l'idée d'une régulation de l'expression de *ezh2* par le cholestérol *via* l'action des androgènes sur miR-101.

 Dans des cellules hépatiques HepG2, l'activation de la PKC par le TPA (*2-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*) stimule l'expression de miR-101. Un co-traitement avec un inhibiteur de ERK bloque l'induction de miR-101, la diminution de EZH2 et l'inhibition du cycle cellulaire induite par le TPA, démontrant ainsi l'implication de la voie ERK dans le contrôle de l'expression de miR-101 par la PKC (372). Le cholestérol sous sa forme sulfaté est capable d'activer différentes isoformes de la PKC (pour revue lire (373)), ce qui indiquerait que l'accumulation de cholestérol, si elle se traduit par une augmentation de sa forme sulfatée, inhiberait l'expression de *ezh2* par la stimulation de mir-101 *via* la PKC, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse.

 L'activation des facteurs de transcription HIF-1α et HIF-1β (*hypoxia inducible factor*) par la *deferoxamine mesylase* inhibe l'expression de miR-101 (370). Existe-t-il une relation entre les facteurs HIF et le cholestérol ?

D'un côté, une déplétion en cholestérol induite par la MβCD (méthyl-β-cyclodextrine) augmente l'expression de HIF-1α pouvant suggérer que la présence de cholestérol inhibe HIF-1α et par conséquent favorise la dégradation de l'ARNm de *ezh2* en maintenant l'expression de miR-101. La prise en compte de ces données exclurait l'implication de HIF-1α dans les mécanismes conduisant à la surexpression de *ezh2* dans les cellules accumulant du cholestérol.

D'un autre côté, les études montrent que la traduction de HIF-1α est augmentée en réponse à de nombreux facteurs de croissance qui induisent l'activation des voies de signalisation impliquant des médiateurs intracellulaires tels que PI3K (*phospho-inositid-3-OH kinase*)/AKT/mTOR (*mamalian target of rapamycin*) ou RAF/MEK (*mitogen-activated protein kinase*) (374). Les données bibliographiques ainsi que nos travaux démontrent clairement que le cholestérol favorise l'activation de ces voies par des mécanismes mettant en jeu la coalescence des *rafts* lipidiques dans les cellules tumorales humaines (256, 276, 364). Par exemple, les travaux de Zhuang *et al.* montrent qu'un apport important de cholestérol stimule la phosphorylation de AKT au niveau des *rafts* et augmente ainsi la croissance tumorale. A l'inverse, le traitement par la simvastatine, inhibiteur de la synthèse de cholestérol, ou une activation de l'efflux de cholestérol suite à l'activation des LXRs, diminue le cholestérol intracellulaire et bloque la phosphorylation de AKT (276, 364).

L'analyse du niveau de phosphorylation de AKT par *western blot* (résultats non montrés) indique que cette voie n'est pas mise en jeu dans la surexpression de *ezh2* et oriente l'hypothèse vers la voie RAF/MEK. Par ailleurs, RORα (*Retinoic acid receptor-related orphan receptor α*), potentiellement activable par le cholestérol et ses dérivés, particulièrement le cholestérol sulfaté (375, 376), stimule la transcription de HIF-1α (377), ce qui constituerait un autre lien entre le cholestérol, mir-101 et l'expression de *ezh2*. Ainsi, ces données permettent d'envisager que l'accumulation de cholestérol observée dans les cellules de prostates *lxr-/-* ou dans les cellules PC3 exposées aux LDL

puisse conduire, en réponse exagérée à des facteurs de croissance (*via* la voie RAF/MEK) et/ou par l'activation de RORα, à une dérégulation des protéines HIF et ainsi à la surexpression de *ezh2* par l'inhibition de miR-101.

4) Des facteurs de transcription régulant l'expression de *ezh2* ?

L'étude du promoteur de *ezh2* avec le logiciel de prédiction d'éléments de réponse *in silico* Matinspector (Genomatix®) révèle la présence de sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription pertinents car en relation plus ou moins proche avec le métabolisme du cholestérol tels que des PPARE (*peroxisome proliferator-activated receptor response element*), des SRE (*sterol response element*) et des RXRE (*retinoid X receptor response element*) (Volle DH, communication personnelle).

Les SRE sont des éléments de réponse aux facteurs de transcription SREBP1 et 2. Alors que SREBP1 a et 1c sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie des triglycérides, SREBP2 est responsable de celle du cholestérol. L'activation de SREBP2 par clivage suite à son association avec SCAP est réservée aux conditions de faible concentration en stérol intracellulaire. De manière attendue, nous n'avons pas retrouvé par *western blot* de clivage des SREBP dans les prostates de souris *lxr-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol (résultats non montrés), ce qui exclut l'hypothèse d'une activation de l'expression de *ezh2* par les SREBP dans ce contexte.

En revanche, la présence de PPARE et de RXRE dans le promoteur de ezh2 est plus intrigante puisque notre analyse transcriptomique révèle une surexpression de *pparγ* (*fold change* = +2 ; *p-value*<10^{-11}) et de *rxrγ* (*fold change* = +14 ; *p-value*<10^{-20}) dans les prostates qui surexpriment *ezh2*. Cependant, la dérégulation de *pparγ* apparaît également dans la prostate des souris *lxr-/-* nourries avec le régime contrôle qui ne présentent pas de surexpression de *ezh2,* ce qui suggère que l'augmentation d'expression de *pparγ* ne soit pas suffisante, du moins à elle seule, pour expliquer la surexpression de *ezh2*. Il n'y a pas d'argument bibliographique permettant de relier l'accumulation de cholestérol à la dérégulation de RXRγ, mais de par sa capacité à s'hétérodimériser avec les LXRs, cette surexpression soulève l'idée de la mise en place, en l'absence des LXR, d'un possible mécanisme compensatoire pour répondre à la surcharge en cholestérol. Dans tous les cas, nous ne pouvons pas exclure son implication dans le contrôle de l'expression de *ezh2*.

5) *Ezh2*, un gène cible des LXRs ?

Est-il possible que *ezh2* soit un gène cible des LXRs et que l'absence d'une répression par les LXRs sur *ezh2* en condition d'accumulation de cholestérol soit responsable de sa surexpression? De manière inattendue, l'activation des LXRs par du T0901317 entraîne une augmentation de l'accumulation de la protéine EZH2 dans les cellules LNCaP dès 24 heures étayant ainsi l'hypothèse

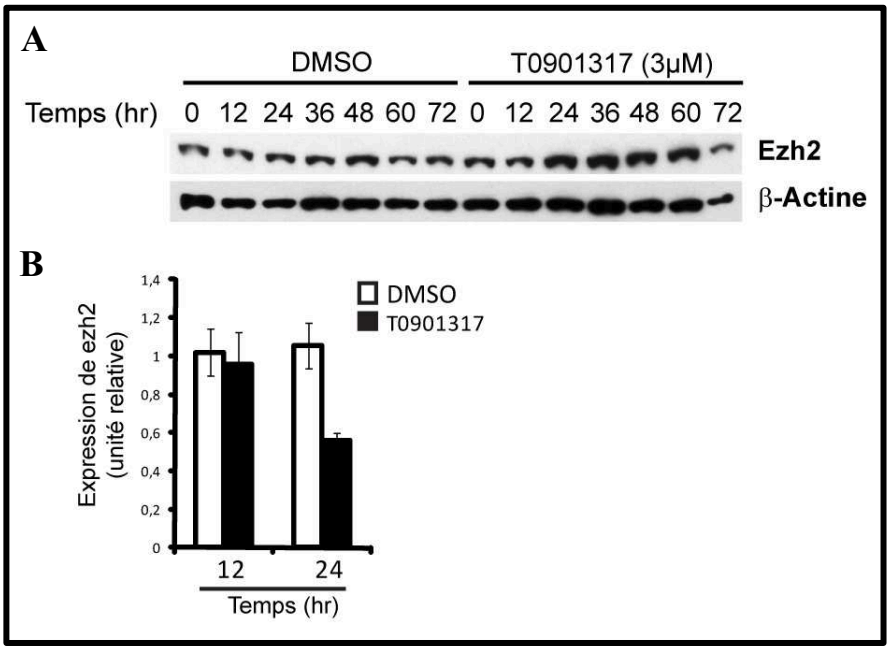


Figure 42 : Ezh2 est-il un gène cible des LXR? Les cellules ont été traitées avec du T0901317 (agoniste des LXRs) ou par le DMSO en milieu minimum pendant une durée allant jusqu'à 72 heures. Les niveaux d'accumulation de protéines et d'ARNm de EZH2 ont été quantifiés par Western blot (A) et q-PCR (B).

d'un gène cible des LXRs (Figure 42). En revanche l'analyse par qPCR ne révèle pas d'augmentation du transcrit *ezh2* suite à l'activation des LXRs mais au contraire une répression observée à 48 heures (Figure 42). Il y a différentes manières d'interpréter ce résultat mais avant tout il faut souligner que cette augmentation protéique de EZH2 est très surprenante. En effet, EZH2 est généralement un facteur associé entre autre à la prolifération cellulaire. Ici, les cellules traitées au T0901317 présentent non seulement un ralentissement du cycle cellulaire (résultats non montrés), mais sont également sur le point de rentrer en apoptose (364) ce qui soulève la question de la pertinence physiologique d'une telle régulation et complique l'interprétation des résultats.

 L'augmentation protéique de EZH2 n'est pas corrélée à une régulation transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle, il s'agit donc probablement d'un mécanisme post traductionnel. Trois possibilités majeures peuvent être envisagées. 1) L'activation des LXRs conduit à l'inhibition d'un facteur impliqué dans la dégradation de EZH2 par le protéasome, mécanisme similaire à celui mis en jeu pour la régulation de p27 par SKP2 dans des cellules LNCaP traitées par du T0901317 (342). 2) Il pourrait s'agir d'un mécanisme plus indirect par lequel la diminution de cholestérol, qui apparaît à 16 heures de traitement et précède donc l'augmentation de EZH2, serait responsable de l'inhibition de la dégradation protéasomale. 3) L'activation des LXRs conduit à la synthèse d'acides gras et à la formation de triglycérides. Certains acides gras, notamment de type ω3, sont capables de moduler la dégradation par le protéasome de EZH2. Ainsi nous ne pouvons pas exclure ce type de mécanisme dans les cellules LNCaP traitées au T0901317.

 Concernant la régulation transcriptionnelle, quatre hypothèses sont possibles. 1) l'activation des LXRs peut conduire, de manière directe, à la répression transcriptionnelle de *ezh2*. Ainsi, *ezh2* serait un nouveau gène cible de l'hétérodimère LXR-RXR et sa surexpression observée dans les prostates des souris *lxr-/-* serait due à une absence de sa répression par LXRs. 2) Il peut s'agir d'un mécanisme indirect passant par la baisse de cholestérol intracellulaire et mettant en jeu pRB-E2F, HIF/miR-101, évoqués ci-dessus, impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *ezh2* et sensibles aux variations de cholestérol intracellulaire. 3) L'activation des LXRs induit l'expression des SREBP. En effet, la présence de SRE dans le promoteur de *ezh2* permet d'envisager une répression transcriptionnelle indirecte par ces facteurs, suite au traitement au T0901317. 4) Malgré l'absence d'argument bibliographique, il est possible d'envisager l'existence d'un rétrocontrôle négatif de EZH2 sur son propre gène. Dans ce cas, la répression transcriptionnelle de *ezh2* ne serait que la conséquence de l'accumulation protéique dont les possibles origines sont décrites au point précédent.

Les données actuelles ne permettent pas de conclure quant aux possibles contrôles post-transcriptionnel et transcriptionnel, direct ou indirect, de EZH2 par LXRs. Dans tous les cas, ces données appuient l'existence d'une relation entre l'homéostasie du cholestérol contrôlée par LXR et la modification des marques épigénétiques par EZH2.

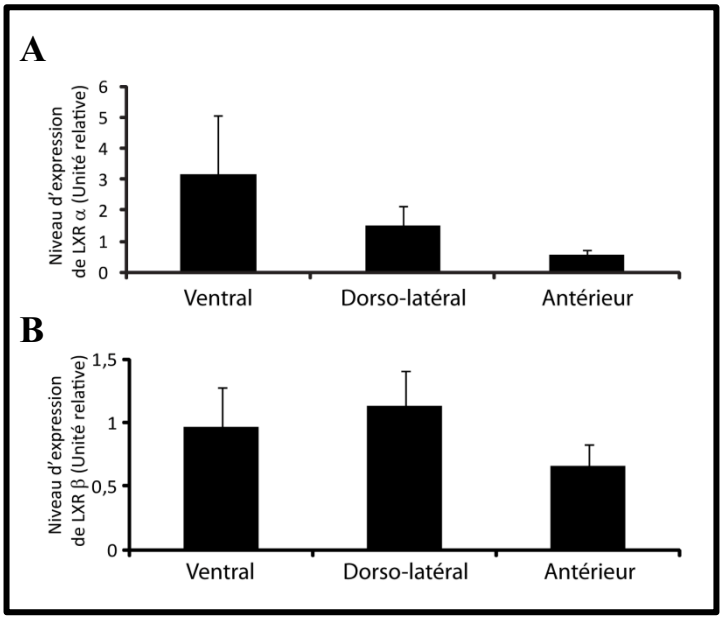


Figure 43 : Expression relative de gènes codant LXRα et LXRβ dans les lobes prostatiques chez la souris. Les niveaux d'expression de *lxrα* (A) et *lxrβ* (B) ont été quantifiés par RT-q-PCR dans les différents lobes prostatiques de souris âgées de 9 mois. D'après G. Alvès, communication personnelle.

Nous venons d'exposer plusieurs hypothèses pouvant permettre d'expliquer l'augmentation d'expression de *ezh2* suite à l'accumulation de cholestérol dans les cellules prostatiques des souris *lxr-/-* et dans les cellules PC3 exposées LDL. Dans les deux cas, afin d'identifier un candidat potentiellement impliqué, nous proposons à court terme, les perspectives suivantes :

- Analyser les niveaux d'accumulation de pRB et E2F, capables d'activer l'expression de *ezh2*, puis de SKP2 et $P27^{Kip1}$, tous les deux sensibles aux variations de cholestérol et/ou à l'activation des LXR, et pouvant moduler la voie pRB-E2F.
- Quantifier miR-101 et miR-26a puis, en fonction des résultats obtenus, étudier l'expression des facteurs HIF, RORα, PKC et c-MYC qui sont des candidats pertinents puisque sensibles au cholestérol.
- Effectuer un marquage immuno-histochimique de la cavéoline-1, protéine présente au niveau des *rafts* lipidiques au niveau de la membre plasmique, afin de mettre en évidence leur potentielle implication dans la surexpression de *ezh2*, par exemple, *via* la voie RAF/MEK/HIF/miR-101 (figure 41).
- Cloner le promoteur de *ezh2* en amont d'un gène rapporteur pour étudier sa régulation transcriptonnelle potentielle par LXRs, RXR (γ) et SREBP.

III) L'invalidation des LXRs serait-elle suffisante pour initier des processus tumoraux?

En 2009, Kim *et al.* montrent que les souris invalidées pour LXRα présentent, au niveau de la prostate ventrale, un élargissement de la zone stromale, des « nodules fibreux » dans la lumière des acini et une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales (378). La présence des « nodules fibreux » empêcherait la contraction de la glande et causerait une obstruction des canaux prostatiques et une rétention des sécrétions expliquant l'importante dilatation des acini chez ces souris. Ce phénotype, qui s'accentue avec l'âge, est également présent chez les souris *lxrα;β-/-* mais absent chez les souris *lxrβ-/-* jusqu'à 11 mois. A 17 mois, des nodules apparaissent également chez les souris *lxrβ-/-*. Les auteurs montrent une augmentation d'expression des facteurs de transcription SNAIL et SMAD au niveau des cellules épithéliales des souris *lxrα-/-* et *lxrα;β-/-* et suggèrent donc l'implication de la voie TGFβ, connue pour réguler ces facteurs, dans la mise en place du phénotype. Nos données expérimentales sont en désaccord avec certains points de cette étude :

- D'après les auteurs, les LXRs, et particulièrement LXRα, seraient majoritairement exprimés au niveau de la prostate ventrale, c'est pourquoi les travaux sont focalisés sur ce lobe prostatique. La quantification des ARNm des LXRs réalisée dans notre laboratoire ne révèle pas de différence d'expression significative des *lxrs* entre les différents lobes (Figure 43). Notons tout de même une expression plus faible de *lxrα* dans la prostate antérieure.

 L'analyse histologique des quatre lobes prostatiques des animaux *lxrα -/-, lxrβ-/-* et *lxrα ;β-/-* de notre laboratoire à différents âges ne révèle pas la présence des « nodules fibreux » observés par Kim *et al*. Nous n'avons pas d'explication rationnelle pour expliquer ces résultats discordants mise à part une différence de fond génétique entre les souches de souris utilisées.

 Dans cet article, les analyses immunohistochimiques par marquage du mKi67 menées sur des souris de 11 ou 17 mois indiquent une augmentation de la prolifération cellulaire dans les prostates des souris *lxrα -/-, lxrβ-/-* et *lxrα;β-/-*. Nous n'avons pas fait ce type d'analyse sur des animaux aussi âgés. En revanche, contrairement aux travaux de Kim *et al.*, nos données ne montrent pas de différence significative du niveau de prolifération des cellules dans les prostates des souris *lxrα ;β-/-* (en régime contrôle) âgées de 6 mois. L'explication peut résider dans le choix des méthodes d'analyse de la prolifération. Sur les souris de 6 mois, dans cette étude, la quantification de la prolifération a été réalisée suite à une incorporation de BrdU permettant ainsi une analyse cumulative des cellules en prolifération et des cellules ayant proliféré. Nos analyses ont été réalisées soit par marquage du PCNA ou mKi67 soit par quantification des ARNm du facteur de prolifération CYCLINE D2 ne permettant pas de révéler uniquement le niveau de prolifération à un instant t. Ainsi par l'utilisation de ces techniques, nous minimisons certainement le niveau de prolifération, ce qui permettrait d'expliquer les différences de résultats entre nos deux groupes.

Dans tous les cas, afin de nous affranchir d'une possible implication de la voie TGFβ , mais également de tout autre facteur paracrine pouvant être mis en jeu dans l'hyperprolifération des cellules épithéliales chez les souris *lxrα;β-/-* nourries avec le régime riche en cholestérol, nous avons exposé les cellules MPE directement aux séra issus de ces souris soumises ou non au régime. Les résultats montrent clairement une augmentation de la prolifération de ces cellules invalidées pour les LXRs uniquement en réponse au sérum des souris nourries avec le régime riche en cholestérol à forte teneur en LDL. Ceci appuie l'hypothèse d'un mécanisme indépendant des facteurs paracrines et souligne l'implication des LDL dans les mécanismes conduisant à l'hyperprolifération.

IV) Les LXRs sont-ils à l'origine de la carcinogenèse prostatique chez l'homme?

Les cellules tumorales prostatiques humaines présentent des dérèglements du métabolisme lipidique en faveur de l'accumulation intracellulaire de cholestérol. Les traitements par des statines visant à bloquer la synthèse de cholestérol ou par des agonistes de LXRs qui favorisent son efflux *via* les cassettes ABC, diminuent la quantité de cholestérol intracellulaire et entraînent l'entrée en apoptose des cellules par des mécanismes faisant intervenir les voies de survie dépendantes des *rafts* lipidiques.

De manière intéressante, une étude montre que le gène codant la cassette d'efflux ABCA1 est 15 à 20 fois plus exprimé dans des cellules de cancer de prostate androgéno-dépendantes que dans des cellules androgéno-indépendantes (cancer plus avancé), indiquant une possible relation entre le niveau

d'expression de *abca1* et la progression tumorale (379). De plus, ces travaux révèlent que les androgènes inhibent l'expression de *abca1* au niveau transcriptionnel par un mécanisme faisant intervenir AR. En parallèle, l'inhibition de ABCA1 par technique d'ARN interférence, augmente la prolifération des cellules androgéno-dépendantes suggérant donc que l'inhibition de l'expression de *abca1* par les androgènes pourrait être un mécanisme par lequel les androgènes stimulent la prolifération tumorale.

Plus récemment, des travaux menés *in vitro* montrent une diminution de l'expression des *lxrs* dans des cellules devenues androgéno-indépendantes (380). Puisque les LXRs sont connus pour stimuler l'expression de *abca1*, ces dernières données corroborent tout à fait la diminution d'expression de *abca1* observée dans ces mêmes cellules. De plus, l'activation des LXRs par du T0901317, associée à une diminution de la quantité de cholestérol intracellulaire, entraîne un retard de la progression des cellules tumorales vers le stade d'androgéno-indépendance (380).

Ces données démontrent donc que les cellules tumorales deviennent dépendantes vis-à-vis du cholestérol et surtout que les mécanismes mis en place au cours de la carcinogenèse pour augmenter sa biodisponibilité sont nécessaires à la survie des cellules. L'utilisation du modèle de souris *lxr-/-* nourries avec un régime riche en cholestérol montre bien qu'une accumulation de cholestérol intracellulaire conduit à l'initiation tumorale. Ces résultats suggèrent donc que les dérèglements de l'homéostasie du cholestérol observés dans les tumeurs humaines ne soient pas uniquement la conséquence d'importants besoins énergétiques des cellules pour se diviser, mais qu'ils puissent s'agir d'un mécanisme potentiellement causal participant à la carcinogenèse.

L'entrée, l'efflux et la synthèse de cholestérol sont des mécanismes impliqués dans le stockage de cholestérol intracellulaire et sont tous régulés par les LXRs *via* les gènes cibles *idol*, *abca1*, *abcg1*, *HMGCo-A réductase* et *HMGCo-A synthase*. Ainsi, nous pouvons envisager une altération de l'activité et/ou de l'expression des LXRs au cours du développement tumoral chez l'homme qui serait le *primum movens* de l'accumulation de cholestérol. Pour vérifier cette hypothèse :

1° Sur des biopsies humaines d'échantillons prostatiques sains et atteints de différents stades d'avancement tumoral, les points suivants semblent fondamentaux :

- il serait important de vérifier la présence d'éventuelles mutations dans les gènes codant les LXRs afin de déterminer l'existence de polymorphismes pouvant être associés à la pathologie,
- il faudrait analyser le profil d'expression des LXRs au cours de l'évolution de la pathologie,
- en dépit de changements potentiels d'expression des LXRs et dans l'hypothèse d'un changement d'activité, il serait pertinent de quantifier l'expression de tous les gènes cibles des LXRs impliqués dans le métabolisme du cholestérol (les casettes ABC, SREBP2, IDOL, LDLR et les gènes de synthèse) au cours du développement tumoral,

 dans l'hypothèse d'un changement d'expression et/ou d'activité de LXRs pouvant expliquer les dérégulations de l'homéostasie du cholestérol, il peut également être envisagé de doser les différents oxystérols capables d'activer les LXRs ainsi que de quantifier l'activité et l'expression des enzymes impliquées dans leur métabolisme.

L'obtention de ces données permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes liés à l'initiation et à la progression tumorale chez l'homme. Le cas d'une diminution de l'activité des LXRs au cours du développement tumoral, accompagnée d'une hypercholestérolémie d'origine alimentaire ou pathologique, placerait les cellules prostatiques dans une situation proche de celle des souris *lxr-/-* qui développent une néoplasie. En parallèle, ce type d'analyse pourrait également permettre d'identifier de nouveaux marqueurs associés au cancer de la prostate et améliorer ainsi les méthodes de diagnostic pour mieux adapter les stratégies thérapeutiques.

2° Les mêmes types d'investigation peuvent être menés sur des modèles murins de cancer de prostate tels que les souris invalidées pour *pten*

Ce type de données permettrait de déterminer précisément la cinétique des modifications du métabolisme du cholestérol et les acteurs impliqués au cours du développement tumoral afin d'approfondir les relations de causes à effet entre le cholestérol et le développement cancéreux.

3° Il serait intéressant d'invalider les LXRs dans un modèle de souris présentant une susceptibilité génétique au développement de cancer de la prostate. Pour cela, il est possible de croiser les souris *lxr-/-* avec les souris *pten-/-* dans l'attente d'une accélération de la cinétique d'évolution du cancer. Dans cette optique, l'inconvénient du modèle de souris *pten-/-* est la cinétique relativement rapide du cancer. Ainsi, le risque majeur de ce type de croisement est de se retrouver face à une modification subtile de cinétique rendant difficile sa mise en évidence avec les marqueurs d'avancement tumoral actuellement disponibles. Pour pallier à ce problème, il est possible d'envisager des croisements avec d'autres modèles murins moins agressifs tels que les souris *nkx3.1-/-*. Contrairement au modèle *pten-/-*, ces souris ne développent pas de carcinomes invasifs mais donnent lieu à la formation de foyers de néoplasie intra-épithéliale à l'âge de 19 mois (146). Dans ce contexte, si l'hypothèse est vérifiée, l'invalidation des LXRs pourrait conduire soit à une mise en place plus précoce des néoplasies soit à l'augmentation de l'agressivité des cellules induisant la formation de carcinomes dont la mise en évidence d'un point de vue histologique devrait rester relativement simple.

Cette approche confirmerait l'implication des LXRs dans la carcinogenèse et plus particulièrement leur rôle protecteur dans les phases de progression.

3° Il serait également pertinent de traiter les souris *pten-/-* avec un agoniste des LXRs dans l'hypothèse de ralentir le développement tumoral. La cinétique de ce type de traitement serait à

déterminer en fonction des changements d'expression des LXRs observés lors des études menées au point 2. Cette approche serait complémentaire des résultats déjà obtenus quant à l'inhibition de la croissance tumorale par des agonistes des LXRs en modèle de xénogreffes et appuierait l'idée des LXRs comme nouvelle cible thérapeutique dans le cadre du traitement du cancer de la prostate.

V) Existe-t-il une association entre obésité et cancer de la prostate ?

L'obésité est définie par le WHO (*world health organization*) et le NIH (*national institute of health*) par un index de masse corporelle (IMC) ≥ 30Kg/m^2. Cette surcharge pondérale se caractérise essentiellement par l'accumulation de tissus adipeux chez les individus atteints. L'étiologie de l'obésité est souvent multifactorielle et regroupe des composantes génétiques et environnementales. Au cours des dernières décennies, l'enrichissement en cholestérol, mais également en sucre et en acides gras saturés de l'alimentation, ainsi que des changements de comportements alimentaires sont associés à une augmentation du nombre d'individus obèses dans la plupart les pays industrialisés. La question se pose alors de l'existence d'une corrélation entre la survenue croissante des cas d'obésité et l'augmentation de l'incidence du cancer de la prostate.

Les études menées à ce sujet montrent clairement que l'augmentation de l'IMC est associée à une mortalité plus élevée par cancer de la prostate (381, 382). Par exemple, un IMC supérieur ou égal à 30kg/m^2 augmente de 21 à 27% le risque de décès par cancer de la prostate (383). Une étude réalisée sur une population suédoise révèle que ce risque peut atteindre jusqu'à 40 % dans les groupes présentant le plus fort IMC (384). De plus, l'augmentation de l'IMC chez des étudiants écossais peut augmenter de 49% le risque mortalité par cancer de la prostate (385). Ces dernières données suggèrent une influence précoce de l'IMC sur le développement du cancer de la prostate connu pour survenir généralement tardivement. Comment expliquer l'association entre l'obésité et la survenue du cancer de la prostate ?

La multiplicité des facteurs exogènes et endogènes liés à l'obésité rendent l'étude de cette question complexe. En effet, les conséquences de cette pathologie sur l'homéostasie des constantes physiologiques sont nombreuses. Par exemple, des changements hormonaux (testostérone, œstrogène, insuline, IGF (*insulin growth factor-1*), leptine, adiponectine) liés à l'augmentation de tissus adipeux et/ou au développement d'un diabète de type 2 sont des conséquences fréquentes de l'obésité.

D'après les données de la littérature, plusieurs origines biologiques pourraient permettre d'expliquer l'association entre l'obésité et le cancer de la prostate

- Les personnes obèses présentent de faible taux de testostérone circulante (386). Cette diminution s'explique par la conversion de la testostérone en œstradiol au niveau des adipocytes présents en plus grande quantité chez les personnes obèses. De plus, l'œstradiol ainsi produite limite la synthèse de testostérone par le testicule en inhibant l'axe hypothalamo-hypophysaire (386).

Connaissant le rôle délétère des androgènes au cours de la progression du cancer de la prostate, ces données seraient en faveur d'une « protection » des personnes obèses vis-à-vis du cancer de la prostate. Les études montrent qu'en réalité, de faible de taux de testostérone peuvent favoriser la survenue de cancer notamment de haut grade (387-390), ce qui pourrait expliquer l'association entre obésité et cancer de la prostate. Par ailleurs, l'obésité est également associée à une augmentation plasmatique d'œstradiol, d'insuline, d'IGF-1 et de leptine et à une diminution d'adiponectine. Tous ces changements hormonaux sont connus pour favoriser le risque de cancer de la prostate (pour revue lire (391)).

 La nature des acides gras (page 43) consommés qui sont associés et partiellement responsables du développement de l'obésité peuvent bien entendu participer à expliquer l'association entre obésité et cancer de la prostate. En parallèle, les régimes alimentaires provoquant l'obésité présentent généralement de faibles proportions de produits connus pour inhiber le développement tumoral tels que certains antioxydants.

 De manière générale, l'augmentation de la prise alimentaire, s'accompagne d'une forte ingestion calorique connue pour être associée au risque de développement du cancer de la prostate (392). Par exemple, une restriction calorique, corrélée à une perte de poids chez le rat, induit une diminution de la croissance tumorale (393, 394). De plus, une étude prospective montre que la prise de poids est associée à une augmentation du risque de cancer métastatique de la prostate (382). A l'inverse, une perte de poids est corrélée à une diminution du risque de cancer de la prostate (383).

Ces données montrent donc que l'obésité est un facteur de risque de développement du cancer de la prostate. Cette association peut s'expliquer par différents facteurs de nature nutritionnelle et hormonale. En revanche, aucune étude ne mentionne l'hypercholestérolémie des personnes obèses comme potentiel facteur de risque du cancer de la prostate. Néanmoins, associé à des dérégulations de l'homéostasie du cholestérol au niveau prostatique, pouvant impliquer les LXRs, il est possible que l'hypercholestérolémie chez les personnes obèses participe au risque de développement du cancer de la prostate. De plus, les études épidémiologiques qui associent clairement l'hypercholestérolémie au risque de développement du cancer de la prostate ainsi que les données expérimentales présentées dans ce manuscrit permettent de considérer le cholestérol et la gestion de son homéostasie par les LXRs, comme un élément clé des processus impliqués dans l'initiation et la progression tumorale, que ce soit dans un contexte d'obésité ou non.

Annexes

Article 3: Absence of Nuclear receptors for Oxysterols Liver X Receptor induces ovarian Hyperstimulation Syndrome in Mice

Article publié dans *Endocrinology*, Volume 150, issue 7, pages 3369-3375, Juillet 2009.

Kevin Mouzat, Fanny Volat, Silvère Baron, Georges Alves, Aurélien J. C. Pommier, David H. Volle, Geoffroy Marceau, Angélique DeHaze, Pierre Déchelotte, Raj Duggavathi, Françoise Caira, and Jean-Marc A. Lobaccaro

Absence of Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptor Induces Ovarian Hyperstimulation Syndrome in Mice

Kevin Mouzat, Fanny Volat, Silvère Baron, Georges Alves, Aurélien J. C. Pommier, David H. Volle, Geoffroy Marceau, Angélique DeHaze, Pierre Déchelotte, Raj Duggavathi, Françoise Caira, and Jean-Marc A. Lobaccaro

Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6247 (K.M., F.V., S.B., G.A., A.J.C.P., D.H.V., G.M., A.D., P.D., F.C., J.-M.A.L.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 931, Clermont Université, Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 63177 Aubière Cedex, France; Centre Hospitalier Universitaire (G.M.), Service de Biochimie, 63003 Clermont-Ferrand, France; Centre Hospitalier Universitaire (P.D.), Service d'Anatomie Pathologique, Hôtel Dieu, 63058 Clermont-Ferrand, France; and Department of Animal Science (R.D.), McGill University, Sainte Anne de Bellevue Québec, Canada H9X 3V9

Ovarian hyperstimulation syndrome is a frequent complication occurring during *in vitro* fertilization cycles. It is characterized by a massive ovarian enlargement associated with an accumulation of extra vascular fluid. Here we show that liver X receptor (LXR)-α and LXR-β deficient mice present many clinical and biological signs of ovarian hyperstimulation syndrome: ovarian enlargement, hemorrhagic corpora lutea, increased ovarian vascular permeability, and elevated estradiol. Ovulation stimulation resulted in excessive ovarian response to exogenous gonadotropins because follicle number and estradiol production were higher in transgenic mice. LXR deficiency also leads to perturbations in general inflammatory status, associated with ovarian *il-6* deregulation. Upon treatment with the synthetic LXR agonist T09101317, serum estradiol and expression of *star* and *cyp11a1* genes were markedly increased in wild-type mice, showing that LXRs are key regulators of ovarian steroidogenesis. These results suggest that LXRs control the ovulation by regulating endocrine and vascular processes. **(*Endocrinology* 150: 3369–3375, 2009)**

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) (1) is the most common important complication of induced ovulation for the treatment of fertility (1). This pathology is characterized by a bilateral massive cystic enlargement of the ovaries associated with an extra vascular fluid concentration, which causes mortality in rare cases (2), and sometimes hemorrhagic ovarian cysts (3). Although complete etiology of OHSS is still unknown, many risk factors have been described (4, 5), including young age; history of allergies; and high serum estradiol, polycystic ovary syndrome, and body mass index. Symptoms of OHSS resemble closely to acute inflammatory response and many factors are linked to the progression of the symptoms, *e.g.* vascular endothelial growth factor (VEGF) (1), IL-6 (1), and prostaglandins (5).

Among the various factors regulating inflammatory modulation, the role of the nuclear receptors for oxysterol liver X receptor (LXR) (1) has been recently increasing (6). Indeed LXRs are known *in vitro* to inhibit accumulation of the proinflammatory cytokines IL-6 and cyclooxygenase-2, the rate-limiting enzyme in prostaglandin F2α synthesis (7). In parallel, LXRs agonists can stimulate the expression of TNF-α [*tnf*α (1, 8)] and VEGF [*vegf* (9)]. LXRα (NR1H3) and -β (NR1H2) also play a central role in cholesterol homeostasis (for a review see Ref. 10). They belong to a subclass of nuclear receptors that form obligate heterodimers with 9-*cis* retinoic acid receptors (RXR) (1) and are bound to and activated by a class of naturally occurring oxysterols *in vitro* (11, 12) and *in vivo* (13). In absence of any ligand, the RXR/LXR heterodimer is constitutively linked to specific DNA target sequences and interacts with corepressors, thus blocking transcription initiation (14). The development of LXRα and LXRβ-deficient mice (LXR$^{-/-}$) (1) has also helped to elucidate the role of these nuclear receptors in various physiologic functions (15). Hence, Steffensen *et al.* (16) reported that

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.
Copyright © 2009 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2008-1519 Received October 29, 2008. Accepted March 16, 2009.
First Published Online March 26, 2009

Abbreviations: Cyp11a1, Cytochrome P450 side-chain cleavage; E2, estradiol; FSHR, FSH receptor; LHR, LH receptor; LMD, laser microdissection; LXR, liver X receptor; LXR$^{-/-}$, LXR-deficient mice; OHSS, ovarian hyperstimulation syndrome; qPCR, quantitative PCR; RXR, retinoid X receptor; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; T1317, T0901317; VEGF, vascular endothelial growth factor.

female mice lacking LXRα and/or LXRβ encoding genes conceived less frequently and had significantly fewer pups per litter compared with wild-type mice. The authors described a less effective effect of zymosterol, a meiotic activating sterol, to induce resumption of meiosis in oocytes. Therefore, the production of follicular fluid-meiosis activating sterol, an endogenous ovarian oxysterol, has been reported to be stimulated upon gonadotropin administration (17). Because follicular fluid-meiosis activating sterol is a LXR ligand (11), it could be suggested that LXR signaling may play an important role during ovulation.

In this paper, we report that LXR$^{-/-}$ mice undergoing ovulation induction present various clinical and biological signs of OHSS: enlarged ovaries with reduced vascular permeability, ovarian hemorrhages, elevated levels of circulating estradiol, acute ovarian response characterized by an increased number of retrieved oocytes, and an increase in inflammatory status. These results show that LXRs act as a barrier to prevent ovarian hyperstimulation syndrome in mouse.

Materials and Methods

Animals

LXRα and LXRβ knockout mice (LXR$^{-/-}$) and their wild-type controls were maintained on a mixed-strain background (C57BL/6:129Sv), housed in a temperature-controlled room with a 12-h light, 12-h dark cycle and fed *ad libitum* with water and Global-diet 2016S (Harlan, Gannat, France). These mice have been extensively detailed in previous articles (18–21). All experiments were performed on age-matched female mice. Except when indicated, mice were 6–12 months old. For all experiments, except for estradiol synchronization, animals were treated with a superovulation protocol as previously described (21). Briefly, mice received an ip injection of 7.5 IU pregnant mare's serum gonadotropin on d 1 at 1400 h and 5 IU human chorionic gonadotropin on d 3 at 0800 h, and then killed on d 5 at the end of metaestrus, starting at 1400 h. For real-time PCR (qPCR) (1) experiments, mice were gavaged with 45 mg/kg T0901317 (T1317) (Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux, France) or vehicle (methyl-cellulose) (20). In estradiol synchronization protocol, estrus was induced with a single injection of 10 μg estradiol benzoate (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) 18 h before the animals were killed, *i.e.* at 2000 h (21). Before oocyte counting, mice were killed on d 4, a short time after ovulation. The oocyte cumulus masses were surgically harvested from the oviducts and cultured in DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 20% fetal calf serum and antibiotics. After treating with 0.3% hyaluronidase (Sigma-Aldrich) for 10 min, oocytes were observed and counted. To minimize the effect of stress, the elapsed time between the capture of a mouse and when it was killed was less than 30 sec. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethics Committee (authorization CE1-04).

Anatomy and pathology analyses

Ovaries were collected, fixed, and embedded in paraffin, and 5-μm-thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin/saffron and analyzed with Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Le Pecq, France) as previously described (21).

Laser microdissection (LMD)

Serial cryosections (25 μm) of fresh-frozen ovaries were cut at −16 C, thaw mounted onto PEN slides (Leica, Québec, Canada), stained with toluidine blue, and dehydrated in 70 and 100% ethanol followed by incubation for 1 h at 37 C. The granulosa cells were excised by LMD (Leica LMD6000) at ×20 magnification directly into either RNA-lysis (RNeasy microkit; QIAGEN, Courtaboeuf, France) as previously described (22).

TABLE 1. Sequence primers used for qPCR

Gene (accession no.)	5′–3′ sequences	Size of the amplicon	Reference
36b4 (NM_007475)	Forward: GTC ACT GTG CCA GCT CAG AA Reverse: TCA ATG GTG CCT CTG GAG AT	78	(34)
3βhsd (BC052659)	Forward: ATG GTC TGC CTG GGA ATG AC Reverse: ACT GCA GGA GGT CAG AGC T	206	(35)
arom	Forward: CGG AAG AAT GCA CAG GCT CGA G Reverse: CGA TGT ACT TCC CAG CAC AGC	133	This study
cox1 (NM_008969)	Forward: AAG GCA GAG GCA GTT GGA TCT Reverse: CAT GGC TGG CCT AGA ACT CAC T	72	This study
cyp11a1 (BC068264)	Forward: CTG CCT CCA GAC TTC TTT CG Reverse: TTC TTG AAG GGC AGC TTG TT	194	(20)
fshr (NM_013523)	Forward: GTG CTC ACC AAG CTT CGA GTC AT Reverse: AAG GCC TCA GGG TTG ATG TAC AG	165	(35)
il-6 (NM_031168)	Forward: TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC Reverse: GTG TAA TTA AGC CTC CGA CTT G	139	(36)
lhr (NM_013582)	Forward: AGC TAA TGC CTT TGA CAA CC Reverse: GAT GGA CTC ATT ATT CAT CC	242	(35)
lxrα (AY195871)	Forward: TGC CAT CAG CAT CTT CTC TG Reverse: GGC TCA CCA GCT TCA TTA GC	160	(35)
lxrβ (NM_009473)	Forward: CGC TAC AAC CAC GAG ACA GA Reverse: TGT TGA TGG CGA TAA GCA AG	180	(35)
srebp1c (NM_011480)	Forward: GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT Reverse: GCT TCC AGA GAG GAG GCC AG	189	(21)
Star (BC082283)	Forward: TGT CAA GGA GAT CAA GGT CCT G Reverse: CGA TAG GAC CTG GTT GAT GAT	336	(20)
vegfr2 (NM_010612)	Forward: TGG CCA CCA CTC AAG ATT AC Reverse: AGG TTT TGA AGC AGG TGT GG	174	This study

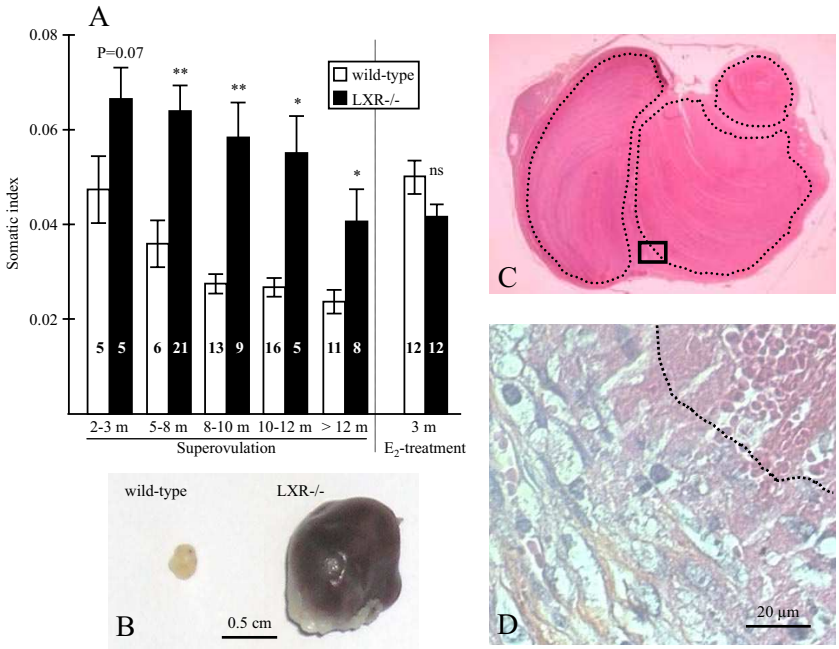


FIG. 1. Superovulation induces an ovarian enlargement in LXR-deficient mice. A, Superovulation protocol was induced in mice from 2 to 14 months of age. E2 treatment was done in 3-month-old animals. Ovaries were collected and weighed. Somatic index represents ovarian weight expressed as a percentage of total body weight. Number of animals per group is indicated in the histograms. Results are indicated as mean ± SEM. *, $P < 0.05$ *vs.* wild type; **, $P < 0.01$ *vs.* wild type. B, Ovary from LXR$^{-/-}$ mouse presenting an exceptional enlargement compared with a wild-type superovulated ovary. Note that somatic indexes of these organs were not included in the data presented in A. C, Histological examination at low magnification of this enlarged ovary. Slide was stained with hematoxylin/eosin/saffron. *Dashed line*, Hemorrhagic lesions present in *corpora lutea*. *Square inset*, Magnified view. D, Magnification of the hemorrhagic lesion junction limit. The presence of luteal cells surrounding the hemorrhage indicates its presence inside a corpus luteum.

Real-time PCR

Total RNA was isolated from whole ovary using the Trizol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The real-time PCR was performed on an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) as described before (21). Primers are given in Table 1.

Evaluation of Evans blue leakage

Before the animals were killed, mice from both groups were anesthetized with a single ip injection of chloral (3.75 mg/10 g). Mice received then an intracardiac injection with 100 μl of 25 mg/ml of Evans blue. Ovaries were collected and incubated in 1 ml of formamide for 24 h at 60 C. To evaluate ovarian capillary permeability, Evans blue concentration in the formamide extract was measured by light absorption at 620 nm using a spectrophotometer as described (23). The ovarian Evans blue content was expressed as ng/mg of tissue.

Steroid measurements

After decapitation of superovulated animals, sera were collected and steroid hormone concentrations were assessed by electrochimioluminescence (Elecsys Progesterone II and Estradiol II; Roche Diagnostics, Meylan, France).

Sedimentation speed measurement

After decapitation, 600 μl of whole blood were collected with 15 μl of 7.5% K3EDTA and mixed with 150 μl of 0.105 M sodium citrate. Sedimentation speeds were measured in 1-ml plastic pipettes at 1 and 2 h.

Statistical analysis

Student's *t* test was performed to determine whether there were significant differences between the groups. $P = 0.05$ was considered significant.

Results

Ovulation induction by gonadotropins leads to ovarian enlargement and hemorrhagic corpora lutea

Morphological examination of superovulated ovaries showed an increased size of the ovaries in the LXR$^{-/-}$ mice compared with the wild-type mice (Fig. 1A) and the presence of multiple hemorrhagic cysts (data not shown). Somatic indexes of LXR$^{-/-}$ mice ovaries were altered compared with wild-type mice: even though a higher (yet not significant, $P = 0.07$) increase of the somatic index was pointed for the animals from 2 and 3 months of age, a significant increase of this index was clearly observed for all the tested ages, suggesting the effect of the superovulation was not age dependent. In contrast, estradiol treatment alone to synchronize female cycles did not result in ovary size differences in LXR-deficient mice, showing that only the superovulation protocol led to ovarian enlargement. These data suggest that LXR$^{-/-}$ mice have an increased ovarian response to gonadotropins. In rare cases it could be observed a severe phenotype (Fig. 1B) with massive ovarian hemorrhages of the corpus luteum (Fig. 1C), as suggested by the presence of luteal cells surrounding the hemorrhage (Fig. 1D). This fact has already been described in the human pathology (2, 3). The reasons that OHSS range from slight to dramatic situations are still unknown and probably involve the sensitivity to some paracrine factors. In the other cases, gross examination showed that hemorrhagic lesions were more numerous and larger in LXR-deficient ovaries (Fig. 2A). It can also be noticed the presence of the follicles at all stages.

One of the main causes of OHSS symptoms is the presence of third space fluid shift. Ovarian vascular permeability was thus measured in ovaries using Evans blue, as previously described in rat (23). Dye content in the ovaries from LXR-deficient mice (0.21 ± 0.06 ng/mg tissue) was significantly higher (1.9-fold, $P < 0.05$) than in the control group (0.11 ± 0.05 ng/mg tissue; Fig. 2B) showing that LXRs control vascular permeability. Expression of *lxrα* and *lxrβ* was measured during superovulation protocol in granulosa/luteal cells purified by LMD from wild-type ovaries collected at specific time points (Fig. 2C). Both isoforms were expressed in all tested follicular stages. Interestingly, *lxrα* clearly showed a developmental regulation. In addition, a significant peak of its expression was seen at the time when corpus luteum function is maximal. These data strongly suggested that the lack of LXR could be, at least in part, associated to an abnormal response of the corpus luteum.

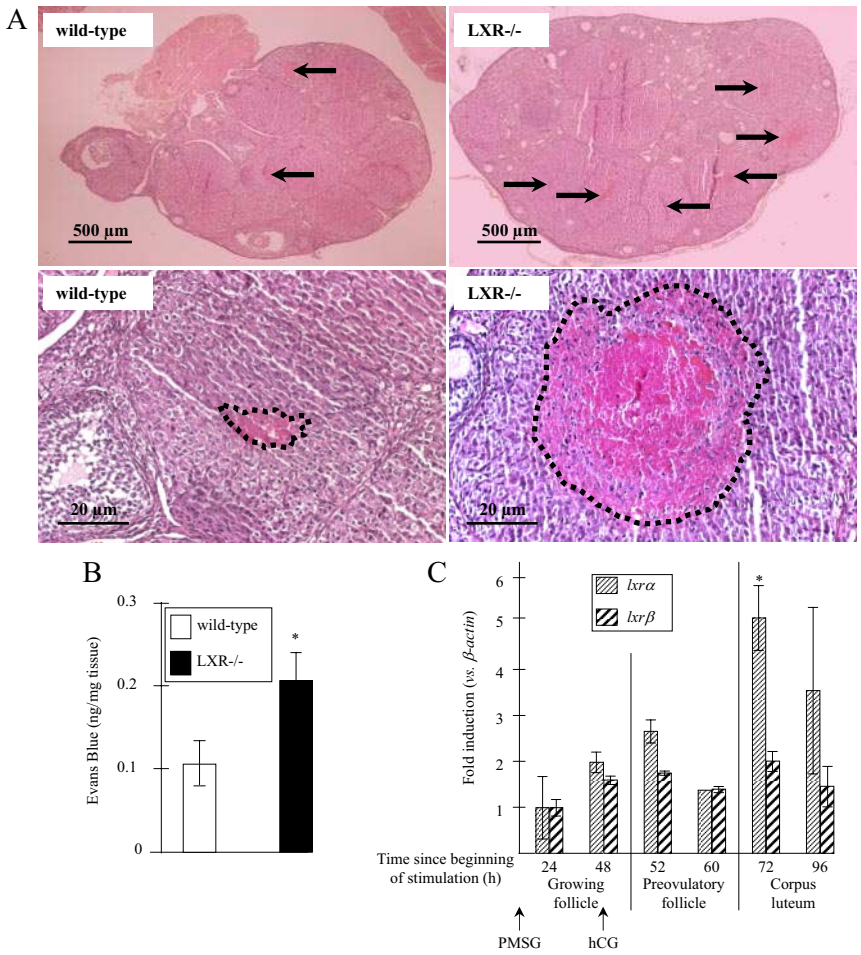


FIG. 2. Superovulation results in hemorrhages in corpora lutea of LXR-deficient mice. A, Representative histological examination at two magnifications of ovaries from wild-type or LXR-deficient mice. Organs were stained with hematoxylin/eosin/saffron. Higher magnification is focused in corpus luteum. Hemorrhagic lesions are shown with *arrows* (low magnification) or *dashed line* (high magnification). B, Evans blue dye content in ovaries of wild-type and LXR$^{-/-}$ mice, representative of vascular permeability. The ovarian Evans blue content is expressed as nanogram per milligram tissue. Values are the mean ± SEM (n = 9 animals per group). *, $P < 0.05$ *vs.* wild type. C, Expression of *lxrα* and *lxrβ* during granulosa/luteal cells purified by LMD from ovaries collected at specific time points during superovulation protocol. Values are the mean ± SEM (n = 3 animals/group). *, $P < 0.05$ *vs.* value at 24 h. PMSG, Pregnant mare serum gonadotropin; hCG, human chorionic gonadotropin.

LXR-null mice have increased ovarian response to gonadotropins

Because OHSS is caused by an abnormal ovarian response to gonadotropins, we measured the ovary response after follicle retrieval following an *in vitro* fertilization protocol. Expulsed follicle number was greater in LXR$^{-/-}$ females compared with wild-type mice (Fig. 3A; 2.2-fold, $P < 0.02$), pointing out the crucial role of LXRs in the control of the ovarian response. Among the expelled oocytes, 45% were dead or presented empty zonae pellucidae (Fig. 3B).

Ovarian hyperstimulation is linked to increased estradiol production in LXR-deficient mice

Because estradiol concentration is one of the major factors involved in the progression of the syndrome (5), ovarian steroids were measured in the sera of superovulated mice. Whereas no difference in progesterone concentration was observed among all groups, estradiol (E2) was shown to be increased in LXR-deficient mice compared with wild-type females. Conversely, gavage of wild-type mice with the synthetic LXR agonist T1317 induced an increase of E2 production (Fig. 4A). Consistent with increased E2-production, *Star* (steroidogenic acute regulatory protein) and *cyp11a1* (cytochrome P450 side chain cleavage) expression was increased in wild-type animals gavaged with T1317 (Fig. 4B; 1.8- and 1.5-fold induction for *star* and *cyp11a1*, respectively; $P < 0.05$), as previously described in other steroidogenic organs (19, 20). Basal level of *cyp11a1* was increased in LXR$^{-/-}$ mice (1.4-fold, $P < 0.05$) compared with wild-type mice. This could be partially responsible for the higher basal level of E2 in this group. No difference in *3βhsd* (3-β-hydroxysteroid dehydrogenase I) expression was observed. Aromatase/cyp19A1 expression was also measured in the ovaries. Unexpectedly, its levels were basally lower than the wild-type animals. T1317 treatment had no effect on the various levels.

Ovarian hyperstimulation is associated with a deregulation of the inflammatory status in LXR-null mice

Measurement of the blood sedimentation speeds, a widely used clinical marker of general inflammatory status, at 1 and 2 h showed an increase in LXR$^{-/-}$ mice (5.3- and 6.0-fold, respectively, $P < 0.05$) compared with wild-type mice (Fig. 5A). Real-time qPCR analysis of immunity markers and candidate genes involved in the progression of the symptoms (Fig. 5B) was performed in whole ovaries of T1317-gavaged wild-type and LXR$^{-/-}$ animals.

Srebp1c, a known LXR-target gene, presented a 3.4-fold induction after treatment with T1317, demonstrating the efficiency of the treatment. Surprisingly, basal expression levels of the genes encoding LH receptor (LHR), FSH receptor (FSHR), and VEGF receptor 2 had significantly lower levels in the LXR$^{-/-}$ group (from 25 to 55%). T1317 treatment induced a 60% decrease of *fshr* expression in wild-type females. *IL-6* expression was increased by 1.75-fold in LXR-deficient mice compared with wild-type females. No difference in *vegf*, *vegf receptor 1*, *cyclooxygenase 1* and *2*, *IL-1β*, and *tnfα* expression levels were observed (data not shown). Similar results were obtained for *claudin 5* and *cadherin 5* encoding tight junction proteins whose deregulations are linked to OHSS (23, 24) (data not shown). Thus, symptoms developed by LXR$^{-/-}$ females are not underlined by all classical molecular mechanisms involved in

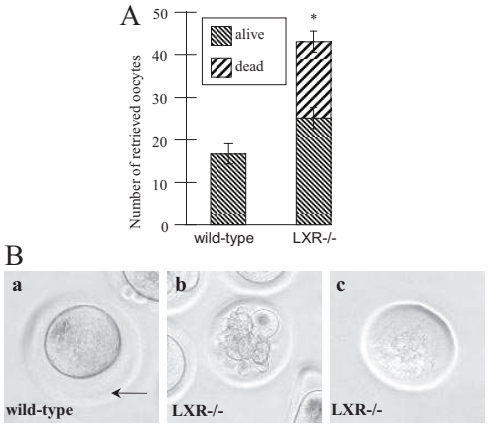


FIG. 3. LXR deficiency is responsible for an increased response to gonadotropin stimulation. A, Eight-month-old mice were killed the day after the human chorionic gonadotropin injection. Oocytes were collected in oviduct and counted under microscope examination. Number of retrieved oocytes is presented as mean ± SEM (n = 4 animals/group). *, $P < 0.05$ *vs.* wild type. B, Dissecting microscope photograph. All wild-type oocytes (a) seemed normal with an intact zona pellucidae (*arrow*). Caption of LXR$^{-/-}$ oocytes shows a representative example of dead oocyte (b) or empty zona pellucidae (c).

OHSS but are associated with inflammatory response perturbations as in women developing the syndrome.

Discussion

This study shows for the first time that the LXRα and LXRβ-deficient females present many clinical and biological features of ovarian hyperstimulation syndrome: ovarian enlargement, hemorrhages in corpora lutea associated with an increased vascular permeability, ovarian hypersensitivity to exogenous gonadotropin stimulation, a high serum estradiol production, and an increase in general inflammatory status.

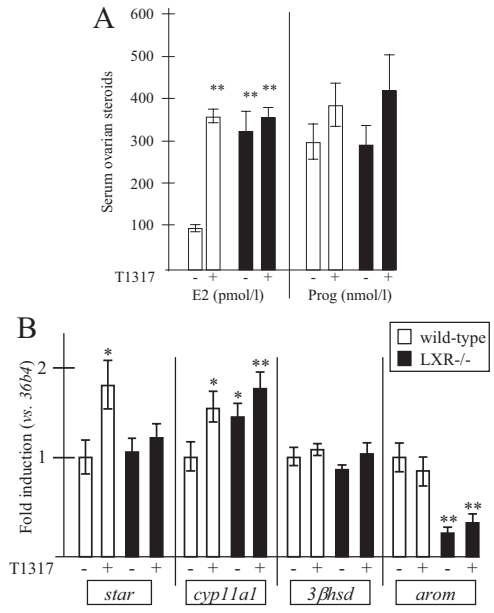


FIG. 4. LXRs control estradiol synthesis. A, Serum ovarian steroids from superovulated wild-type and LXR$^{-/-}$ mice (n = 8–12 animals). B, qPCR analysis of transcripts involved in steroidogenesis on whole ovaries from superovulated wild-type and LXR$^{-/-}$ mice (n = 8–12 animals). Results are expressed as mean ± SEM. *, $P < 0.05$ *vs.* vehicle-treated wild type; **, $P < 0.01$ *vs.* vehicle-treated wild type. Prog, Progesterone; *star*, steroidogenic acute regulatory protein; *cyp11a1*, cytochrome P450 side-chain cleavage; *3βhsd*, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase I.

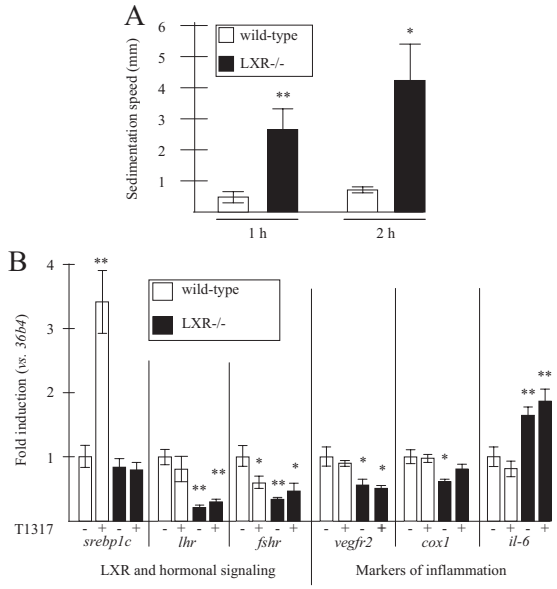


FIG. 5. LXR deficiency leads to a deregulation in inflammatory status. A, Sedimentation speed of whole blood was assessed as described in *Materials and Methods* (n = 6–7 animals). B, Transcripts were quantified by qPCR analysis on whole ovaries. Results are expressed as mean ± SEM (n = 8–12 animals). *, $P < 0.05$ *vs.* vehicle-treated wild type; **, $P < 0.01$ *vs.* vehicle-treated wild type. *srebp1c*, Sterol response element binding protein 1c; *vegfr2*, vascular endothelial growth factor receptor 2; *cox1*, cyclooxygenase 1.

LXR deficiency leads to an acute ovarian response

Our work suggests for the first time an association between LXR signaling and OHSS. As for OHSS in women (5, 25, 26), LXR$^{-/-}$ females show many signs of the abnormal ovarian response to an exogenous stimulation. Indeed a marked increase in expulsed follicles during ovulation followed by corpus luteum formation was observed as well as a higher production of estradiol. The poor quality of the oocytes retrieved in transgenic mice could result from the inability of these animals to perform a correct meiosis as described by Steffensen *et al.* (16).

It is now clear that OHSS progression in women is linked to high expression of cytokines and vascular permeability inducing factors. Among the many proinflammatory factors tested in this study, we identified IL-6 as an interesting candidate. Indeed, this factor is negatively regulated by LXRs in macrophages (7), and plasmatic and ascitic fluid IL-6 concentrations correlate with clinical features of OHSS (27). Our data suggest that this factor could be the molecular link between LXRs and the inflammatory status deregulation in these animals. Even though *claudin 5* and *cadherin 5* levels were unchanged, the increase in ovarian vascular permeability of LXR$^{-/-}$ mice could be the result of a deregulation of another tight junction protein-encoding gene.

LXRs regulate ovarian endocrine function

We (19, 20) and others (28) reported that activation of LXR could modulate the production of steroids in adrenal and testis. However, few studies have been available regarding the role of

LXRs in the female reproductive physiology *in vivo* (16). Our work shows for the first time that activation of LXRs with a synthetic agonist increases estradiol levels in the serum, which seems to result from increased transcriptional regulation of *star* and *cyp11a1*. As already described for other LXR-target genes (19), the lack of LXRs *in vivo* is associated with a higher basal expression of *cyp11a1*.

Superovulated LXR$^{-/-}$ female have high serum E2 levels despite a decreased concentration of gonadotropin receptor mRNAs. This paradoxical observation is explained by the fact that FSHR stimulation by its agonists leads to a decrease in the expression of its gene, both *in vitro* and *in vivo* (29). Because the LXR-deficient mice are more receptive to pregnant mare serum gonadotropin treatment, as pointed out by the oocyte counting, this could explain the highest decrease of *fshr* expression observed. In parallel, as shown by Tamura *et al.* (30), the high level of *il-6* mRNA in the LXR$^{-/-}$ females is associated with a decreased *lhr* expression, suggesting that *il-6* deregulation is the primum movens of low *lhr* mRNA levels. A paradoxical point is that superovulated LXR$^{-/-}$ mice have high E2 levels associated with normal progesterone levels. Unexpectedly, *aromatase/cyp19A1* mRNA levels were lower in these animals. As suggested by Tamura *et al.* (31), the low *aromatase* expression could result from the high *il-6* mRNA levels. It could therefore be hypothesized that estradiol increase in the LXR$^{-/-}$ mice was also due to the up-regulation of liver *Sult1e1* (32), which encodes estrogen sulfotransferase, an enzyme critical for metabolic estrogen deactivation.

It is important to note that circulating estradiol concentration in women undergoing controlled ovulation induction is often monitored because estrogens may be an index of ovarian response (4). If serum E2 is elevated, gonadotropin administration during treatment can be interrupted until E2 concentration reaches an acceptable range (33). Besides, whereas E2 is not the main factor influencing development of the OHSS in women, it is involved in the progression of the symptom.

Altogether, our data show that LXRs control oocyte production activity: LXR-deficient females have: 1) an increase of the inflammatory status possibly induced by an *il-6* elevation and 2) high serum estradiol that could participate to the progression of the OHSS phenotype. LXRs are key regulators of the energetic metabolism. Thus, our data raise the question of a good control of the nutritional balance to improve the outcome of assisted reproductive technologies. LXR-deficient females are the first engineered mouse model linking OHSS and oxysterols signaling. They could help understanding the molecular mechanisms by which women with high body mass index are at risk of developing ovarian hyper stimulation syndrome.

Acknowledgments

We thank J. P. Saru, S. Monceau, S. Guyot, C. Puchol, S. Plantade, and Montagne A. for excellent technical assistance; Drs. D. Gallot (Obstetric and Gynecology Department, CHU Clermont-Ferrand), G. Veyssière and P. Val (Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6247) for helpful discussions and critically reading the manuscript; Dr. D. J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing the mice; and members of the Chester laboratory for assistance in animal dissections.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean-Marc A. Lobaccaro, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6247 et Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr.

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Recherche Médicale, the Université Blaise Pascal, the Université d'Auvergne, the Fondation pour la Recherche Médicale Grant INE2000-407031/1, and the Fondation BNP-Paribas.

Present address for D.H.V.: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Hôpital L'Archet 2, 06200 Nice, France.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. **Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, Birkenfeld A, Relou A, Rosler A, Schenker JG** 1987 Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 48:57–61
2. **Vlahos NF, Gregoriou O** 2006 Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. Ann NY Acad Sci 1092:247–264
3. **Kurioka H, Takahashi K, Kita N, Noda Y** 2005 Hemorrhagic ovarian cyst without peritoneal bleeding in a patient with ovarian hyperstimulation syndrome: case report. Chin Med J (Engl) 118:1577–1581
4. **Delvigne A, Rozenberg S** 2002 A qualitative systematic review of coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients. Hum Reprod Update 8:291–296
5. **Budev MM, Arroliga AC, Falcone T** 2005 Ovarian hyperstimulation syndrome. Crit Care Med 33:S301–S306
6. **Tontonoz P, Mangelsdorf DJ** 2003 Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. Mol Endocrinol 17:985–993
7. **Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P** 2003 Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med 9:213–219
8. **Landis MS, Patel HV, Capone JP** 2002 Oxysterol activators of liver X receptor and 9-*cis*-retinoic acid promote sequential steps in the synthesis and secretion of tumor necrosis factor-α from human monocytes. J Biol Chem 277:4713–4721
9. **Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L, Tontonoz P** 2004 Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. J Biol Chem 279:9905–9911
10. **Beaven SW, Tontonoz P** 2006 Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. Annu Rev Med 57:313–329
11. **Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ** 1996 An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α. Nature 383:728–731
12. **Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ** 1999 Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ. Proc Natl Acad Sci USA 96:266–271
13. **Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW** 2007 Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. Cell Metab 5:73–79
14. **Wagner BL, Valledor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED, Petrowski M, Jepsen K, Baek SH, Heyman RA, Rosenfeld MG, Schulman IG, Glass CK** 2003 Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. Mol Cell Biol 23:5780–5789
15. **Volle DH, Lobaccaro JM** 2007 Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras," the steroids and sex? Mol Cell Endocrinol 265–266:183–189
16. **Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, Andersen CY** 2006 Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. Mol Cell Endocrinol 256:9–16
17. **Grøndahl C** 2008 Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of *in vitro* maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. Dan Med Bull 55:1–16
18. **Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ** 1998 Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α. Cell 93:693–704

19. **Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefrançois-Martinez AM, Caira F, Veyssière G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM** 2006 Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. J Clin Invest 116:1902–1912
20. **Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, Veyssière G, Benahmed M, Lobaccaro JM** 2007 Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. Mol Endocrinol 21:1014–1027
21. **Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Déchelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JM** 2007 Oxysterol nuclear receptor LXRβ regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. J Biol Chem 282:4693–4701
22. **Duggavathi R, Volle DH, Mataki C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD, Schoonjans K** 2008 Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. Genes Dev 22:1871–1876
23. **Kitajima Y, Endo T, Nagasawa K, Manase K, Honnma H, Baba T, Hayashi T, Chiba H, Sawada N, Saito T** 2006 Hyperstimulation and a gonadotropin-releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. Endocrinology 147:694–699
24. **Villasante A, Pacheco A, Pau E, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA** 2008 Soluble vascular endothelial-cadherin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. Hum Reprod 23:662–667
25. **Kaiser UB** 2003 The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome. N Engl J Med 349:729–732
26. **Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, Pierson R, Vassart G, Costagliola S** 2003 Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. N Engl J Med 349:760–766
27. **Abramov Y, Schenker JG, Lewin A, Friedler S, Nisman B, Barak V** 1996 Plasma inflammatory cytokines correlate to the ovarian hyperstimulation syndrome. Hum Reprod 11:1381–1386
28. **Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, Hovatta O, Meaney S, Hultenby K, Johansson LC, Svechnikov K, Söder O, Gustafsson JA** 2005 The liver X receptor-β is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. Endocrinology 146:2519–2530
29. **Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E** 1997 The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. Endocr Rev 18:739–773
30. **Tamura K, Kawaguchi T, Kogo H** 2001 Interleukin-6 inhibits the expression of luteinizing hormone receptor mRNA during the maturation of cultured rat granulosa cells. J Endocrinol 170:121–127
31. **Tamura K, Kawaguchi T, Hara T, Takatoshi S, Tohei A, Miyajima A, Seishi T, Kogo H** 2000 Interleukin-6 decreases estrogen production and messenger ribonucleic acid expression encoding aromatase during in vitro cytodifferentiation of rat granulosa cell. Mol Cell Endocrinol 170:103–111
32. **Gong H, Guo P, Zhai Y, Zhou J, Uppal H, Jarzynka MJ, Song WC, Cheng SY, Xie W** 2007 Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth *in vivo* through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. Mol Endocrinol 21:1781–1790
33. **Grudzinskas JG, Egbase PE** 1998 Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: novel strategies. Hum Reprod 13:2051–2053
34. **Lanvin O, Bianco S, Kersual N, Chalbos D, Vanacker JM** 2007 Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor-α degradation by the estrogen receptor-related receptor-α inverse agonist XCT790. J Biol Chem 282:28328–28334
35. **Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL, Lobaccaro JM, Verhoeven G, Schoonjans K, Auwerx J** 2007 The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. Genes Dev 21:303–315
36. **Iizuka N, Hazama S, Yoshimura K, Yoshino S, Tangoku A, Miyamoto K, Okita K, Oka M** 2002 Anticachectic effects of the natural herb Coptidis rhizoma and berberine on mice bearing colon 26/clone 20 adenocarcinoma. Int J Cancer 99:286–291

Article 4: Cholestérol et cancer de la prostate : données épidémiologiques

Article en cours de publication dans Médecine Clinique.

Aurélien J. C. Pommier, Julie Dujour, Emilie Viennois, David H. Volle, Françoise Caira, Silvère Baron and Jean-Marc A. Lobaccaro

Cholestérol et cancer de la prostate : données épidémiologiques

Aurélien JC. Pommier[1,2,3], Julie Dufour[1,2,3], Emilie Viennois[1,2,3], David Volle[1,2,3], Françoise Caira[1,2,3], Silvère Baron[1,2,3], Jean-Marc A. Lobaccaro[1,2,3].

1. Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, 63000 Clermont-Ferrand
2. CNRS, UMR 6247, GReD, 63177 Aubière
3. Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand

Correspondance : Jean-Marc A. Lobaccaro, "Génétique Reproduction et Développement", UMR CNRS GReD 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, 63171 BP80026 - Aubière Cedex, France.
E-mail : j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr
Tél. : 04 73 40 74 16.

Mots-clés : cholestérol, cancer de la prostate, *raft*, *androgen receptor* (AR), *liver x receptor* (LXR)

Bien que l'observation d'une accumulation de cholestérol dans les tumeurs solides ait été rapportée depuis plus d'un siècle [1], le lien entre cholestérol et promotion et/ou progression du cancer a commencé à être étudié à la fin du 20ème siècle. Ainsi, bien que la majorité des études ait été focalisée sur le cancer de la prostate, les mécanismes impliqués semblent plus généraux et peuvent s'étendre à d'autres types de cancers.

En France, le cancer de la prostate représente le premier cancer et la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme [2]. Son incidence (121,2 cas pour 100 000 par an) a augmenté de manière très importante ces deux dernières décennies avec un taux annuel moyen d'évolution de + 8.5% entre 2000 et 2005 [2]. L'amélioration des techniques de diagnostic ainsi que l'augmentation de l'espérance de vie permettent en partie d'expliquer ces chiffres. Pour autant, des études épidémiologiques montrent que les pays d'Asie tels que la Chine, le Japon ou encore l'Inde présentent des taux d'incidence nettement plus faibles que les pays occidentaux comme les Etats-Unis ou les pays Scandinaves : l'incidence du cancer de la prostate atteint 137 cas pour 100 000 Afro-Américains par an aux Etats-Unis contre 1,9 pour des Chinois vivant en Chine [3]. Lorsque des Chinois de Qidong migrent à San Francisco, l'incidence de ce cancer passe de 0,5 à 26 cas pour 100 000 [4]. Ces données illustrent parfaitement l'implication de deux composantes dans la survenue de cette pathologie : i) une composante génétique « protectrice » puisque l'incidence de ce cancer n'atteint jamais chez les immigrants asiatiques celle des Américains non asiatiques ; ii) une composante environnementale délétère. Parmi celle-ci, la nature des régimes alimentaires, connue pour être plus riche en lipides dans les pays occidentaux par rapport aux pays Asiatiques, pourrait expliquer en partie ces chiffres [4].

Le cholestérol, un lipide délétère pour le cancer de la prostate ?

Quelles sont les bases rationnelles de ce questionnement ?

Au cours des années 1980-90, de nombreuses études ont montré une association entre le risque de cancer de la prostate et la consommation de produits d'origine animale [5], notamment par la présence de lipides dont la nature exacte restait à déterminer [6]. En fait, les lipides semblent avoir un impact sur l'augmentation des cancers métastatiques plus que sur l'incidence totale des cancers. Alors que certains nutriments comme le calcium et certains lipides comme les acides gras permettent d'expliquer l'association observée entre consommation de produits laitiers et risque de cancer de la prostate de haut grade, le risque lié à la consommation de viande rouge reste inexpliqué [5], orientant de fait les études vers un autre lipide : le cholestérol. Pendant de longues années, les liens existant entre la consommation excessive de cholestérol, les taux de cholestérol circulant et le risque de cancer de la prostate ont soulevé la controverse [7].

D'un coté, contrairement au postulat de départ, certaines études ont d'abord démontré l'existence d'une corrélation entre la survenue de cancer et de faibles taux de cholestérol circulant [8]. Cette corrélation inverse s'explique en fait par l'inclusion dans les cohortes de patients atteints d'autres cancers encore

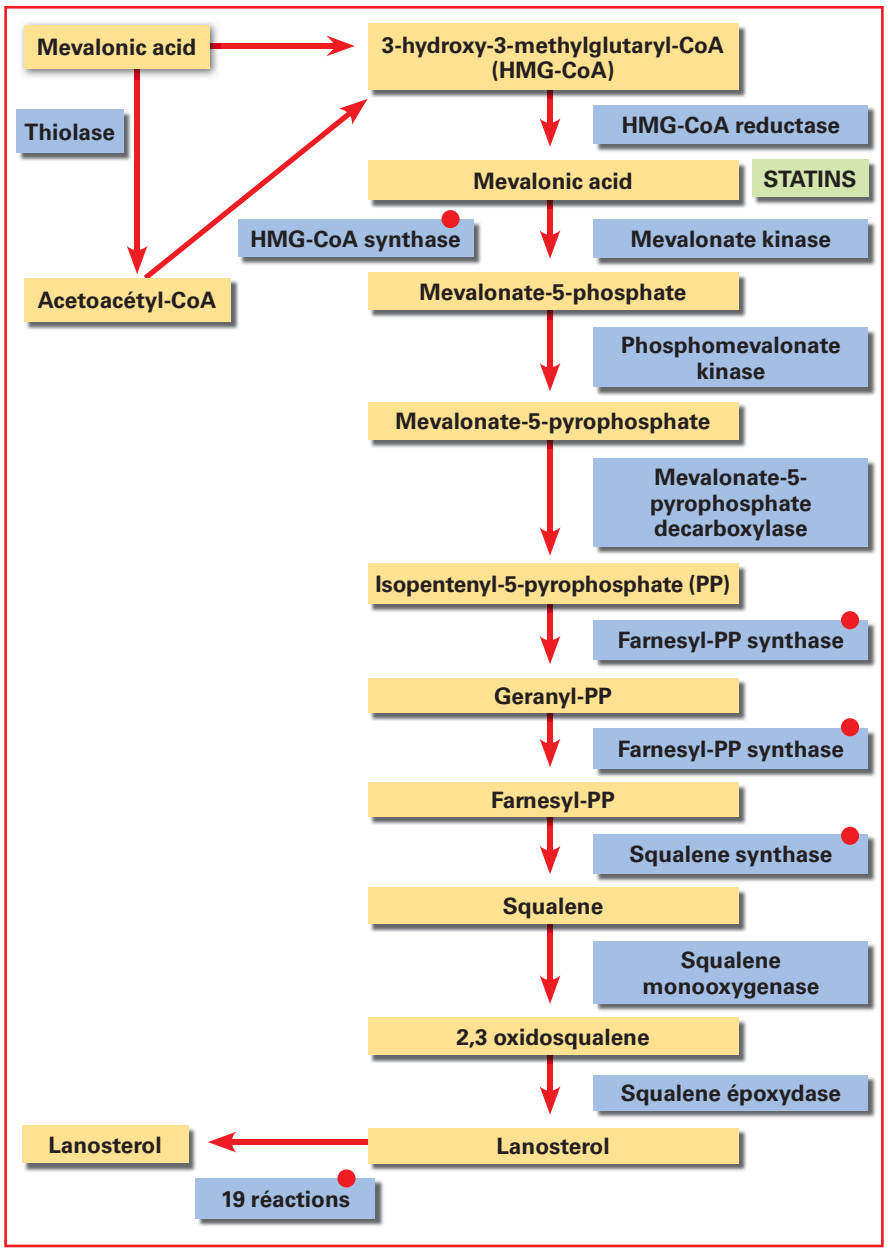


Figure 1. Principales enzymes impliquées dans la synthèse endogène du cholestérol. Les androgènes stimulent la voie de biosynthèse du cholestérol en induisant l'expression des enzymes marquées d'un ●. Parmi les 19 réactions mises en jeu pour la formation du cholestérol depuis le lanostérol, les androgènes stimulent la 3-β-hydroxystérol-Δ-24 réductase (DHCR24). A l'inverse, les statines bloquent cette voie en inhibant l'HMGCoA réductase (D'après Brown et Goldstein [38]).

non diagnostiqués et connus pour diminuer les quantités de cholestérol circulant [9]. En effet, il a ensuite été établi que le niveau de cholestérol circulant diminue avant les signes d'appel et le diagnostic du cancer. Ainsi cette corrélation inverse est perdue si les 5 à 9 premières années de suivie sont exclues des études [10, 11]. Ces données démontrent que l'association entre de faibles taux de cholestérol circulants et le risque de cancer est donc due à un lien de causalité inverse.

D'un autre côté, des études ont montré qu'un « faible » taux de cholestérol circulant (< 200 mg/dl) est associé à une réduction du risque de développer un cancer de la prostate de haut grade (score de Gleason 8-10) [12]. Existe-il alors une association entre la prise de statines, agents hypocholestérolémiants, et le risque de cancer ? Les statines se concentrent essentiellement au niveau du foie et leurs effets hypocholestérolémiants s'expliquent majoritairement par l'inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA réductase), enzyme limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol depuis le mévalonate (Figure 1). Les études épidémiologiques rétrospectives effectuées sur des cohortes de patients traités pour des maladies cardiovasculaires montrent que la prise de statines diminue de façon importante le nombre de cancers agressifs de la prostate [13, 14] surtout lorsque la durée du traitement est supérieure à 5 ans [15, 16].

Au final, ces données épidémiologiques montrent que de fortes quantités de cholestérol circulant augmentent le risque de cancer avancé de la prostate alors que la prise d'agents hypocholestérolémiants comme les statines diminue ce risque, indiquant *de facto* le rôle promoteur du cholestérol dans la progression tumorale et/ou l'invasion métastatique.

Le cholestérol dans les tumeurs prostatiques

Après les travaux de White [1] qui montrent une accumulation de cristaux de nature lipidique dans les tumeurs, Swyer et al. sont les premiers à rapporter une augmentation de cholestérol dans les zones atteintes d'hypertrophie bénigne de la prostate par rapport aux tissus sains [17]. Par la suite ces observations se sont généralisées à d'autres types de cancers tels que les tumeurs gastro-intestinales, du poumon ou du rein. Deux mécanismes ont été identifiés :

– une augmentation du captage du cholestérol circulant [18, 19] associée à la perte des mécanismes régulateurs de l'expression du récepteur aux LDL [20] ;

– une augmentation de l'expression des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol comme l'HMG-CoA réduc-

tase [21] (Figure 1). Dans les deux cas, il s'agit de mécanismes actifs qui favorisent la disponibilité intracellulaire du cholestérol au cours du développement tumoral. Nygren et al. observent également une augmentation de cholestérol dans les cellules qui entourent les tissus cancéreux et suggèrent alors un évènement précoce dans la transformation tumorale [22]. Ceci soulève la question des mécanismes moléculaires par lesquels le cholestérol peut favoriser la progression tumorale.

Rafts lipidiques et cancer de la prostate

Dans les membranes plasmiques ou intracellulaires, le cholestérol s'accumule en partie dans des radeaux *(rafts)* lipidiques, aussi connus sous le nom de DRM *(detergent-resistant membrane domains)* ou encore DIG *(detergent-insoluble, glycolipid-enriched complexes)*. La présence de la cavéoline 1, marqueur des radeaux lipidiques, est un signe de mauvais pronostic associé aux cancers agressifs de la prostate [23, 24]. A l'inverse, l'administration d'un anticorps dirigé contre la cavéoline 1 bloque la dissémination métastatique du cancer de la prostate chez la souris, suggérant le lien potentiel entre les *rafts* et la progression tumorale [25]. Depuis ces dernières années les *rafts* lipidiques sont considérés comme de véritables plateformes impliquées dans la transduction des signaux intracellulaires. Ainsi la serine-thréonine kinase AKT est activée par phosphorylation au niveau de ces microdomaines lipidiques pour stimuler les processus de survie et de croissance cellulaire dans les tumeurs prostatiques. Cette phosphorylation est en partie dépendante de la présence de cholestérol dans la membrane qui, par sa présence, augmente la coalescence des *rafts* facilitant ainsi le recrutement de AKT au niveau de la membrane plasmique [26]. Le traitement des cellules cancéreuses prostatiques par la simvastatine (statine), la méthyl-beta-cyclodextrine (chélateur de cholestérol) ou la filipin (agent dispersant le cholestérol dans la membrane), diminue la phosphorylation de AKT au niveau des *rafts* et entraîne par conséquent l'apoptose des cellules [27]. Ce rôle du cholestérol membranaire semble spécifique des cellules cancéreuses puisque la filipin ne modifie ni la phosphorylation de AKT ni l'apoptose des cellules normales de prostate PrEC [28].

Des récepteurs nucléaires modulant les taux de cholestérol comme cibles pharmacologiques dans le cancer de la prostate ?

L'homéostasie du cholestérol est sous le contrôle de certains récepteurs nucléaires tels que ceux des oxystérols (LXR ; *Liver X Receptor*) et celui des androgènes (AR ; *Androgen Receptor*). Un dysfonctionnement de ces facteurs de transcription pourrait permettre d'expliquer les dérèglements lipidiques observés dans les cellules tumorales, en en faisant ainsi des cibles pharmacologiques.

Ces récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription activables par des ligands. D'un point de vue structural, ils sont schématiquement constitués de trois domaines fonctionnellement indépendants (pour une revue lire [29]). Du côté amino-terminal, le domaine modulateur possède une fonction d'activation de la transcription AF1 *(Activating Function 1)* indépendante du ligand et possède plusieurs sites putatifs de phosphorylation. Le domaine central de liaison de l'ADN est constitué d'une structure en doigts de zinc comportant une boîte P impliquée dans la spécificité de fixation à l'élément de réponse hormonale et la boîte D, responsable de l'hétérodimérisation des récepteurs, ainsi qu'une région carboxy-terminale (CTE) participant aussi à la spécificité de fixation à l'élément de réponse. Enfin, le domaine carboxy-terminal est constitué d'une poche hydrophobe autorisant la fixation du ligand ; il permet également la dimérisation du récepteur et possède une région transactivatrice AF2 *(Activating Function 2)* qui est démasquée en présence du ligand et qui peut recruter des co-activateurs, acteurs moléculaires indispensables à l'initiation de la transcription.

Androgen receptor (AR)

Les androgènes font partie des principaux facteurs responsables de la progression du cancer de la prostate. Ainsi, l'administration d'anti-androgènes tels que le bicalutamide (Casodex®), la cyprotérone (Androcur®), le flutamide (Eulexine®) ou le nilutamide (Anandron®), visant à bloquer l'action des androgènes sur AR, voire le finastéride (Chibro-Proscar®) ou le duastéride (Avodart®), tous deux inhibiteurs de la 5-alpha-réductase, est une thérapie couramment utilisée dans le traitement du cancer de la prostate.

Il est intéressant de noter que certains gènes cibles des androgènes sont impliqués directement dans le métabolisme du cholestérol (Figure 1). C'est le cas de la *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA synthase* (HMGCo-A-Synt) et *reductase* (HMGCo-A-Red), la *farnesyl diphosphate synthase, la 3-β-hydroxysterol-Δ-24 reductase* (DHCR24), la *squalene synthase* (SQS) qui interviennent dans la synthèse du cholestérol mais aussi de la *sterol regulatory element-binding protein-2* (SREBP-2), facteur de transcription contrôlant les gènes de synthèse du cholestérol ou encore de *SREBP-cleavage-activating protein* (SCAP), senseur de cholestérol responsable de l'activation de SREBP. De même, les androgènes contrôlent l'entrée et l'efflux de cholestérol en régulant respectivement l'expression du récepteur aux LDL (LDLR) et des transporteurs membranaires tels que *ATP-binding cassette A1* (ABCA1) (pour une revue lire [30]). Le contrôle transcriptionnel de ces gènes cibles a pour conséquence une augmentation de la concentration en cholestérol intracellulaire qui s'explique à la fois par une stimulation de sa synthèse, une augmentation de son entrée depuis le milieu extracellulaire et enfin une inhibition de son efflux (Figure 2). De manière intéressante, le cholestérol ainsi accumulé peut être utilisé par les cellules tumorales prostatiques comme substrat pour la synthèse d'androgènes [31] (Figure 2). Cette capacité de synthèse *de novo* d'androgènes confère un avantage certain aux cellules qui ne sont alors plus dépen-

dantes des androgènes circulants. Ce mécanisme permet de comprendre i) la sensibilité/dépendance importante des tumeurs prostatiques vis-à-vis du cholestérol par rapport aux autres types de tumeurs et ii) comment la croissance des cellules tumorales devient inexorablement indépendante des androgènes et donc d'expliquer l'évolution vers un échappement thérapeutique. De façon simpliste on peut évoquer un cercle vicieux dans lequel les androgènes favorisent l'accumulation de cholestérol, lui-même utilisé pour la production d'androgènes (Figure 2).

Cette dépendance des cellules tumorales vis-à-vis du cholestérol est maintenant bien caractérisée et les effets du cholestérol sur le développement tumoral (direct ou indirect *via* les androgènes) sont bien établis. Ainsi est-il possible qu'un des mécanismes d'action des anti-androgènes passe par le blocage de l'accumulation de cholestérol dans la cellule cancéreuse et inhibe, au moins temporairement, la progression tumorale.

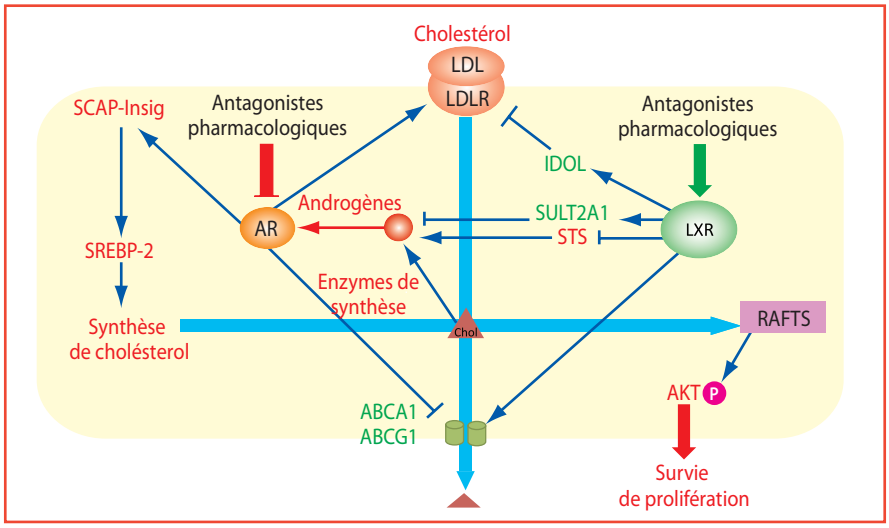


Figure 2. **Régulation de l'homéostasie du cholestérol dans une cellule tumorale prostatique : actions de AR et LXR.**
ABCA1 : A *TP-binding cassettes A1*, AR : *androgen receptor*, Chol. : cholestérol, IDOL : *inducible degrador of LDLR*, LDL : *low density lipoprotein*, LDLR : *ldl receptor*, LXR : *liver X receptor*, AKT : *alpha serine/threonine-protein kinase*, SCAP: *SREBP-cleavage-activating protein*, SULT2A1 : *hydroxysteroid-sulfotransferase 2A1*, SREBP-2 : *sterol regulatory element-binding protein-2*, STS : *steroid-sulfatase*. Les facteurs favorisant la progression tumorale apparaissent en rouge. A l'inverse, en vert, figurent les éléments qui inhibent la progression. Les pointes de flèches symbolisent une activation tandis que les flèches plates indiquent une inhibition. P : Phosphorylation.

Liver X Receptor

Isolés initialement dans le foie, les deux isoformes de ces récepteurs, LXRα et LXRβ, ont jusqu'à 80 % d'identité dans les domaines de liaison de l'ADN et de l'hormone. LXRβ est ubiquiste, alors que LXRα a une expression plutôt restreinte aux tissus présentant un fort métabolisme lipidique (pour une revue lire [32]). Les LXRs forment des hétérodimères obligatoires avec le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque 9-cis RXR *(Retinoid X Receptor)*. En l'absence de ligand et dans leur fonctionnement canonique, les hétérodimères RXR/LXR sont constitutivement fixés sur leurs éléments de réponse à l'ADN. Les ligands des LXRs sont les oxystérols, dérivés naturels du cholestérol. Des agonistes synthétiques tels que le T0901317 ou le GW3965 capables d'activer spécifiquement les LXRs ont été développés. La présence d'un des deux ligands (de RXR ou LXR) induit le recrutement de co-activateurs créant un environnement permissif pour l'initiation de la transcription. L'étude phénotypique de souris dont les gènes codant LXRα et LXRβ ont été invalidés par recombinaison homologue (*lxrα* ; β-/-) et l'analyse de leurs protéines cibles ont permis d'associer les LXRs *in vivo* à cinq grandes fonctions physiologiques [32] : (1) le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et (2) de celle des acides gras, (3) le contrôle de la glycémie, (4) l'inflammation et (5) la stéroïdogenèse. Au niveau de l'homéostasie lipidique, les LXRs sont considérés comme des facteurs hypocholestérolémiants. En effet lorsque les souris lxrα-/- sont nourries avec un régime hypercholestérolémiant, elles développent une hépatomégalie caractérisée par une accumulation d'esters de cholestérol dans les hépatocytes, non compensée par la présence de LXRβ. Chez les souris sauvages, LXRα stimule l'expression du gène codant la *cholesterol-7α-hydroxylase* (CYP7A1), enzyme catalysant l'étape initiale et limitante de la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, permettant la transformation et l'élimination de l'excès de cholestérol en acides biliaires par l'intestin. La stéatose hépatique des souris *lxrα*-/- est due à une faible expression du gène *cyp7a1*. De plus, les LXRs stimulent l'expression de certains transporteurs de la famille *ATP-Binding Cassettes* (ABC) comme ABCA1, ABCG5 et ABCG8, responsables de l'efflux de cholestérol des cellules. Par ailleurs les LXRs stimulent le retour hépatique du cholestérol par les *high density lipoprotein* (HDL) *via* la régulation des apolipoprotéines ApoE/CI/CII/CIV qui les composent. Les LXRs sont également capables de limiter l'entrée de cholestérol dans les cellules en inhibant le récepteur des LDL (LDLR) [33]. Ce mécanisme indirect passe par la régulation transcriptionnelle du gène *inducible degrador of LDLR (idol)*. En outre, l'activation des gènes codant *sterol regulatory element binding protein 1c (srebp-1c), fatty acid synthase (fas)* et *acetyl-CoA carboxylase (acc)* confère aux LXRs un effet hypertriglycéridémiant temporaire, favorisant les voies de synthèse des acides gras. Enfin, les LXRs sont des régulateurs fondamentaux de la synthèse de stéroïdes aux niveaux cortico-surrénalien, ovarien et testiculaire, et interviennent dans le métabolisme hépatique des androgènes [34]. En effet, l'activation pharmacologique par du T0901317, ou la surexpression génique de *lxrα* dans le foie

entraîne une diminution de la quantité de testostérone dans les tissus cibles tels que la prostate et ce par deux mécanismes bien établis :

– LXRα active l'expression de *sult2a1*, une *hydroxysteroid-sulfotransferase* essentielle pour la désactivation métabolique des androgènes et

– LXRα inhibe l'expression de *sts*, une *steroid-sulfatase* qui active les androgènes par sulfatation. Ainsi le traitement de souris par le T0901317 ou la surexpression hépatique de *lxrα* entraîne une diminution de la taille des prostates. En culture de cellules, l'activation des LXRs bloque à la fois la croissance cellulaire et l'expression du gène *prostate specific antigen (psa)* induite par les androgènes. Malgré l'absence d'étude claire à ce sujet, il est tout à fait possible d'envisager que cette « activité anti-androgénique » des LXRs puisse participer au blocage de l'activité lipogénique de AR décrite précédemment et ainsi s'opposer à l'accumulation de cholestérol dans les cellules.

Le traitement de lignées cellulaires tumorales prostatiques par des agonistes naturels des LXRs, tels que le 22(R)-hydroxycholestérol et le 24(S)-hydroxycholestérol, ou synthétique, comme le T0901317, entraîne un ralentissement du cycle cellulaire caractérisé par une diminution de l'accumulation de Skp2 [35]. Skp2 est une protéine responsable de la dégradation par le système ubiquitine-protéasome de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p27*Kip1*. Le traitement de cellules LNCaP par du T0901317 entraîne alors une augmentation de p27Kip1 qui est peu ou pas dégradée par le protéasome pouvant ainsi expliquer l'effet inhibiteur du T0901317 sur le cycle cellulaire. De plus, le traitement des cellules LNCaP avec du T0901317 provoque une augmentation de l'accumulation de ABCA1 et l'efflux du cholestérol vers le milieu extracellulaire cellulaire [35] (Figure 2). Les auteurs proposent ainsi que l'activité antiproliférative du T0901317 passe, au moins en partie, par cette diminution de la quantité de cholestérol intracellulaire.

Plus récemment nous avons mis en évidence l'activité pro-apoptotique des LXRs. Leur activation entraîne la mort des cellules de LNCaP *(lymph node cancer prostate)* par apoptose et une inhibition de la croissance tumorale sur des modèles de xénogreffes [36]. Nos résultats montrent que l'activation des LXRs diminue la quantité de cholestérol intratumorale par un contrôle transcriptionnel des transporteurs ABCG1, responsables, comme ABCA1, de l'efflux de cholestérol. L'analyse de la composition et des caractéristiques morphologiques des *rafts* membranaires par microscopie à force atomique a permis de montrer que cette diminution intracellulaire de cholestérol se traduisait par une réduction de leur taille mais aussi de leur activité. L'activation des LXRs s'accompagne d'une diminution importante de la protéine phospho-AKT, acteur clé dans les mécanismes de survie cellulaire connu pour être activé par phosphorylation au niveau des *rafts* (Figure 2). L'apport exogène de cholestérol maintient la phosphorylation de AKT dépendante des *rafts* et bloque ainsi l'apoptose induite par l'activation des LXRs.

Ainsi, ces données démontrent les propriétés « anti-oncogéniques » des LXRs, à la fois par leur action sur la biodisponibilité des androgènes au niveau des cellules prostatiques, sur l'accumulation de molécules clés du cycle cellulaire, et la modulation de la distribution du cholestérol dans les *rafts* lipidiques *via* le contrôle des cassettes d'efflux de cholestérol.

Conclusion

Qu'elle soit d'origine alimentaire ou bien la résultante de diverses dérégulations, une quantité élevée de cholestérol dans les cellules cancéreuses est un facteur favorisant la progression tumorale. Les composés pharmacologiques qui diminuent directement ou indirectement la quantité de cholestérol intracellulaire sont capables d'inhiber la prolifération et la survie cellulaire. La figure 2 schématise la gestion du cholestérol dans une cellule tumorale prostatique avec les acteurs (en rouge) qui favorisent la présence de cholestérol et donc la progression tumorale et à l'inverse, les acteurs (en vert) qui s'opposent à l'accumulation de cholestérol et inhibent le développement tumoral. Pour l'instant, l'accumulation de cholestérol au niveau des *rafts* est le mécanisme principal par lequel le cholestérol favorise la survie et la prolifération cellulaire. Ainsi, l'action antiproliférative des statines ou des agonistes de LXR passe par une diminution de l'activité des *rafts*. Ce mécanisme largement décrit dans le cancer de la prostate s'étend plus largement à d'autres types cancers. Actuellement, les recherches s'orientent logiquement vers l'étude de composés pharmacologiques capables d'inhiber la formation des *rafts* (edelfosine) et Mollinedo et al. présentent des résultats prometteurs quant à l'utilisation de l'edelfosine dans le traitement des myélomes multiples [37].

(Travaux en partie financés par la FRM, la Fondation BNP-Paribas, l'ARC, La Ligue Contre le Cancer, l'ARTP, la région Auvergne).

Références

1. White C, J Pathol Bacteriol 1909 ; 13:3.
2. Belot A et al, Rev Epidemiol Sante Publique 2008 ; 56:159.
3. Gronberg H, Lancet 2003 ; 361:859.
4. Watanabe M et al, Urol Oncol 2000 ; 5:274.
5. Michaud DS et al, Cancer Causes Control 2001 ; 12:557.
6. Kolonel LN et al, J Natl Cancer Inst 1999 ; 91: 414.
7. Jacobs EJ & Gapstur SM, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 ; 18:2805.
8. Eichholzer M et al, Am J Clin Nutr 2000 ; 71:569.
9. Freeman MR & Solomon KR, J Cell Biochem 2004 ; 91:54.
10. Ahn J et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 ; 18:2814.
11. Law MR & Thompson SG, Cancer Causes Control 1991 ; 2:253.
12. Platz EA et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 ; 18:2807.
13. Murtola TJ et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007 ; 16:2226.
14. Platz EA et al, J Natl Cancer Inst 2006 ; 98:1819.
15. Flick ED et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007 ; 16:2218.
16. Jacobs EJ et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007 ; 16:2213.
17. Swyer G, Cancer Res 1942 ; 2:372.
18. Graziani SR et al, Gynecol Oncol 2002 ; 85:493.
19. Tatidis L et al, Biochem Pharmacol 2002 ; 63:2169.
20. Chen Y & Hughes-Fulford M, Int J Cancer 2001 ; 91:41.
21. Caruso MG et al, Anticancer Res 1999 ; 19:451.
22. Nygren C et al, Br J Neurosurg 1997 ; 11:216.
23. Satoh T et al, Cancer 2003 ; 97:1225.
24. Yang G et al, Clin Cancer Res 1998 ; 4:1873.
25. Tahir SA et al, Cancer Res 2001 ; 61:3882.
26. Lasserre R et al, Nat Chem Biol 2008 ; 4:538.
27. Zhuang L et al, J Clin Invest 2005 ; 115:959.
28. Zhuang L et al, Cancer Res 2002 ; 62:2227.
29. Mouzat K et al, Med Sci (Paris) 2009 ; 25:141.
30. Swinnen JV et al, J Steroid Biochem Mol Biol 2004 ; 92:273.
31. Dillard PR et al, Mol Cell Endocrinol 2008 ; 295:115.
32. Volle DH & Lobaccaro JM, Mol Cell Endocrinol 2007 ; 265-266:183.
33. Zelcer N et al, Science 2009 ; 325:100.
34. Lee JH et al, Endocrinology 2008 ; 149: 3778.
35. Fukuchi J et al, Cancer Res 2004 ; 64:7686.
36. Pommier AJ et al, Oncogene 2010 ; 29:2712.
37. Mollinedo F et al, Oncogene 2010 ; 29:3748.
38. Goldstein JL & Brown MS, Nature 1990 ; 343:425.

Article 5: Targeting Liver X Receptors in human health: deadlock or promising trail?

Article accepté dans *Expert opinion of therapeutical target*

Emilie Viennois, Aurélien J. C. Pommier, Kevin Mouzat, Abdelkader Oumedour, Fatim-Zora El Hajjaji, Julie Dujour, Françoise Caira, David H. Volle, Silvère Baron and Jean-Marc A. Lobaccaro

Expert Opinion

1. LXR, two members of the nuclear receptor superfamily
2. Physiological functions of LXR
3. Putative pharmacological targeting
4. Conclusion
5. Expert opinion

informa
healthcare

Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?

Emilie Viennois, Aurélien JC Pommier, Kévin Mouzat, Abdelkader Oumeddour, Fatim-Zohra El Hajjaji, Julie Dufour, Françoise Caira, David H Volle, Silvère Baron & Jean-Marc A Lobaccaro†
†"Génétique Reproduction et Développement", Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France

Introduction: Liver X receptors (LXR) are transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. Natural derivatives of cholesterol, known as oxysterols, have been identified as agonistic ligands of LXR. They are thus mainly considered to be intracellular cholesterol 'sensors' whose activation leads to decreased plasma cholesterol. Their implication in other physiologic processes currently prevents their use as therapeutic targets, because of potentially deleterious side effects.

Areas covered: The various LXR agonists and antagonists, along with the physiological functions of LXR. Putative clinical targets including atherosclerosis, diabetes, Alzheimer's disease, skin disorders, reproductive disorders and cancer.

Expert opinion: LXR are promising pharmacological targets because of the high potential to develop ligands owing to the variety of natural or synthetic agonists. Three aspects should be developed to select a LXR-ligand for treatment of human disease: bio-availability; isoform specificity; tissue specificity. This will allow the development of selective liver X modulators (SLiMs). The challenge is to overcome deleterious side effects to establish LXR as new pharmacological targets.

Keywords: cancer, human diseases, LXR, nuclear receptors, pharmacology, reproduction

Expert Opin. Ther. Targets (2011) 15(2):1-14

1. LXR, two members of the nuclear receptor superfamily

Liver X receptor (LXR) a (NR1H3) and LXRb (NR1H2) belong to a subclass of the nuclear receptor superfamily, that form obligatory heterodimers with retinoid receptor (RXR) [1], the receptor of 9-cis retinoic acid. In humans LXRa and LXRb are encoded by two distinct genes located on chromosomes 11p11.2 and 19q13.3, respectively. LXR were initially isolated from a human liver cDNA library as orphan receptors [1,2]. Later, oxysterols, which are oxidized derivatives of cholesterol, were identified as their natural ligands [3] and the first physiological functions were associated with cholesterol homeostasis.

LXRa was initially described as being highly expressed in a restricted subset of tissues known to play an important role in lipid metabolism such as liver, small intestine, kidney, spleen and adipose tissue whereas LXRb was found to be ubiquitously expressed [4] (for LXR distribution in mouse see [5]).

1.1 Structure

Similar to other nuclear receptors, both LXR isoforms comprise four distinct domains: i) an amino-terminal activation domain (AF-1), recruiting ligand-independent co-activators, ii) a DNA-binding domain containing two zinc

10.1517/14728222.2011.547853 © 2011 Informa UK, Ltd. ISSN 1472-8222
All rights reserved: reproduction in whole or in part not permitted

Article highlights.

- Liver X receptors (LXR) are nuclear receptors activated by natural and synthetic ligands. The chemical range of these ligands is broad, which opens up various opportunities to design new activators.
- LXR modulate numerous physiological functions: fatty acid and cholesterol synthesis and metabolism, glucose homeostasis, steroidogenesis and immunity.
- LXR-deficiency in mice results in several pathologies mimicking pathological conditions in humans (atherosclerosis, diabetes, Alzheimer's disease, skin disease, male and female reproductive disorders and cancers). This demonstrates that LXR could be potent pharmacological targets.
- The design of new ligands will have to focus on their bioavailability and specificity towards LXR isoforms and target tissues.

This box summarizes key points contained in the article.

fingers, iii) a hinge domain, binding co-repressors in absence of ligand and iv) a multi-functional carboxy-terminal domain, required for dimerization, containing a hydrophobic ligand-binding site and a transactivation domain (AF-2) recruiting co-activators [6,7]. Interestingly, even though both DNA- and ligand-binding pockets share 80% identity, human and mouse LXRb are shorter than LXRa in their N-terminal domain (12 and 11 amino acids, respectively) and longer in the hinge region (23 and 18 amino acids, respectively) (Figure 1). This fact could account for the lack of redundancy in vivo, even though both LXR isoforms bind similar DNA sequences and ligands in vitro.

1.2 Mechanism of activation

In the absence of ligand, Li et al. showed that LXR are acetylated proteins [8] (at residues K432 in LXRa and K433 in LXRb, adjacent to the AF2 domain) and constitutively bound with RXR to their LXR response element (LXRE) localized on target gene promoters. The heterodimer interacts with co-repressors, for example nuclear receptor co-repressor (N-CoR) or silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) [9], which blocks transcription by recruitment of histone deacetylase through the interaction with proteins such as stress activated MAP kinase interacting protein 3A (Sin3A) [10] (step 1, Figure 2). Oxysterol binding to LXR (step 2) leads to modifications of the carboxy-terminal domain that in turn induce the release of the co-repressors. This rearrangement leads to the release of helix 12 that acts as a trap blocking the ligand in its binding pocket. This reinforces interactions of co-activators such as activating signal cointegrator-2, (ASC-2) [11] on the AF-2 domain [12]. This cascade of events sets the chromatin into a permissive state (step 3). Concomitantly, sirtuine 1 induces the deacetylation of LXR (step 4). This is followed by LXR ubiquitinylation (step 5) and degradation by the proteasome (steps 6 and 7).

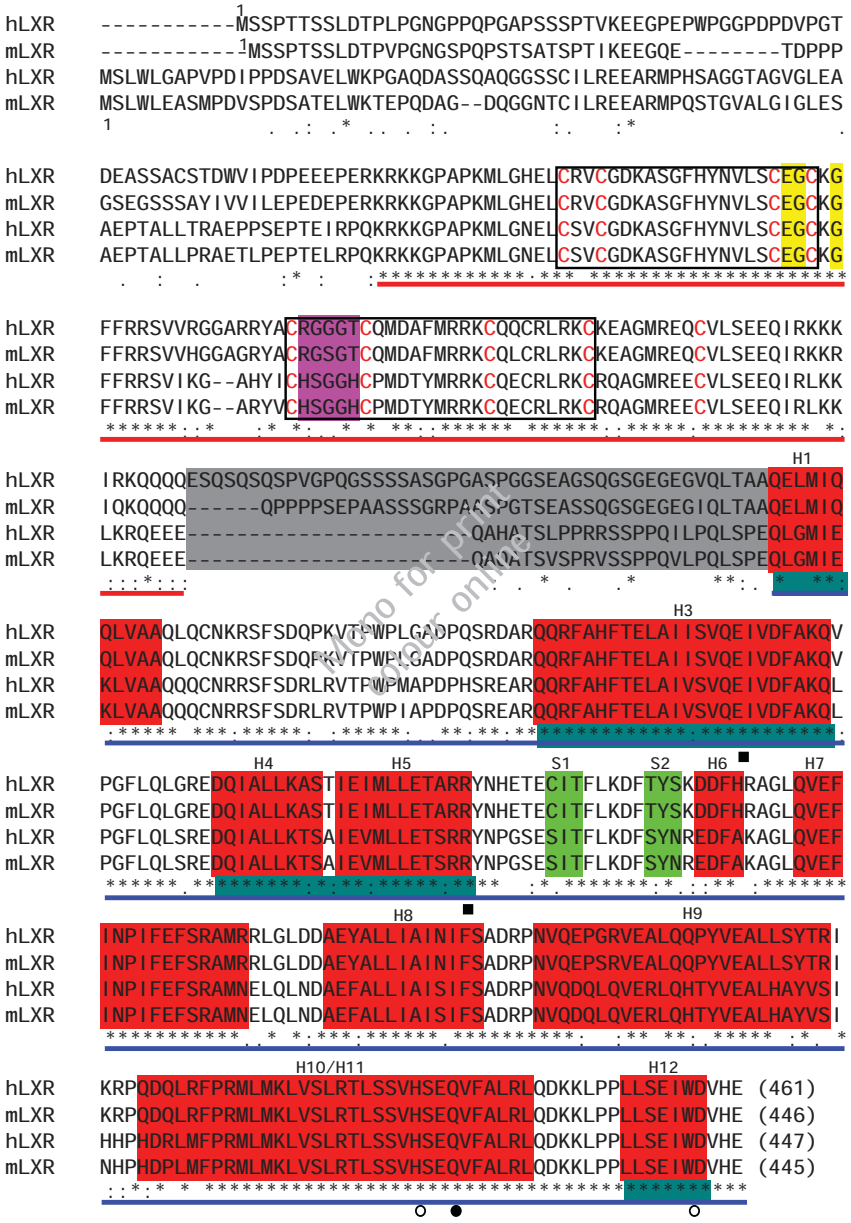
1.3 Ligands

Among the various molecules that can bind LXR, agonists induce the transcriptional activity of LXR while antagonists block their activities on target genes.

1.3.1 Ligands with agonistic activity

A large number of natural LXR ligands have been described. In mammals the physiological LXR agonist ligands are oxysterols, oxidized metabolites of cholesterol (for a review on oxysterols see [13]. Schematically, in mammals, there are two sources of plasmatic oxysterols: i) in vivo production by enzymatic or chemical pathways; ii) exogenous nutritional supply [7]. Natural activating oxysterols include 22(R)-hydroxycholesterol in steroidogenic tissues, 24(S)-hydroxycholesterol in brain and plasma, 24(S), 25-epoxycholesterol mainly found in the liver and 27-hydroxycholesterol in macrophages. These oxysterols have been reported to activate both LXRa and LXRb [3,7,14]. Besides these oxysterols, other cholesterol derived molecules such as the follicular fluid meiosis activating sterol (FF-MAS) have been described as potent activators of LXRa. Likewise, desmosterol, a cholesterol precursor produced from zymosterol, could also activate LXR [15]. Molecules derived from the bile acid pathway in particular natural 6a-hydroxylated bile acids have been proposed as putative ligands inducing transcriptional activity of LXRa [16]. Various compounds derived from plants or fungi are potential activators of LXR. These include ergostan4,6,8,22-tertraen-3-one derived from Tolypocladium inflatum [17], a fungus isolated from Norwegian soil that produces cyclosporin in certain conditions; acanthoic acid from rollinia [18], an exotic tropical fruit; gynosaporine from Gynostemma pentaphyllum [19], also called jiaogulan, an herbaceous vine of the family Cucurbitaceae; paxillin from Penicillium paxilli [19], a fungus. Interestingly these molecules do not necessarily present an oxysterol-like structure, which suggests that the pharmacology of LXR and the discovery of natural ligands are at the beginning of their history.

Many pharmaceutical companies have screened potential LXR ligands (for a review see [20]). Among them T0901317 [21] and GW3965 [22], two nonsteroidal synthetic LXR agonists, are commonly used in experimental studies. T0901317, in contrast with GW3965, is not completely selective for LXR [23-25]. However, a human therapeutic use of these molecules is impossible because of their temporary hypertriglyceridemic effect [26-28]. A promising synthetic ligand was identified by Makishima's group [29]. Derived from ergosterol, a phytosterol of fungal cell membranes, (22E)-ergost-22-ene-1a,2b diol (YT-32) proved to be a potent LXR activator in vitro as well as in vivo. It induced a reduction in plasma cholesterol concentration and was not associated with the hypertriglyceridemia normally observed with synthetic LXR agonists. To explain this selectivity, Kaneko et al. [29] suggested that YT-32 may reduce the



Author for proof
Not for print or online

Figure 1. Protein sequence alignments of human (h) and mouse (m) LXRa and LXRb. (*) identical amino acids; (:) similar amino acids; (.) structurally related amino acids. The 9 Cys of the DNA-binding domain are indicated in red type. DNA- and ligand-binding domains are underlined in red and blue, respectively. The two zinc fingers are boxed. P box, D box, hinge region, alpha helixes (H) and beta sheet (S) are shadowed in yellow, purple, gray, red and green, respectively. Amino acids LLSEIWD within the AF2 domain are in bold type. The contact surfaces with the cofactor glutamate receptor interacting protein (GRIP) are shadowed in deep turquoise. Amino acids allowing the anchorage/discrimination of agonists (open circles), 22(S) hydroxycholesterol (black circle) and poly unsaturated fatty acids (black squares) are according to [12,109]. The positions of the alpha helixes are according to [110].

intestinal absorption of cholesterol, by inducing expression of the transporters ATP-binding cassette, sub-family G (ABCG) 5 and ABCG8 (see Section 2.1.1.3), which could excrete the compound from the apical membranes of mucosal cells. A second hypothesis was that YT-32 could be secreted into the bile by ABCG5 and ABCG8, before it could induce expression of lipogenic genes in the liver. A third explanation could be a tissue-specific agonist activity depending on co-factor recruitment as observed for selective estrogen receptor modulators. GSK has also developed a non steroidal

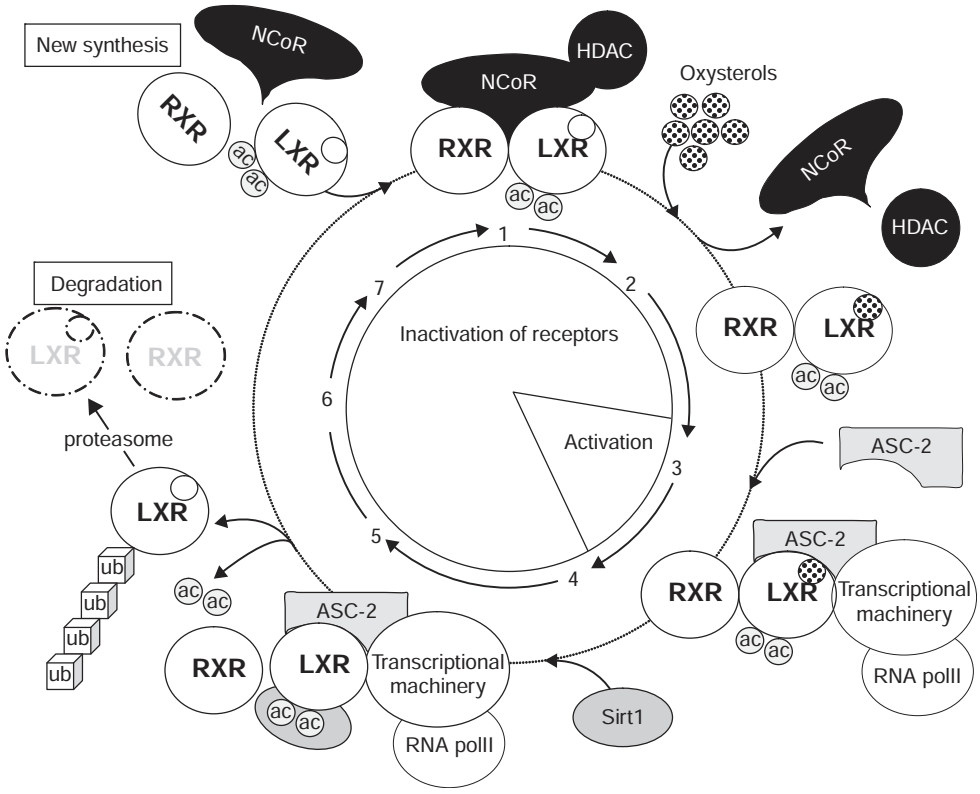


Figure 2. Schematic representation of the activation/inhibition cycle of liver-X-receptor (LXR) heterodimerizing with retinoid X receptor (RXR). In the absence of ligand, LXR/RXR is bound on DNA together with transcriptional co-repressor. Agonist binding of one of the two receptors will induce departure of co-repressor (for example nuclear receptor corepressor (NcoR)) and recruitment of a large series of co-activator (for example activating signal cointegrator-2 (ASC-2)) on the AF2 domain. At the same time, transcriptional machinery proteins and RNA polymerase II will increase the transcription of the target gene, which will fianlly activate the physiological response. The role of Sirtuine 1 (Sirt1) is to deacetylate LXR, which will be ubiquitinylated and directed toward the proteasome.
Adapted from [111].
Ac: Acetylation; HDAC: Histone deacetylase; Ub: Ubiquitin.

compound closely related to GW3965 (GW6340) [30], which specifically activates intestinal ABCA1, G5 and G8 expression (see Section 2.1.1.3) in the absence of hepatic target gene induction.

Wyeth's compound (LXR-623, an indazole) was tested in Phase I clinical trials [31,32]: LXR target genes involved in the reverse transport of cholesterol were upregulated in the macrophages of healthy volunteers without any induction of triglyceride synthesis. However, trials were terminated after observation of adverse effects on theCNS. Pharmaceutical companies have focused their efforts on the identification of molecules specific of each LXR isoform. Unfortunately, as described above, there are only minor differences in the LBD of LXRa and LXRb (Figure 1). This high similarity prevents the development of a or b-selective ligands. Nevertheless Wyeth Company has demonstrated that heterocyclic scaffolds such as WYE-672, a phenylsulfone-substituted quinoxaline, are orally active and LXRb selective agonists [33].

1.3.2 Ligands with antagonistic activity

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) known to be PPARa and PPARd agonists, especially arachidonic acid, are the main competitive natural antagonists of the interaction between LXRs and their ligand [34,35]. A physiological role of such antagonistic activity has been found associated with the regulation of hepatic fatty acid elongase 5 (Elovl5; [36]). Indeed, PUFAs could mediate a negative feedback regulation on their own synthesis by blocking the transcription of sterol regulatory element binding protein 1c (srebp1c), a master gene involved in fatty acid synthesis, through repression of LXRa (for more details see Section 2.1.2).

Guttiferone from Garcinia humilis [37], a fruit commonly known as achacha and traditionally grown in Bolivia, and riccardin, from the liverwort Blasia pusilla [38], are natural antagonist compounds. From a therapeutic point of view, there is little need for LXR inhibition. It is therefore not surprising that very few synthetic compounds with

antagonist activity have been identified. 22(S)-hydroxycholesterol [39] and esterified-fibrates [40] block LXR activity by occupation of the ligand-binding pocket without induction of co-factor recruitment.

2. Physiological functions of LXR

Over the last two decades, identification of the physiological functions of nuclear receptors has been the main focus of many research teams throughout the world. It has led to the development of new biological concepts such as 'reverse endocrinology' [41]. The development of synthetic agonists and the study of LXR-deficient mice (LXR knock out or $LXR^{-/-}$ mice) have resulted in the discovery of unanticipated nuclear signaling pathways for oxysterols with important physiological and pharmacological ramifications. Altogether, LXR functions can be schematically associated with four physiological functions: i) lipid metabolism including fatty acid and cholesterol homeostasis, ii) glucose homeostasis, iii) steroidogenesis, and iv) immunity (Figure 3).

2.1 LXR and lipid metabolism

2.1.1 Regulation of cholesterol homeostasis

LXR regulate cholesterol homeostasis by acting on three pathways: inhibition of de novo synthesis, induction of bile acid synthesis and activation of reverse cholesterol transport.

2.1.1.1 De novo synthesis

LXRa-deficient mice are characterized by a higher basal expression of several genes involved in hepatic cholesterol metabolism such as srebp2 and its target genes HMG-CoA reductase and synthase, farnesyl diphosphatase and squalene synthase [42]. In addition, T0901317 inhibits expression of the genes encoding squalene synthase and HMG-CoA synthase in vivo [21].

2.1.1.2 Bile acid synthesis

LXRa-, but not LXRb-, deficient mice, develop hepatic steatosis resulting from cholesteryl ester accumulation when fed a cholesterol-rich diet [42]. This phenotype is caused by hampered upregulation of the cyp7a1 gene, which encodes the first and rate-limiting enzyme of bile acid synthesis from cholesterol. It is noteworthy that cyp7a1 regulation by LXRa is only observed in rodents [43].

2.1.1.3 Reverse cholesterol transport

In the reverse transport process, excess cholesterol is carried by high-density lipoproteins (HDL) from peripheral tissues to the liver where it can be metabolized. The ATP-binding cassette (ABC) transporters, involved in cholesterol removal from cells to extracellular acceptors, are essential for the regulation of cellular cholesterol concentrations. Mutations of the ABCA1 gene are detected in Tangier disease, a familial HDL-deficiency associated with a high risk of developing atherosclerosis [44]. Likewise, mutations of ABCG5 and ABCG8 have been described in patients with b-sitosterolemia, a rare autosomal recessively inherited lipid metabolic disorder, characterized by hyperabsorption and decreased biliary excretion of dietary sterols, leading to hypercholesterolemia. This indicates the role of these proteins in the regulation of cholesterol accumulation in intestine [45]. In fact, LXR activation increases the expression of ABCA1 [46,47], ABCG1 [46,47] and ABCG5/ABCG8 [4] by binding to LXRE in their promoters. In vivo, abca1 regulation is abrogated in macrophages and intestine of LXRab knockout mice, demonstrating that ABC transporters are critical for the ability of LXR to enhance reverse cholesterol transport.

Another mechanism involving LXR and the reverse transport of cholesterol is the induction of apolipoprotein encoding genes, such as apoE [48].

2.1.2 LXR and fatty acid metabolism

Repa et al. first described the interplay between cholesterol and fatty acid metabolism by demonstrating that the srebp1c gene, which encodes a membrane-bound transcription factor of the basic helix-loop-helix-leucine zipper family involved in fatty acid metabolism, was a genuine target gene of LXR. Analysis of the mouse srebp1c gene promoter revealed an RXR/LXR DNA-binding site that is essential for this regulation [49]. Schultz et al. showed that T09013017 treatment of wild-type mice upregulated scd1 (steraoyl-CoA desaturase 1), acc (acetyl CoA carboxylase) and fas (fatty acid synthase), increasing hepatic triglyceride content and plasma triglyceride concentration [21]. These effects are absent in $LXRa^{-/-}$ but not $LXRb^{-/-}$ mice, suggesting that LXRa is the main isoform responsible for hepatic lipogenesis and the deleterious effect of LXR activation [26], resulting in elevated levels of circulating triglycerides.

2.2 LXR and glucose homeostasis

Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) is a central regulator of lipid and glucose homeostasis in the liver. It is required for glucose-induced expression of the glycolytic enzyme liver-pyruvate kinase (L-PK) and acts in synergy with SREBP1c to induce lipogenic genes such as ACC and FAS. Even though ChREBP is a LXR target gene [50], LXR stimulation does not promote ChREBP phosphorylation or nuclear localization, unless the intra-hepatic glucose flux is increased [51].

LXR also inhibit gluconeogenesis by downregulating the genes encoding enzymes such as phospho-enolpyruvate-carboxykinase (PEPK), fructose-1,6-biphosphatase (F1-6B) and glucose-6-phosphatase (G6P). Moreover, in white adipose tissue, GW3965 activates expression of the gene encoding GLUT-4, an insulin-sensitive glucose transporter [52]. This results in an increased uptake and utilization of glucose. Murine and human genes encoding GLUT-4 are direct LXR target genes [52]. It has been demonstrated that the activation of LXRb in rat pancreatic islet cells and isolated human islets enhanced glucose-dependent insulin secretion [53,54].

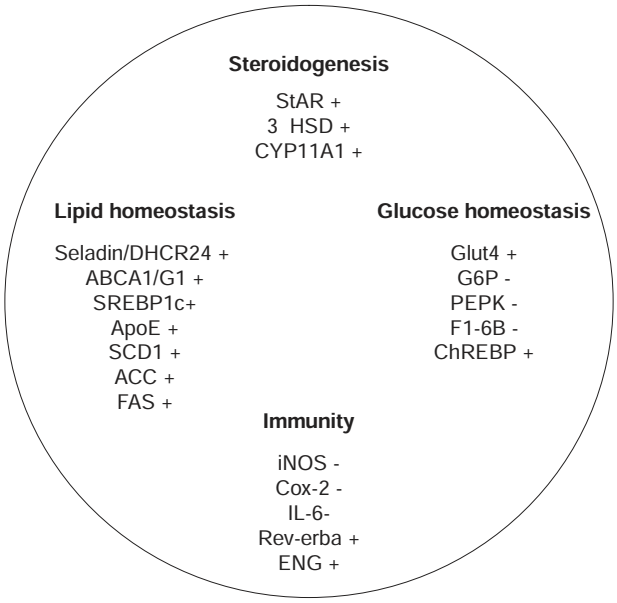


Figure 3. LXR target genes in steroidogenesis, lipid and glucose homeostasis, and immunity. The reported genes correspond to the list mentioned within the text. (+) upregulated gene; (-) down regulated gene.
ABC: ATP-binding cassette; ACC: Acetyl CoA carboxylase; ApoE: Apolipoprotein E; ChREBP: Carbohydrate responsive element binding protein; CYP11A1: Cytochrome P450 side-chain cleavage; ENG: Endoglin/CD105; FAS: Fatty acid synthase; F1-6B: Fructose 1,6 biphosphatase; Glut4: Glucose transporter 4; G6P: Glucose-6-phosphatase; 3bHSD: 3b-hydroxysteroid dehydrogenase; PEPK: Phospho-enol pyruvate kinase; SCD1: Steraoyl-CoA desaturase 1; SREBP1c: Sterol regulatory element binding protein 1c; StAR: Steroid acute regulatory protein.

However, no major effect on circulating insulin concentrations in vivo has been reported. LXRb- but not LXRa-deficient mice develop glucose intolerance and diabetes when fed a high-fat diet [55]. This suggests that insulinemia is mainly controlled by LXRb in vivo [56]. Therefore, activation of LXR lowers circulating glucose concentrations.

2.3 LXR and steroidogenesis

Cummins et al. underlined a major role of LXRa in controlling the steroidogenic function of the adrenal [57]. Indeed, corticosterone levels were increased in LXRa-deficient mice as a consequence of upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (star), cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (cyp11a1) and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3bhsd), three major steroidogenic genes. Treatment of mice with T0901317 also increased expression of these genes, resulting in enhanced production of corticosterone. Molecular analysis established Star as a direct target gene of LXRs. LXRa also regulates star expression in Leydig cells. Indeed T0901317 treatment of wild-type mice induced a strong increase in intra-testicular testosterone as well as Star and 3bhsd transcripts. This effect was abrogated in mice lacking LXRa [58,59]. An induction of star transcript by T0901317 was also observed in the ovary [60]. Altogether these data demonstrate that activation of LXRa increases the production of steroids in all the tissues tested so far.

2.4 LXR and immunity

The proinflammatory role of LXR was first described in mouse macrophages where GW3965 reduced LPS-induced expression of proinflammatory factors, including COX-2, iNOS, IL-6 and IL-b [61]. LXR agonists may suppress the transcription of genes encoding iNOS and COX-2 through inhibition of NF-kB [61]. Transcriptional inhibition of the MMP-9-encoding gene was also shown. This enzyme, by degrading extracellular matrix, promotes vascular tissue remodeling and thus development of atherosclerotic plaques. Activation of LXR blocks LPS-induced expression of this gene in macrophages. As expected, this inhibition was lost in LXRab$^{-/-}$ mice [62]. Castrillo et al. [63] described a cross-talk between LXR and toll-like receptor (TLR) signaling by interferon regulatory factor 3 (IRF3), a specific effector of TLR3/4 that inhibits the transcriptional activity of LXR on its target promoters. When TLR3/4 is enhanced by bacterial or viral pathogens, LXR target genes are inhibited. This modulates cholesterol metabolism in macrophages and their transformation into foam cells. In primary human macrophages, the nuclear receptor Rev-erba, which inhibits TLR4, is a direct target for LXR [64].

Osteopontin is a proinflammatory cytokine, which stimulates macrophage attraction. T0901317 and GW3965 suppress cytokine-induced osteopontin gene expression in macrophage cell lines and in mice [65].

3. Putative pharmacological targeting

Phenotypic analysis of LXR$^{-/-}$ mice has shown that the lack of one or both LXR isoforms resulted in the development of pathologies mimicking some human diseases. Hence, LXR are thought to be promising pharmacological targets (Figure 4).

3.1 LXR and atherosclerosis

The LXR signaling pathway clearly displays anti-atherogenic properties, both by reducing cholesterol levels and by anti-inflammatory properties. Joseph et al. reported that in APOE$^{-/-}$ mice and in LDLR$^{-/-}$ mice fed a high-cholesterol diet, LXR agonists reduce atherosclerotic lesions [66]. Moreover, LXR are also implicated in the physiology of macrophages in which they stimulate the transcription of genes encoding ABC transporters involved in cholesterol efflux (for more details, see 2.1.1.3). This could inhibit their transformation into foam cells in response to lipid loading. WAY-252623 (LXR-623) is a highly selective and orally bioavailable synthetic modulator of LXR, which demonstrated efficacy for reducing the progression of lesions in the mouse LDLR$^{-/-}$ atherosclerosis model. Moschetta's group

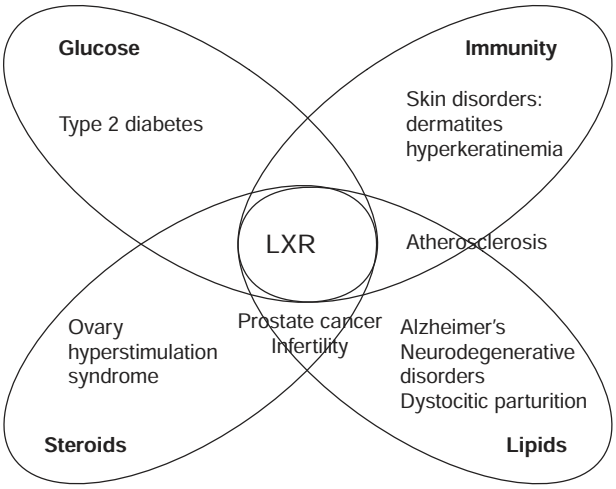


Figure 4. Synthesis of the role of LXR in physiology and putative associated diseases. The role of LXR in the control of lipid and glucose homeostasis, immunity and steroidogenesis has been extensively studied. Moreover, careful analysis of LXR-deficient mice led to the proposal of the role of the abnormal LXR-signaling pathway in the development of the indicated diseases. LXR could thus be considered as interesting pharmacological targets, even though many challenges must be solved before the use of LXR agonists in humans.

demonstrated that genetic intestinal-specific LXR activation led to decreased intestinal cholesterol absorption, improved lipoprotein profile, and increased reverse-cholesterol transport in vivo in the absence of hepatic steatosis [67]. This protected LDLR-deficient mice from atherosclerosis. This study identified the intestine as a key player in the LXR-driven protective environment against cardiovascular disease [67]. Using a pharmacological approach with GW6340, Yasuda et al. [30] showed that intestinal-specific LXR activation promotes macrophage reverse cholesterol transport. ABCA1, ABCG5 and ABCG8 were significantly upregulated in the small intestine, but not in the liver. Two independent mechanisms could account for these observations: increased intestinal HDL production and promotion of intestinal excretion of HDL-derived cholesterol [30]. Hence these data demonstrate that activation of LXR in intestine and macrophages efficiently prevents atherosclerosis.

Likewise, and in contrast with T0901317, LXR-623 treatment was not associated with increased hepatic lipogenesis. In non-human primates with normal lipid levels, LXR-623 significantly reduced total and LDL-cholesterol in a time- and dose-dependent manner. It was also associated with increased expression of the target genes ABCA1/G1 in peripheral blood cells [68]. These observations suggested that LXR-623 was a promising pharmacological ligand to target atherosclerosis. However, as discussed above, the first clinical trial with this synthetic LXR ligand showed adverse effects [31]. While ABCA1 and G1 were upregulated in a dose-dependent manner in peripheral blood, participants presented CNS disorders such as confusion, forgetfulness, palpitations and decreased attention at the highest doses. Although promising, LXR-623 was therefore declared unsuitable for patients.

Human genetics also iluminate LXR as putative pharmacological targets. Indeed analysis of LXR gene sequence in patients with coronary heart disease (CHD) identified, three mutations in the ligand binding domain of LXRa [69]. A modeling study revealed that the mutations created conformational changes that could prevent activation of LXRa by its natural ligands.

3.2 LXR and diabetes

Diabetes mellitus type 2 is a metabolic disorder that is characterized by high blood glucose in the context of insulin resistance, which is an important contributor to its pathogenesis [70]. Obesity is also a risk factor to the development of this type of diabetes [70]. Treatment of diabetic rodents or mouse models of diet-induced obesity with LXR agonists improves glucose tolerance [52,71]. However, in vitro experiments showed that the lipogenic effect of LXR agonists in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes was increased in comparison with healthy control subjects [72]. This study showed that LXR activation could promote triglyceride accumulation in the presence of high glucose concentration in skeletal muscle cells, probably via the induction of the expression of lipogenic enzymes [72], which could represent the dark side of LXR-activation in the muscle. A study on a Swedish population of 559 obese women revealed that one and two single-nucleotide polymorphisms in the non coding regions of LXRa and LXRb respectively, were associated with obesity [73]. In conclusion, LXR are key factors in glucose metabolism and could represent alternative targets for clinical management of type 2 diabetes.

3.3 LXR and Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive neuronal degeneration and the accumulation of intracellular inclusions and extracellular deposits of b-amyloid plaques. The main component of these plaques is Ab peptide produced by the cleavage of the Amyloid precursor protein (APP) by a b-secretase. Epidemiological and biochemical data have suggested a link between cholesterol, APP processing, Ab peptide, and Alzheimer disease [74]. Indeed, a decreased prevalence of AD is associated with the use of cholesterol-lowering drugs such as statins [75,76], which inhibit hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-coA) reductase and thus de novo synthesis of cholesterol. Koldamova et al. evaluated the effect of T0901317 on abca1 expression in the brain of APP transgenic mice, models of AD. T0901317 significantly enhanced abca1 expression and downregulated the production of Ab peptide, suggesting that ABCA1 plays a protective role preventing AD progression [77]. Moreover, the loss of lxra or lxrb in APP23 transgenic mice increases Ab deposit [78] whereas activation of LXR by T0901317

causes a significant reduction of the memory deficits observed in the APP23 model, fed a high-fat diet [79]. Zelcer et al. [78] also showed that LXR activation decreases the inflammatory response which may be involved in AD. Likewise, seladin-1/DHCR24, a selective AD marker, is a LXR target gene [80]. A recent study has shown that T0901317 significantly decreases amyloid pathology caused by high-cholesterol diet, improving cognitive performance [79]. Altogether these data indicate that LXR may be promising pharmacological targets for the treatment of AD and other neurological conditions characterized by disruption of cholesterol homeostasis. Moreover, two single-nucleotide polymorphisms in LXRb have been associated with AD [81,82], confirming that LXR could be involved in this neurodegenerative disease.

3.4 LXR and skin disorders

LXR is essential for cutaneous barrier function. Both LXRa and LXRb are expressed in human keratinocytes and fetal rat epidermis whereas LXRb is predominantly expressed in mouse epidermis [83,84]. In addition, oxysterols may be formed de novo in epidermis by cholesterol oxidation. They could stimulate LXR, resulting in human keratinocytes differentiation through increased expression of involucrin, a protein of the cornified envelope [84]. Studies on $LXR^{-/-}$ mice showed that epidermal differentiation was regulated by LXRb and that oxysterols could induce differentiation and inhibit proliferation through LXRb activation [83]. After acute permeability disruption, ABCA1 expression decreases keratinocyte cholesterol efflux to increase the availability of cholesterol for regeneration of the barrier [85]. In vivo studies showed that LXR agonists could reverse aging-associated syndrome in a photoaging animal model [86] as well as clinical symptoms of atopic dermatitis, an inflammatory chronically relapsing and non-contagious skin disorder, in a mouse model of atopic dermatitis [86,87]. In conclusion, activation of LXR could inhibit skin alterations associated with aging.

3.5 LXR and reproductive tract disorders

In vivo studies have shown that a and b $LXR^{-/-}$ mice had reduced fertility. A decrease in conception and a lower number of pups per litter have been documented [88].

3.5.1 LXR and female reproduction

Although LXR exert a positive effect on steroidogenesis in the adrenal cortex [57], LXR repress steroidogenesis in human ovarian luteal cells [89]. Interestingly, treatment of $LXR^{-/-}$ mice with gonadotropins leads to ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), mimicking the complications observed in women treated for infertility [60]. This syndrome is characterized by ovarian enlargement, associated with an extra vascular fluid concentration, hemorrhagic ovarian corpora lutea and elevated estradiol serum levels. It could thus be interesting to investigate the genetic status of LXR in women developing OHSS. LXR may be considered as a new putative target for the prevention of this affection.

LXR are also strongly expressed in mouse and human placenta during development. This suggests a crucial role of LXR in different placental activities such as hormone production, fetomaternal tolerance, lipid metabolism and parturition [90]. Moreover, endoglin/CD105, a major gene implicated in placental implantation is a LXR target gene [91]. Endoglin/CD105 (ENG) is highly expressed in syncytiotrophoblasts and is part of the TGF receptor complex that binds several members of the TGF-b superfamily. In the human placenta, ENG is involved in the inhibition of trophoblast invasion. Treatment of human choriocarcinoma JAR cells with T0901317 leads to a significant increase in ENG mRNA and protein levels. LXRa has been shown to bind and activate the ENG promoter in JAR cells. Normal pregnancy is always accompanied by increased oxidation of LDL particles. It could be prposed that increased production of lipid peroxides in the maternal blood during preeclamptic pregnancies may increase internalization of oxLDL in trophoblasts cells. This would activate LXR and increase membrane ENG expression, and, in turn, could enhance the TGF-b 1/3 inhibitory signal, slowing down trophoblast invasion. This would result in precocious disruption of placental adherence and enhancement of the preeclamptic symptoms. Indeed a shallow placentation with abnormal invasion of cytotrophoblasts and incomplete remodeling of uterine spiral arteries is observed in preeclampsia. Interestingly, increased levels of ENG secreted by the placenta have been detected in the maternal circulation before the onset of preeclampsia. It has been postulated that this secreted ENG plays a pathogenic role, contributing to systemic endothelial dysfunction, resulting in hypertension and other systemic manifestations of preeclampsia. In summary, these data suggest that inappropriate expression and/or function of ENG that could result from upregulation by LXR, may contribute to major complications of pregnancy, such as preeclampsia.

LXRb plays a crucial role in the contractile ability of the mouse uterus [92] Indeed, $LXR^{-/-}$ mice exhibited a marked decrease in abcg1 accumulation. This change resulted in a phenotype of cholesteryl ester accumulation. Also, a defect in contractile activity induced by oxytocin or prostaglandin F2a (PGF2a) was observed in mice lacking LXRb. These results imply that LXRb acts as a safety valve to limit cholesteryl ester levels in the uterus and is necessary for a timely induction of contractions. LXRb is thus a possible novel target to prevent parturition defects in women.

3.5.2 LXR and male reproduction

Male $LXR^{-/-}$ mice show decreased fertility at 5 months of age and complete infertility by the age of 9 months [59,93]. This results in multiple alterations in the male genital tract. Cholesterol ester accumulation induces disorganization of the epithelium of the caput epididymis [93,94]. This accumulation which results from the loss of ABCA1 enhances apoptosis of epithelial cells [95]. LXR are also involved in several testicular functions: i) steroidogenesis, ii) lipid metabolism and

iii) control of the proliferation/apoptosis balance in germ cells. More specifically, LXRb$^{-/-}$ mice exhibit cholesterol ester accumulation in Sertoli cells and a decrease in germ cell proliferation. On the other hand, LXRa$^{-/-}$ mice present decreased testosterone synthesis and lower plasma LH concentration as well as an increase in germ cell apoptosis [58,59]. Hence, cooperative functions of LXRa and LXRb maintain both testis structure and function. The lack of LXR impairs the fertility of aging, but not of young mice. Therefore, LXR signaling disruption in the male reproductive tract could be considered as a risk factor involved in premature loss of fertility observed in some men. It could be that a drug activating LXR could also improve testicular functions.

3.6 LXR and cancer

Treatment of hormone-dependent cancers by LXR agonists seems promising. Indeed T0901317 shows anti-proliferative (induction of p21 and p27 with a concominant reduction in phospho-RB protein levels) and pro-apoptotic (caspase-3 and B-cell leukemia/lymphoma associated X protein (BAX) gene expression) characteristics on a cell model of ovarian carcinoma [96].

In breast cancer cell lines, activation of LXR significantly reduced proliferation by the suppression of mRNA and/or protein expression of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), cyclin A2, cyclin D1 and estrogen receptor (ER) alpha, whereas it increased the expression of p53 at the protein level and maintained the retinoblastoma protein in a hypophosphorylated active form. The authors suggested that these changes may constitute part of the molecular mechanisms behind the antiproliferative effect of LXR [97]. Interestingly, Kim et al. showed that in absence of ligand, LXRa interacts with an ubiquitin E3-ligase protein complex containing breast and ovarian cancer susceptibility 1 (BRCA1)-associated RING domain 1 (BARD1) [98]. As expected, LXR ligand represses ubiquitination and degradation of LXRa, and the interaction between LXRa and BARD1. This ligand effect might be critical for the early step of transcriptional activation of ligand-stimulated LXRa, through a stable binding of LXRa to the promoters of target genes.

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death in men [99]. It is now well established that androgens play a crucial role in development and progression of prostate cancer [100]. Androgen ablation is the prevalent therapy for this type of cancer. However, several risk factors have also been described, among which are environmental factors. Epidemiological studies have shown that Chinese populations with low risk of developing prostate cancer had an increased risk of prostate cancer after migration to the USA. This environmental effect was attributed to the deleterious effect of lipids on this cancer [101]. Consistent with this hypothesis, a clinical study revealed that hypercholesterolemia increases prostate cancer risk [102] while statin treatment was associated with a lower risk of metastatic prostate cancer [103,104]. Several groups have thus investigated the roles of LXR in prostate physiology. T0901317 decreases the number of proliferating cells [105,106] and induces apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP [105,106]. In vivo oral administration of T0901317 slows tumor growth of LNCaP cells transplanted into athymic mice [107]. These activities have been attributed to induction of ABC transporters [107] and disruption of lipid raft signaling activity [106]. Taken together, these data suggest that impaired LXR signaling contributes to prostate cancer progression and indicate the potential use of LXR agonists as pharmacological agents in cancer prevention.

Another frequent prostatic pathology is the benign prostate hyperplasia (BPH) that affects 80% of men over the age of 50 years. LXRa$^{-/-}$ mice present BPH-like features in the ventral prostate. They are characterized by proliferative epithelial cells, multiple layers of dense stroma surrounding the prostatic ducts and dilated prostatic ducts [108]. Therefore, LXR agonists could also prevent or control BPH in patients.

4. Conclusion

In the last decade, phenotype analyses of LXR-deficient mice have allowed the association of LXR-signaling pathways dysfunction with several human pathologies. These include reproductive (germ cell apoptosis, parturition defects, in vitro fertilization side-effects) and metabolic disorders (type 2 diabetes, hypercholesterolemia), nervous system alterations (Alzheimer disease, neurogenerative diseases), dermatological affections (skin aging, atopic dermatitis) and hormone-dependent cancers (ovarian, breast and prostate). Development of LXR synthetic agonists has allowed the identification of new target genes. These are involved in the control of various physiological processes such as cholesterol and triglyceride synthesis, glycemia, steroidogenesis and inflammation. Although in vitro studies showed that LXRa and LXRb could be considered as interchangeable isoforms, in vivo analyses have shown that they do not have redundant functions even when expressed in the same cell type at similar levels.

5. Expert opinion

Before considering acting directly on LXR transactivation capacities in human, several questions still have to be addressed. A good pharmacological agonist should be efficient at low plasma concentration and should provide the highest specificity of action. At least, three aspects should be taken into account: i) bio-availability of the ligands; ii) LXR isoform specificity; iii) tissue specificity. If this is to be achieved, it becomes quite obvious that the screening of new ligands solely by hybrid reporter gene systems is inappropriate.

1) As LXR are ligand-activated transcription factors, the availability of the agonists, natural or not, is of primary importance. Indeed, when YT-32 was initially

identified as a cholesterol-lowering agent in the absence of hypertriglyceridemic effect [29], Makishima's group suspected the inability of YT-32 to be transported to the liver. Similarly GW6340 has been described to be an intestine-specific LXR activator [30]. Building on these observations it can be suggested that an oxysterol-like molecule has a good chance of being efficient in the intestinal regulation of cholesterol absorption. In contrast, a topical agonist must be engineered to prevent systemic distribution, to avoid any side-effects such as increased hepatic triglyceride production or elevated steroid synthesis by the gonads.

2) Enumeration of the physiological roles of LXR shows that LXRα and LXRβ are not fully interchangeable. It is thus important to develop isoform-specific ligands. For example, the development of a brain-available ligand, specific to LXRβ, would be indicated for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Conversely, development of LXRα-specific ligands would be useful for the treatment of atherosclerosis. From an academic point of view, the development of isoform-specific ligands would also facilitate the screening of new isoform-specific target genes.
3) Crystallographic analyses showed that T0901317 and GW3965 were both able to stabilize LXRβ helix 12 and to maintain the receptor in a favorable conformation [109]. In both cases, the position of helix 12 is similar. However the remaining ligand-binding domain presents a different conformation demonstrating its plasticity. Hence, the activity of a ligand could be modulated by specific cofactors that would alter its effects. Such a phenomenon has already been described for the SERMs raloxifen and tamoxifen. It thus seems important to understand how the cellular context could modulate LXR activation by a given molecule. This would allow the development of selective LXR modulators (SLiMs) to bypass any potential side effects. As in the case of SERMs, SLiMs would have the possibility of activating LXR in specific tissues, for example in the intestine, but not in others. So far, the available SLiMs seem to be YT-32 [29] and GW6340 [30].

Some of the putative LXR target diseases can be considered long-term chronic pathologies (neuron degeneration, type 2 diabetes or cancers). Their incidence could be lowered by the development of prophylactic treatments such as preventive nutrition. Natural LXR agonist compounds have been described in fungi, plants and sea organisms (see section 1.3). Screening of new molecules considered as nutraceuticals could be of interest in order to subtly alter LXR activity and thus take full advantage of the therapeutic and protective effects of LXR agonists.

Acknowledgements

We thank PA Val (UMR GReD CNRS 6247, Aubière, France) for his help in manuscript editing and fruitful scientific discussions.

Declaration of interest

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue Allier contre le Cancer, fondation pour la recherche médicale (FRM) and Fondation BNP-Paribas research grants. E Viennois is funded by Région Auvergne and Fond Européen de DEveloppement Régional (FEDER). AJC Pommier and J Dufour are funded by Ministry of Education, Research and Technology (MNERT). A Oumeddour is a recipient of a grant from the Algerian Government (Programme National Exceptionnel). The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

Papers of specials note have been highlighted as either of interest ( ) or of considerable interest ( ) to readers.

1. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. Annu Rev Cell Dev Biol 2000;16:459-81
2. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. Genes Dev 1995;9:1033-45
3. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, et al. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. Nature 1996;383:728-31

.. This is a paper demonstrating that oxysterols activate LXR. It suggested that they could be the physiological ligands for LXR.

4. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, et al. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. J Biol Chem 2002;277:18793-800
5. Nuclear Receptors Signaling Atlas. Bethesda, MD: Nuclear Receptors Signaling Atlas consortium, 2003 – 2010 Available from: www.nursa.org [Last accessed 14 December 2010]
6. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, et al. Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases. Gastroenterol Clin Biol 2004;28:279-93
7. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. J Biol Chem 1997;272:3137-40
8. Li X, Zhang S, Blander G, et al. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. Mol Cell 2007;28:91-106
9. Hu X, Li S, Wu J, et al. Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. Mol Endocrinol 2003;17:1019-26
10. Lazar MA. Nuclear receptor corepressors. Nucl Recept Signal 2003;1:e001
11. Lee S, Lee J, Lee SK, et al. Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. Mol Endocrinol 2008;22:1312-19
12. Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, et al. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. EMBO J 2003;22:4625-33
13. Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 2000;80:361-554
14. Bjorkhem I. Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? J Lipid Res 2009;50(Suppl):S213-18
15. Yang C, McDonald JG, Patel A, et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. J Biol Chem 2006;281:27816-26
16. Song C, Hiipakka RA, Liao S. Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. Steroids 2000;65:423-7
17. Ondeyka JG, Jayasuriya H, Herath KB, et al. Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors. J Antibiot (Tokyo) 2005;58:559-65
18. Jayasuriya H, Herath KB, Ondeyka JG, et al. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. J Nat Prod 2005;68:1247-52
19. Huang TH, Razmovski-Naumovski V, Salam NK, et al. A novel LXR-alpha activator identified from the natural product Gynostemma pentaphyllum. Biochem Pharmacol 2005;70:1298-308
20. Li X, Yeh V, Molteni V. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007 – 2009). Expert Opin Ther Pat 2010;20:535-62
21. Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev 2000;14:2831-8
22. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. J Med Chem 2002;45:1963-6
23. Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, et al. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. Mol Genet Metab 2004;83:184-7
24. Shenoy SD, Spencer TA, Mercer-Haines NA, et al. CYP3A induction by liver X receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. Drug Metab Dispos 2004;32:66-71
25. Mitro N, Vargas L, Romeo R, et al. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. FEBS Lett 2007;581:1721-6
26. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J Biol Chem 2002;277:11019-25
27. Lund EG, Peterson LB, Adams AD, et al. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. Biochem Pharmacol 2006;71:453-63
28. Bradley MN, Hong C, Chen M, et al. Ligand activation of LXRbeta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXRalpha and apoE. J Clin Invest 2007;117:2337-46
29. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, et al. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. J Biol Chem 2003;278:36091-8

.. This study presents for the first time, to our knowledge, a compound (YT-32) lowering the plasma cholesterol level without any hypertriglyceridemic effect. This compound could be considered as the first SLiM.

30. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:781-6

.. This article reports the first intestine-specific LXR agonist, to our knowledge. This compound could also be considered as a SLiM.

31. Katz A, Udata C, Ott E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. J Clin Pharmacol 2009;49:643-9

.. This is the first trial, to our knowledge, performed on human with the LXR agonist LXR-623.

32. DiBlasio-Smith EA, Arai M, Quinet EM, et al. Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. J Transl Med 2008;6:59
33. Hu B, Unwalla RJ, Goljer I, et al. Identification of phenylsulfone-substituted quinoxaline (WYE-672) as a tissue selective liver X-receptor (LXR) agonist. J Med Chem 2010;53:3296-304
34. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. J Biol Chem 2002;277:1705-11
35. Ou J, Tu H, Shan B, et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:6027-32
36. Qin Y, Dalen KT, Gustafsson JA, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. Biochim Biophys Acta 2009;1791:140-7
37. Herath K, Jayasuriya H, Ondeyka JG, et al. Guttiferone I, a new prenylated benzophenone from Garcinia humilis as a liver X receptor ligand. J Nat Prod 2005;68:617-9
38. Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T, et al. Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) alpha agonist and an LXRbeta antagonist. FEBS Lett 2005;579:5299-304
39. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:266-71
40. Thomas J, Bramlett KS, Montrose C, et al. A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) versus liver X receptor. J Biol Chem 2003;278:2403-10
41. Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. Science 1999;284:757-60
42. Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXRalpha. Cell 1998;93:693-704
.. This article elucidated for the first time, to our knowledge the physiological role of LXR in the regulation of cholesterol homeostasis.
43. Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). Gene 2001;262:257-65
44. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet 1999;22:336-45
45. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, et al. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. Hum Mutat 2001;18:359-60
46. Costet P, Luo Y, Wang N, et al. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/ retinoid X receptor. J Biol Chem 2000;275:28240-5
47. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, et al. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. J Biol Chem 2001;276:39438-47
48. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:507-12
49. Repa JJ, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev 2000;14:2819-30
50. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. J Biol Chem 2007;282:743-51
51. Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, et al. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. J Clin Invest 2008;118:956-64
52. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:5419-24
53. Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, et al. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. Diabetes 2004;53(Suppl 3):S75-8
54. Ogihara T, Chuang JC, Vestermark GL, et al. Liver X receptor agonists augment human islet function through activation of anaplerotic pathways and glycerolipid/free fatty acid cycling. J Biol Chem 2010;285:5392-404
55. Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, et al. LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. J Biol Chem 2005;280:23024-31
56. Zitzer H, Wente W, Brenner MB, et al. Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 2006;147:3898-905
57. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, et al. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. J Clin Invest 2006;116:1902-12
58. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. Mol Endocrinol 2007;21:1014-27
59. Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, et al. The liver X receptor-beta is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. Endocrinology 2005;146:2519-30
60. Mouzat K, Volat F, Baron S, et al. Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. Endocrinology 2009;150:3369-75
61. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med 2003;9:213-9
62. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, et al. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. J Biol Chem 2003;278:10443-9
63. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, et al. Crosstalk between LXR and toll-like

receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. Mol Cell 2003;12:805-16

64. Fontaine C, Rigamonti E, Pourcet B, et al. The nuclear receptor Rev-erbalpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. Mol Endocrinol 2008;22:1797-811

65. Ogawa D, Stone JF, Takata Y, et al. Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. Circ Res 2005;96:e59-67

66. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:7604-9

67. Lo Sasso G, Murzilli S, Salvatore L, et al. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. Cell Metab 2010;12:187-93

.. This article underlines that LXR activation in macrophage and intestine prevents atherosclerosis.

68. Quinet EM, Basso MD, Halpern AR, et al. LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. J Lipid Res 2009;50:2358-70

69. Dave VP, Kaul D, Sharma Y, et al. Functional genomics of blood cellular LXR-alpha gene in human coronary heart disease. J Mol Cell Cardiol 2009;46:536-44

70. Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:S9-S30

71. Cao G, Liang Y, Broderick CL, et al. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. J Biol Chem 2003;278:1131-6

72. Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, et al. Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. Diabetes 2005;54:1108-15

73. Dahlman I, Nilsson M, Jiao H, et al. Liver X receptor gene polymorphisms and adipose tissue expression levels in obesity. Pharmacogenet Genomics 2006;16:881-9

74. Martin M, Dotti CG, Ledesma MD. Brain cholesterol in normal and pathological aging. Biochim Biophys Acta 2010;1801:934-44

75. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, et al. Statins and the risk of dementia. Lancet 2000;356:1627-31

76. Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Arch Neurol 2000;57:1439-43

77. Koldamova RP, Lefterov IM, Staufenbiel M, et al. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. J Biol Chem 2005;280:4079-88

78. Zelcer N, Khanlou N, Clare R, et al. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver X receptors. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:10601-6

79. Fitz NF, Cronican A, Pham T, et al. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. J Neurosci 2010;30:6862-72

80. Wang Y, Rogers PM, Stayrook KR, et al. The selective Alzheimer's disease indicator-1 gene (Seladin-1/DHCR24) is a liver X receptor target gene. Mol Pharmacol 2008;74:1716-21

81. Adighibe O, Arepalli S, Duckworth J, et al. Genetic variability at the LXR gene (NR1H2) may contribute to the risk of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 2006;27:1431-4

. This article describes for the first time, to our knowledge, an association between a LXRbeta polymorphism and Alzheimer disease.

82. Infante J, Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, et al. Gene-gene interaction between heme oxygenase-1 and liver X receptor-beta and Alzheimer's disease risk. Neurobiol Aging 2010;31:710-14

83. Komuves LG, Schmuth M, Fowler AJ, et al. Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. J Invest Dermatol 2002;118:25-34

84. Hanley K, Ng DC, He SS, et al. Oxysterols induce differentiation in human keratinocytes and increase Ap-1-dependent involucrin transcription. J Invest Dermatol 2000;114:545-53

85. Jiang YJ, Lu B, Kim P, et al. Regulation of ABCA1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. J Lipid Res 2006;47:2248-58

86. Chang KC, Shen Q, Oh IG, et al. Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. Mol Endocrinol 2008;22:2407-19

87. Hatano Y, Man MQ, Uchida Y, et al. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/d (but not gamma) and liver X receptor activators. J Allergy Clin Immunol 2010;125:160-9 e1-5

88. Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, et al. Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. Mol Cell Endocrinol 2006;256:9-16

89. Drouineaud V, Sagot P, Garrido C, et al. Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. Mol Hum Reprod 2007;13:373-9

90. Marceau G, Volle DH, Gallot D, et al. Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2005;283:175-81

91. Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, et al. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. Biol Reprod 2008;78:968-75

92. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, et al. Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. J Biol Chem 2007;282:4693-701

93. Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, et al. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. J Mol Endocrinol 2004;33:361-75

94. Saez F, Chabory E, Cadet R, et al. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. Asian J Androl 2007;9:574-82

95. Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, et al. LXR and ABCA1 control cholesterol

homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. J Lipid Res 2009;50:1766-75

96. Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, et al. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. J Ovarian Res 2010;3:13

97. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, et al. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. Carcinogenesis 2009;30:575-9

98. Kim KH, Yoon JM, Choi AH, et al. Liver X receptor ligands suppress ubiquitination and degradation of LXRalpha by displacing BARD1/BRCA1. Mol Endocrinol 2009;23:466-74

99. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet 2003;361:859-64

100. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. CA Cancer J Clin 1972;22:232-40

101. Watanabe M, Nakayama T, Shiraishi T, et al. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. Urol Oncol 2000;5:274-83

102. Magura L, Blanchard R, Hope B, et al. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. Cancer Causes Control 2008;19:1259-66

103. Platz EA, Leitzmann MF, Visvanathan K, et al. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. J Natl Cancer Inst 2006;98:1819-25

104. Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, et al. Statins and prostate cancer risk: a case-control study. Am J Epidemiol 2005;162:318-25

105. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, et al. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. Cancer Res 2004;64:7686-9

106. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. Oncogene 2010;29:2712-23

.. This article shows that apoptosis could be targeted in prostate cancer using an LXR agonist.

107. Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, et al. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. Cancer Res 2004;64:7682-5

108. Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, et al. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:558-63

109. Farnegardh M, Bonn T, Sun S, et al. The three-dimensional structure of the liver X receptor beta reveals a flexible ligand-binding pocket that can accommodate fundamentally different ligands. J Biol Chem 2003;278:38821-8

110. Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, et al. Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-function study. J Biol Chem 2000;275:24022-31

111. Mouzat K, Alves G, Pommier A, et al. Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction. Med Sci (Paris) 2009;25:141-4

Affiliation

Emilie Viennois[1,2,3], Aurélien JC Pommier[1,2,3], Kévin Mouzat[4], Abdelkader Oumeddour[1,2,3,5], Fatim-Zohra El Hajjaji[1,2,3], Julie Dufour[1,2,3], Françoise Caira[1,2,3], David H Volle[1,2,3], Silvère Baron[1,2,3] & Jean-Marc A Lobaccaro[†1,2,3,6]

[†]Author for correspondence

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2]CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 Aubiere, France

[3]Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[4]Laboratoire de Biochimie, Hôpital Universitaire Carémeau - Place du Pr. Robert Debré – F-30029 Nimes, France

[5]Laboratoire d'Endocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria

[6]"Génétique Reproduction et Développement", Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France

E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

Article 6: Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction

Article publié dans Médecine Science, Volume 25, issue 2, Février 2009.

Kevin Mouzat, Georges Alves, Aurélien J. C. Pommier, Emilie Viennois, Thomas Pihen, Françoise Caira, Silvère Baron and Jean-Marc A. Lobaccaro

Rôles des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction

Kevin Mouzat, Georges Alves, Aurélien Pommier, Émilie Viennois, Thomas Pihen, Françoise Caira, Silvère Baron, Jean-Marc A. Lobaccaro

Clermont Université, UMR « Génétique, Reproduction et Développement » ; CNRS UMR 6247 ; Inserm U931 ; LXR, oxystérols et tissus stéroïdogènes et Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne ; 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
K. Mouzat (adresse actuelle) : Service de Biochimie, CHU de Nîmes et Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes, France.
j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

› Au début des années 1990, la découverte de très nombreux récepteurs nucléaires dits « orphelins », car aucun ligand n'avait encore été identifié, a ouvert la voie à la notion d'endocrinologie inverse où la mise en évidence de la fonction physiologique de la protéine est postérieure à la découverte de la protéine et celle de son ligand. Par la suite, la synthèse de molécules non métabolisables modulant l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs nucléaires « orphelins-adoptés » a ouvert des perspectives intéressantes quant à leur utilisation en pathologie. Les LXR (*liver X receptors*) font partie de ces récepteurs nucléaires orphelins-adoptés dont l'intérêt pharmacologique n'a cessé de croître ces dernières années devant leur potentiel thérapeutique. Cependant, leur implication récente dans la régulation des fonctions de reproduction chez le mâle et la femelle oblige à beaucoup de prudence quant à une utilisation prochaine dans le traitement de certaines dyslipidémies.

Les LXR, des récepteurs nucléaires activés par des dérivés du cholestérol

Les récepteurs LXR sont des facteurs de transcription activables par des molécules dérivées directement du cholestérol, les oxystérols, et font partie des récepteurs nucléaires qui forment des hétérodimères avec RXR, le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* [1]. Il existe deux isoformes LXRα (NR1H3) et LXRβ (NR1H2) provenant chacune de deux gènes distincts localisés respectivement sur les chromosomes 11p11.2 et 19q13.3 chez l'homme. Si l'expression de LXRβ est ubiquiste, LXRα est plutôt exprimé dans les organes présentant un fort métabolisme lipidique comme les tissus adipeux et les organes stéroïdogènes.

En l'absence de ligand

Canoniquement, les LXR sont des protéines acétylées, fixées sur l'ADN avec leur partenaire RXR (*Figure 1*, étape 1) et leur capacité de transcription est inhibée par la présence de co-répresseurs, comme N-CoR (*Nuclear receptor co-repressor*)

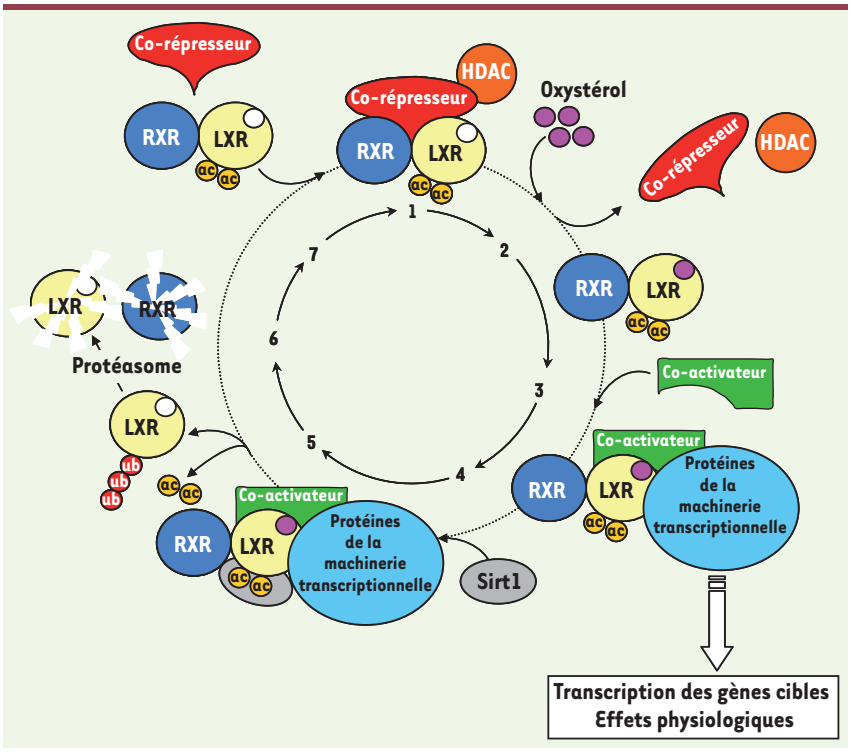


Figure 1. ***Représentation schématique du cycle d'activation/inhibition de l'hétérodimère RXR-LXR.*** En l'absence de ligand, l'hétérodimère RXR-LXR recrûte des co-represseurs transcriptionnels. La fixation du ligand (ne sont représentés que la poche de liaison du ligand de LXR et les oxystérols) entraîne le départ des co-répresseur et l'arrivée de protéines co-activatrices et des éléments basaux de la machinerie transriptionnelle. *In fine*, la réponse physiologique est activée. Le rôle de la sirtuine Sirt1 est de déacétyler LXR, d'entraîner son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome. Par la suite un nouvel hétérodimère se place sur l'élément de réponse à LXR. Pour plus de détails voir le texte. Ac, acétylation ; Ub, ubiquitine.

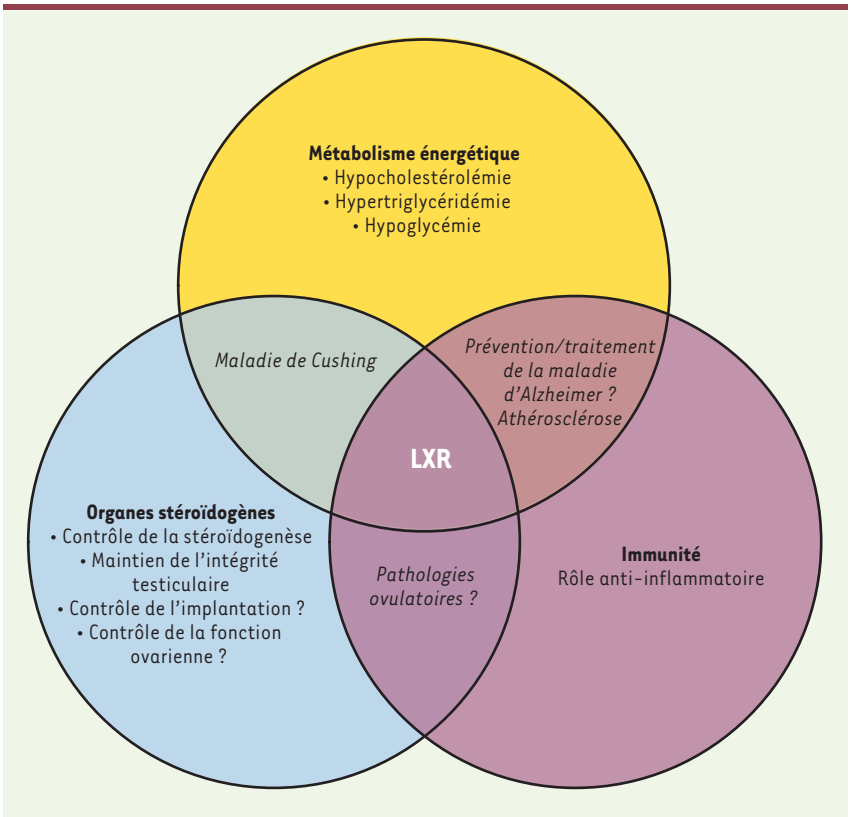


Figure 2. ***Synthèse du rôle des LXR dans la physiologie.*** Le rôle des LXR dans le contrôle des métabolismes lipidique et glucidique a été le plus étudié depuis leurs découvertes. Cependant, de plus en plus d'études récentes tendent à associer ces récepteurs nucléaires à d'autres fonctions physiologiques. La compréhension des mécanismes d'action et du rôle précis des LXR dans la physiologie générale de l'organisme aidera à terme à développer des molécules modulatrices utilisables dans la prévention et le traitement de nombreuses pathologies.

et SMRT (*silencing mediator for RAR and TR*) qui contactent à la fois directement et indirectement des histones déacétylases *via* des protéines de type Sin3. La chromatine est ainsi maintenue dans un état de condensation non permissif pour la transcription. La présence constitutive sur l'ADN des complexes RXR/LXR-co-répresseur-HDAC agit donc comme un répresseur basal de l'expression génique comme le montre la levée de la répression basale de certains gènes cibles dans les souris *lxr*$\alpha;\beta$*-/-* (pour une revue [1]).

En présence de ligand

Malgré une grande variabilité dans la séquence primaire des récepteurs nucléaires, les analyses cristallographiques montrent que tous les domaines de liaison du ligand ont une structure tridimensionnelle identique, composée de 11 à 13 hélices alpha arrangées en trois couches organisant une poche hydrophobe dans laquelle le ligand de nature lipophile peut venir se fixer. La liaison de l'hormone (étape 2) entraîne une modification tridimensionnelle de la poche hydrophobe et le départ des co-répresseurs. Ce réarrangement permet la libération de l'hélice 12, agissant ainsi comme un « couvercle » qui scelle la poche en renforçant les interactions entre le ligand et la poche hydrophobe et la fixation de co-activateurs (étape 3). Cette cascade d'événements provoque un environnement chromatinien permissif pour la transcription par le recrutement de protéines à activités histone acétyl-transférases comme SRC-1, la mobilisation de facteurs affectant la méthylation des histones comme Rap250 et/ou la fixation des protéines de la machinerie transcriptionnelle de base, la transcription des gènes cibles et la réponse physiologique cellulaire. De façon intéressante, la fixation concomittante de la sirtuine 1 (étape 4) provoque la déacétylation de LXR, son ubiquitinylation (étape 5), le routage vers le protéasome et sa dégradation (étape 6). Par la suite, deux nouvelles protéines RXR et LXR néosynthétisées s'hétérodimérisent en solution par leur domaine de liaison du ligand (étape 7) et le complexe reconnaît les éléments de réponse sur l'ADN.

Au-delà de cette description schématique, l'activité transcriptionnelle des récepteurs LXR peut aussi être modulée par une SUMOylation, des phosphorylations, la compétition sur les sites de fixation avec d'autres récepteurs nucléaires ou pour la dimérisation avec RXR comme PPARα.

Les fonctions physiologiques régulées par les LXR

Ces dernières années, la recherche des gènes cibles des LXR a permis de les associer à de nombreuses fonctions physiologiques. C'est incontestablement la disponibilité des souris dont les gènes codant chacune des deux isoformes ont été invalidés et le développement d'agonistes synthétiques non métabolisables qui ont fait augmenter de façon quasi-exponentielle le nombre de gènes cibles. Schématiquement trois fonctions physiologiques ont été associées aux LXR *(Figure 2)*.

Le métabolisme énergétique

Les LXR sont hypocholestérolémiants par l'augmentation du catabolisme hépatique : régulation transcriptionnelle de certaines protéines ABC (*ATP-binding cassettes*) impliquées dans le retour hépatique du cholestérol, d'apolipoprotéines et augmentation des enzymes contrôlant la synthèse

Organes (modèle)	Phénotypes observés	LXR impliqué	Fonctions attribuées	Réf.
Surrénale (souris)	Adrenomégalie Accumulation esters de cholestérol Hypercorticostéronémie Syndrome « cushingoïde »	LXRα	Efflux du cholestérol Synthèse des corticostéroïdes	[5]
Testicule (souris)	Stérilité précoce par disparition des cellules germinales Accumulation esters de cholestérol	LXRα et/ou LXRβ	Efflux du cholestérol Synthèse des acides gras Rôle anti-apoptotique Rôle prolifératif Synthèse de testostérone	[6, 12]
Ovaire (souris)	Diminution de la fertilité	LXRα LXRβ	Contrôle de la reprise de la méiose.	[8]
Ovaire (humain : cellules lutéales)	-	LXRα LXRβ	Efflux du cholestérol Inhibition de la synthèse de progestérone	[7]
Placenta (humain : chorio-carcinome JAR et cellules extravilleuse du trophoblaste	-	LXRα LXRβ	Régulation de l'Endogline Inhibition de la synthèse de la hCG Invasion trophoblastique	[11, 13, 14]
Utérus (souris)	Altération des contractions Accumulation esters de cholestérol	LXRβ	Efflux du cholestérol Intégrité du muscle lisse	[9]
Épididyme (souris)	Accumulation esters de cholestérol Altération de la composition en acide gras Fragilité de la pièce intermédiaire du spermatozoïde	LXRβ	Efflux du cholestérol Synthèse des acides gras Maturation épididymaire du spermatozoïde	[15]

Tableau I. *Fonctions physiologiques des différentes isoformes des LXR dans les organes stéroïdogènes ou cibles des stéroïdes.*

des acides biliaires comme *cyp7a1* [2]. Ce rôle est le plus étudié, et tous les efforts des compagnies pharmaceutiques visent à activer cette fonction, et ce d'autant plus que l'activation des LXR est associée à une diminution du glucose circulant *via* l'induction de Glut4. À ce jour, ce qui bloque l'utilisation d'agonistes synthétiques des LXR *in vivo,* c'est le caractère hypertriglycéridémiant des LXR ; en effet les gènes *acc*, *fas* et *scd-1,* codant des enzymes du métabolisme des triglycérides, sont des cibles transcriptionnelles de RXR-LXR, de même que la protéine SREBP1c, véritable chef d'orchestre de la synthèse des acides gras [3]. Le véritable défi des compagnies pharmaceutiques sera d'identifier des molécules dissociant les effets hypocholestérolémiant et hypertriglycéridémiant.

L'immunité

Les LXR jouent un rôle important dans la physiologie du macrophage. L'activation des LXR par un agoniste synthétique diminue la production de nitrites induite par une infection bactérienne ou des lipopolysacharides [4], l'expression des gènes codant les facteurs pro-inflammatoires COX-2 (*cyclooxygenase-2*), iNOS (*nitric oxide synthase*), IL (interleukine)-1β et IL-6. De plus, les agonistes des LXR réduisent la réponse inflammatoire associée à une dermatite de contact induite chez la souris, confirmant le rôle anti-inflammatoire des LXR *in vivo*. De nombreuses études réalisées sur des modèles murins de la maladie d'Alzheimer ont montré que l'activation pharmacologique des LXR s'accompagnait d'une disparition des signes cellulaires de cette pathologie, comme la diminution des plaques amyloïdes ou de la neuroinflammation.

L'homéostasie des tissus stéroïdogènes et des organes cibles des stéroïdes

L'analyse phénotypique des tissus stéroïdogènes des souris *lxr*$^{-/-}$ a identifié différentes anomalies révélant le rôle physiologique des LXR dans ces organes et permettant l'identification de nombreuses cibles transcriptionnelles. Chez l'homme, ce sont les analyses conjointes de recherche de gènes par bioinformatique et l'utilisation d'agonistes synthétiques qui ont identifié les fonctions physiologiques potentielles des LXR. Un résumé de ces fonctions est présenté sur le *Tableau I*.

Schématiquement, les LXR régulent l'homéostasie lipidique et la synthèse hormonale des stéroïdes dans la plupart

des organes analysés, que ce soit en augmentant la synthèse des corticostéroïdes dans la surrénale ou des androgènes dans le testicule, et ce en activant directement les gènes clés de ces synthèses comme *StAR* [5, 6] ou en diminuant celle de la progestérone en favorisant l'efflux de cholestérol [7]. Par delà ce « simple » contrôle de la biosynthèse et du catabolisme des lipides, les LXR ont aussi une activité anti-apoptotique et proliférative permettant la gestion efficace du *pool* de cellules germinales du testicule.

Une des observations importantes de ces travaux est que les souris *lxr*$^{-/-}$ deviennent ainsi de bons modèles pour appréhender des situations complexes comme le syndrome de Cushing [5], la stérilité chez l'homme [6] et la femme [8], l'effet de l'obésité et du surpoids dans la parturition [9] et la pré-éclampsie [10, 11].

Les LXR, des cibles thérapeutiques prometteuses ?

Il est incontestable que les LXR sont des cibles pharmacologiques de choix dans le traitement des hypercholestérolémies dès que cet effet sera dissocié de leur effet hépatique sur la synthèse des triglycérides, en utilisant des molécules qui ne ciblent pas le foie et/ou qui n'activent pas les gènes de cette synthèse. Cependant, on ne pourra passer sous silence les effets stéroïdogènes majeurs des LXR, en particulier sur la testostérone. En effet à l'âge où seront traités les patients, on ne peut exclure le rôle délétère d'une augmentation des stéroïdes sur le déclenchement éventuel d'un cancer hormono-dépendant (sein ou prostate). ◊

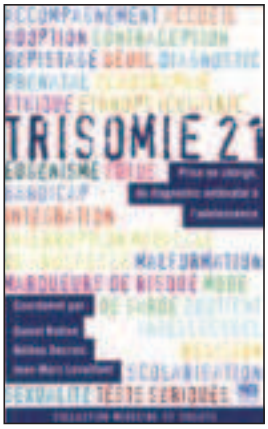
Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction

REMERCIEMENTS

Une partie des projets de recherche est financée par le Centre National de la Recherche Scientifique, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, l'Université Blaise Pascal, l'Université d'Auvergne, la Fondation pour la Recherche Médicale INE2000-407031/1 et la Fondation BNP-Paribas. K.M. a été allocataire du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

RÉFÉRENCES

1. Volle DH, Lobaccaro JM. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the « foie gras », the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 2007 ; 265-266 : 183-9.
2. Peet DJ, Turley SD, Ma W, *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998 ; 93 : 693-704.
3. Repa JJ, Liang G, Ou J, *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2004 ; 14 : 2819-30.
4. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, *et al.* Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003 ; 9 : 213-9.
5. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, *et al.* Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1902-12.
6. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, *et al.* Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007 ; 21 : 1014-27.
7. Drouineaud V, Sagot P, Garrido C, *et al.* Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol Hum Reprod* 2007 ; 13 : 373-9.
8. Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, Andersen CY. Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. *Mol Cell Endocrinol* 2006 ; 256 : 9-16.
9. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, *et al.* Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 4693-701.
10. Marceau G, Volle DH, Gallot D, *et al.* Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005 ; 283 : 175-81.
11. Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, *et al.* Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod* 2008 ; 78 : 968-75.
12. Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, *et al.* The liver X receptor-(beta) is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* 2005 ; 146 : 2519-30.
13. Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, *et al.* Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology* 2004 145:4583-91.
14. Weedon-Fekjaer MS, Duttaroy AK, Nebb HI. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta* 2005 ; 26 : 721-8.
15. Saez F, Chabory E, Cadet R, *et al.* Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J Androl* 2007 ; 9 : 574-82.



ISBN : 2-84254-105-7 248 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : ..... Prénom : .....
Adresse : .....
Code postal : ..... Ville : .....
Pays : .....
Fonction : .....
Je souhaite recevoir l'ouvrage **Trisomie 21 :** 15 € + 3 € de port = **18 € TTC**
en ..... exemplaire, soit un total de ..... €
❒ Par chèque, à l'ordre de **E D K**
❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard
Carte n° |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| Signature :
Date d'expiration : |_|_| |_|_|
N° de contrôle au dos de la carte : |_|_|

Références bibliographiques

1. Abate-Shen, C., and Shen, M.M. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14:2410-2434.
2. Chung, L.W. 1995. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv* 23:33-42.
3. Arienti, G., Carlini, E., Verdacchi, R., Cosmi, E.V., and Palmerini, C.A. 1997. Prostasome to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochim Biophys Acta* 1336:533-538.
4. Kelly, R.W., Holland, P., Skibinski, G., Harrison, C., McMillan, L., Hargreave, T., and James, K. 1991. Extracellular organelles (prostasomes) are immunosuppressive components of human semen. *Clin Exp Immunol* 86:550-556.
5. Sitaram, N., and Nagaraj, R. 1995. Seminal plasmin. *Bioessays* 17:415-422.
6. Stephan, C., Cammann, H., Meyer, H.A., Lein, M., and Jung, K. 2007. PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer. *Cancer Lett* 249:18-29.
7. Zaviacic, M., and Ablin, R.J. 2000. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in the human female. *Histol Histopathol* 15:131-142.
8. Wimpissinger, F., Stifter, K., Grin, W., and Stackl, W. 2007. The female prostate revisited: perineal ultrasound and biochemical studies of female ejaculate. *J Sex Med* 4:1388-1393; discussion 1393.
9. Prins, G.S., and Putz, O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 76:641-659.
10. Prins, G.S., Haseltine, F., Paulsen, C., Wang, C. 1993. Development of the prostate. *Reproductive issues and the aging male.*:101-112.
11. Sugimura, Y., Cunha, G.R., and Donjacour, A.A. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34:961-971.
12. Prins, G.S., and Birch, L. 1995. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology* 136:1303-1314.
13. Cunha, G.R. 1973. The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* 175:87-96.
14. Hogan, B.L. 1999. Morphogenesis. *Cell* 96:225-233.
15. Edwards, S., Campbell, C., Flohr, P., Shipley, J., Giddings, I., Te-Poele, R., Dodson, A., Foster, C., Clark, J., Jhavar, S., et al. 2005. Expression analysis onto microarrays of randomly selected cDNA clones highlights HOXB13 as a marker of human prostate cancer. *Br J Cancer* 92:376-381.
16. Abate-Shen, C., Banach-Petrosky, W.A., Sun, X., Economides, K.D., Desai, N., Gregg, J.P., Borowsky, A.D., Cardiff, R.D., and Shen, M.M. 2003. Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res* 63:3886-3890.
17. Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., et al. 2000. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 60:6111-6115.
18. Song, H., Zhang, B., Watson, M.A., Humphrey, P.A., Lim, H., and Milbrandt, J. 2009. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene* 28:3307-3319.
19. Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A.A., Sciavolino, P.J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C.R., Gridley, T., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., et al. 1999. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 13:966-977.
20. Pu, Y., Huang, L., Birch, L., and Prins, G.S. 2007. Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. *Endocrinology* 148:1697-1706.
21. Kopachik, W., Hayward, S.W., and Cunha, G.R. 1998. Expression of hepatocyte nuclear factor-3alpha in rat prostate, seminal vesicle, and bladder. *Dev Dyn* 211:131-140.

22. Mirosevich, J., Gao, N., and Matusik, R.J. 2005. Expression of Foxa transcription factors in the developing and adult murine prostate. *Prostate* 62:339-352.
23. Mirosevich, J., Gao, N., Gupta, A., Shappell, S.B., Jove, R., and Matusik, R.J. 2006. Expression and role of Foxa proteins in prostate cancer. *Prostate* 66:1013-1028.
24. Gao, N., Ishii, K., Mirosevich, J., Kuwajima, S., Oppenheimer, S.R., Roberts, R.L., Jiang, M., Yu, X., Shappell, S.B., Caprioli, R.M., et al. 2005. Forkhead box A1 regulates prostate ductal morphogenesis and promotes epithelial cell maturation. *Development* 132:3431-3443.
25. Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., de Sauvage, F.J., and Gao, W.Q. 2001. Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res* 61:7291-7297.
26. Grishina, I.B., Kim, S.Y., Ferrara, C., Makarenkova, H.P., and Walden, P.D. 2005. BMP7 inhibits branching morphogenesis in the prostate gland and interferes with Notch signaling. *Dev Biol* 288:334-347.
27. Wang, X.D., Leow, C.C., Zha, J., Tang, Z., Modrusan, Z., Radtke, F., Aguet, M., de Sauvage, F.J., and Gao, W.Q. 2006. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 290:66-80.
28. Wang, Z., Li, Y., Banerjee, S., Kong, D., Ahmad, A., Nogueira, V., Hay, N., and Sarkar, F.H. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Biochem* 109:726-736.
29. Huang, L., Pu, Y., Alam, S., Birch, L., and Prins, G.S. 2005. The role of Fgf10 signaling in branching morphogenesis and gene expression of the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev Biol* 278:396-414.
30. Schneider, A., Brand, T., Zweigerdt, R., and Arnold, H. 2000. Targeted disruption of the Nkx3.1 gene in mice results in morphogenetic defects of minor salivary glands: parallels to glandular duct morphogenesis in prostate. *Mech Dev* 95:163-174.
31. Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Clemens, J.Q., Bak, P.M., and Bushman, W. 1999. Prostate development requires Sonic hedgehog expressed by the urogenital sinus epithelium. *Dev Biol* 209:28-39.
32. Berman, D.M., Desai, N., Wang, X., Karhadkar, S.S., Reynon, M., Abate-Shen, C., Beachy, P.A., and Shen, M.M. 2004. Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol* 267:387-398.
33. Doles, J., Cook, C., Shi, X., Valosky, J., Lipinski, R., and Bushman, W. 2006. Functional compensation in Hedgehog signaling during mouse prostate development. *Dev Biol* 295:13-25.
34. Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., and Beachy, P.A. 2004. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431:707-712.
35. Donjacour, A.A., Thomson, A.A., and Cunha, G.R. 2003. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol* 261:39-54.
36. Lu, W., Luo, Y., Kan, M., and McKeehan, W.L. 1999. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* 274:12827-12834.
37. Kuslak, S.L., and Marker, P.C. 2007. Fibroblast growth factor receptor signaling through MEK-ERK is required for prostate bud induction. *Differentiation* 75:638-651.
38. Lin, Y., Liu, G., Zhang, Y., Hu, Y.P., Yu, K., Lin, C., McKeehan, K., Xuan, J.W., Ornitz, D.M., Shen, M.M., et al. 2007. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase is required for prostatic morphogenesis and the acquisition of strict androgen dependency for adult tissue homeostasis. *Development* 134:723-734.
39. Memarzadeh, S., Xin, L., Mulholland, D.J., Mansukhani, A., Wu, H., Teitell, M.A., and Witte, O.N. 2007. Enhanced paracrine FGF10 expression promotes formation of multifocal prostate adenocarcinoma and an increase in epithelial androgen receptor. *Cancer Cell* 12:572-585.
40. Chang, W.Y., Birch, L., Woodham, C., Gold, L.I., and Prins, G.S. 1999. Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor-beta signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21(cip1/waf1) expression associated with epithelial differentiation. *Endocrinology* 140:2801-2813.

41. Kim, I.Y., Ahn, H.J., Zelner, D.J., Shaw, J.W., Lang, S., Kato, M., Oefelein, M.G., Miyazono, K., Nemeth, J.A., Kozlowski, J.M., et al. 1996. Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Clin Cancer Res* 2:1255-1261.
42. Lamm, M.L., Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Lee, J., Clemens, J.Q., Hebner, C.M., and Bushman, W. 2001. Mesenchymal factor bone morphogenetic protein 4 restricts ductal budding and branching morphogenesis in the developing prostate. *Dev Biol* 232:301-314.
43. Zhang, T.J., Hoffman, B.G., Ruiz de Algara, T., and Helgason, C.D. 2006. SAGE reveals expression of Wnt signalling pathway members during mouse prostate development. *Gene Expr Patterns* 6:310-324.
44. Chesire, D.R., and Isaacs, W.B. 2003. Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* 10:537-560.
45. Yardy, G.W., and Brewster, S.F. 2005. Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8:119-126.
46. Bierie, B., Nozawa, M., Renou, J.P., Shillingford, J.M., Morgan, F., Oka, T., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Miyoshi, K., Wagner, K.U., et al. 2003. Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene* 22:3875-3887.
47. Rui, H., and Purvis, K. 1988. Hormonal control of prostate function. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 107:32-38.
48. Litvinov, I.V., De Marzo, A.M., and Isaacs, J.T. 2003. Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J Clin Endocrinol Metab* 88:2972-2982.
49. Joniau, S., Goeman, L., Pennings, J., and Van Poppel, H. 2005. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur Urol* 48:379-385.
50. Bostwick, D.G., Liu, L., Brawer, M.K., and Qian, J. 2004. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 6:171-179.
51. Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L., and Sobin, L.H. 2002. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94:2511-2516.
52. Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., D'Andrea, G., Occhiogrosso, G., Pichierri, A., and Caroli, E. 2005. Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *J Exp Clin Cancer Res* 24:203-207.
53. Tantivejkul, K., Kalikin, L.M., and Pienta, K.J. 2004. Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem* 91:706-717.
54. Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L.G., Sutherland, R.L., and Williams, E.D. 2005. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* 65:222-230.
55. Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jougla, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., et al. 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56:159-175.
56. Haas, G.P., Delongchamps, N., Brawley, O.W., Wang, C.Y., and de la Roza, G. 2008. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 15:3866-3871.
57. Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J., et al. 2004. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101:2371-2490.
58. Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., and O'Leary, J. 2005. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 58:673-684.
59. Rebbeck, T.R., Walker, A.H., Zeigler-Johnson, C., Weisburg, S., Martin, A.M., Nathanson, K.L., Wein, A.J., and Malkowicz, S.B. 2000. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet* 67:1014-1019.
60. Suarez, B.K., Gerhard, D.S., Lin, J., Haberer, B., Nguyen, L., Kesterson, N.K., and Catalona, W.J. 2001. Polymorphisms in the prostate cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 in multiplex families and healthy controls. *Cancer Res* 61:4982-4984.
61. Xu, J., Zheng, S.L., Carpten, J.D., Nupponen, N.N., Robbins, C.M., Mestre, J., Moses, T.Y., Faith, D.A., Kelly, B.D., Isaacs, S.D., et al. 2001. Evaluation of linkage and association of

HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 68:901-911.

62. Rennert, H., Bercovich, D., Hubert, A., Abeliovich, D., Rozovsky, U., Bar-Shira, A., Soloviov, S., Schreiber, L., Matzkin, H., Rennert, G., et al. 2002. A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 71:981-984.
63. Xu, J., Zheng, S.L., Komiya, A., Mychaleckyj, J.C., Isaacs, S.D., Hu, J.J., Sterling, D., Lange, E.M., Hawkins, G.A., Turner, A., et al. 2002. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 32:321-325.
64. Cybulski, C., Gorski, B., Debniak, T., Gliniewicz, B., Mierzejewski, M., Masojc, B., Jakubowska, A., Matyjasik, J., Zlowocka, E., Sikorski, A., et al. 2004. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 64:1215-1219.
65. Cybulski, C., Huzarski, T., Gorski, B., Masojc, B., Mierzejewski, M., Debniak, T., Gliniewicz, B., Matyjasik, J., Zlowocka, E., Kurzawski, G., et al. 2004. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 64:2677-2679.
66. Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., et al. 2009. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 301:39-51.
67. Sigounas, G., Anagnostou, A., and Steiner, M. 1997. dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr Cancer* 28:30-35.
68. Eichholzer, M., Stahelin, H.B., Gey, K.F., Ludin, E., and Bernasconi, F. 1996. Prediction of male cancer mortality by plasma levels of interacting vitamins: 17-year follow-up of the prospective Basel study. *Int J Cancer* 66:145-150.
69. Taylor, P.R., Dawsey, S.M., Hu, N., Albanes, D., and Wu, M. 1995. Nutritional intervention to prevent hereditary cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*:43-47.
70. Maramag, C., Menon, M., Balaji, K.C., Reddy, P.G., and Laxmanan, S. 1997. Effect of vitamin C on prostate cancer cells in vitro: effect on cell number, viability, and DNA synthesis. *Prostate* 32:188-195.
71. Shibata, A., Paganini-Hill, A., Ross, R.K., and Henderson, B.E. 1992. Intake of vegetables, fruits, beta-carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study. *Br J Cancer* 66:673-679.
72. Teiten, M.H., Gaascht, F., Eifes, S., Dicato, M., and Diederich, M. 2010. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr* 5:61-74.
73. Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., and Willett, W.C. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:1767-1776.
74. Clinton, S.K., Emenhiser, C., Schwartz, S.J., Bostwick, D.G., Williams, A.W., Moore, B.J., and Erdman, J.W., Jr. 1996. cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:823-833.
75. Talvas, J., Caris-Veyrat, C., Guy, L., Rambeau, M., Lyan, B., Minet-Quinard, R., Lobaccaro, J.M., Vasson, M.P., George, S., Mazur, A., et al. 2010. Differential effects of lycopene consumed in tomato paste and lycopene in the form of a purified extract on target genes of cancer prostatic cells. *Am J Clin Nutr* 91:1716-1724.
76. Adhami, V.M., Siddiqui, I.A., Ahmad, N., Gupta, S., and Mukhtar, H. 2004. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 64:8715-8722.
77. Adlercreutz, C.H., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Hockerstedt, K.A., Watanabe, S., Hamalainen, E.K., Markkanen, M.H., Makela, T.H., Wahala, K.T., and Adlercreutz, T. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125:757S-770S.
78. Stephens, F.O. 1997. Phytoestrogens and prostate cancer: possible preventive role. *Med J Aust* 167:138-140.

79. Tvedt, K.E., Halgunset, J., Kopstad, G., and Haugen, O.A. 1989. Intracellular distribution of calcium and zinc in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: X-ray microanalysis of freeze-dried cryosections. *Prostate* 15:41-51.
80. Zaichick, V., Sviridova, T.V., and Zaichick, S.V. 1997. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int Urol Nephrol* 29:565-574.
81. Bedwal, R.S., and Bahuguna, A. 1994. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 50:626-640.
82. Comstock, G.W., Bush, T.L., and Helzlsouer, K. 1992. Serum retinol, beta-carotene, vitamin E, and selenium as related to subsequent cancer of specific sites. *Am J Epidemiol* 135:115-121.
83. Giovannucci, E. 2007. Strengths and limitations of current epidemiologic studies: vitamin D as a modifier of colon and prostate cancer risk. *Nutr Rev* 65:S77-79.
84. Esquenet, M., Swinnen, J.V., Heyns, W., and Verhoeven, G. 1996. Control of LNCaP proliferation and differentiation: actions and interactions of androgens, 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol, all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid, and phenylacetate. *Prostate* 28:182-194.
85. Braun, M.M., Helzlsouer, K.J., Hollis, B.W., and Comstock, G.W. 1995. Prostate cancer and prediagnostic levels of serum vitamin D metabolites (Maryland, United States). *Cancer Causes Control* 6:235-239.
86. Gann, P.H., Ma, J., Hennekens, C.H., Hollis, B.W., Haddad, J.G., and Stampfer, M.J. 1996. Circulating vitamin D metabolites in relation to subsequent development of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:121-126.
87. Paganini-Hill, A., Chao, A., Ross, R.K., and Henderson, B.E. 1987. Vitamin A, beta-carotene, and the risk of cancer: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 79:443-448.
88. Hsing, A.W., Comstock, G.W., Abbey, H., and Polk, B.F. 1990. Serologic precursors of cancer. Retinol, carotenoids, and tocopherol and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 82:941-946.
89. Giovannucci, E. 1998. Dietary influences of 1,25(OH)2 vitamin D in relation to prostate cancer: a hypothesis. *Cancer Causes Control* 9:567-582.
90. Schwartz, G.G., and Hulka, B.S. 1990. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res* 10:1307-1311.
91. Alavanja, M.C., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C.F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J.A., Barker, J., et al. 2003. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am J Epidemiol* 157:800-814.
92. Driscoll, S.G., and Taylor, S.H. 1980. Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstet Gynecol* 56:537-542.
93. Ogunlewe, J.O., and Osegbe, D.N. 1989. Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. *Cancer* 63:1388-1392.
94. Elghany, N.A., Schumacher, M.C., Slattery, M.L., West, D.W., and Lee, J.S. 1990. Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology* 1:107-115.
95. Koutsilieris, M. 1993. Osteoblastic metastasis in advanced prostate cancer. *Anticancer Res* 13:443-449.
96. Msaouel, P., Pissimissis, N., Halapas, A., and Koutsilieris, M. 2008. Mechanisms of bone metastasis in prostate cancer: clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:341-355.
97. Berthold, D.R., Sternberg, C.N., and Tannock, I.F. 2005. Management of advanced prostate cancer after first-line chemotherapy. *J Clin Oncol* 23:8247-8252.
98. Simmons, M.N., and Klein, E.A. 2009. Combined androgen blockade revisited: emerging options for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Urology* 73:697-705.
99. Singh, P., Yam, M., Russell, P.J., and Khatri, A. 2010. Molecular and traditional chemotherapy: a united front against prostate cancer. *Cancer Lett* 293:1-14.
100. White, J.W. 1895. I. The Results of Double Castration in Hypertrophy of the Prostate. *Ann Surg* 22:1-80.

101. 1967. Treatment and survival of patients with cancer of the prostate. The Veterans Administration Co-operative Urological Research Group. *Surg Gynecol Obstet* 124:1011-1017.
102. Denis, L. 1998. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) prostate cancer trials, 1976-1996. *Urology* 51:50-57.
103. 1984. Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. The Leuprolide Study Group. *N Engl J Med* 311:1281-1286.
104. McLeod, D., Zinner, N., Tomera, K., Gleason, D., Fotheringham, N., Campion, M., and Garnick, M.B. 2001. A phase 3, multicenter, open-label, randomized study of abarelix versus leuprolide acetate in men with prostate cancer. *Urology* 58:756-761.
105. Chodak, G., Sharifi, R., Kasimis, B., Block, N.L., Macramalla, E., and Kennealey, G.T. 1995. Single-agent therapy with bicalutamide: a comparison with medical or surgical castration in the treatment of advanced prostate carcinoma. *Urology* 46:849-855.
106. Labrie, F. 1991. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78:C113-118.
107. Crawford, E.D., Eisenberger, M.A., McLeod, D.G., Spaulding, J.T., Benson, R., Dorr, F.A., Blumenstein, B.A., Davis, M.A., and Goodman, P.J. 1989. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med* 321:419-424.
108. 2000. Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials. Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 355:1491-1498.
109. Russell, P.J., and Khatri, A. 2006. Novel gene-directed enzyme prodrug therapies against prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 15:947-961.
110. Denis, L., and Murphy, G.P. 1993. Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer* 72:3888-3895.
111. Picus, J., and Schultz, M. 1999. Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer: preliminary results. *Semin Oncol* 26:14-18.
112. Mancuso, A., Oudard, S., and Sternberg, C.N. 2007. Effective chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer (HRPC): present status and perspectives with taxane-based treatments. *Crit Rev Oncol Hematol* 61:176-185.
113. Tannock, I.F., de Wit, R., Berry, W.R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K.N., Oudard, S., Theodore, C., James, N.D., Turesson, I., et al. 2004. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351:1502-1512.
114. Cheon, J., Kim, H.K., Moon, D.G., Yoon, D.K., Cho, J.H., and Koh, S.K. 2000. Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. *BJU Int* 85:759-766.
115. Portsmouth, D., Hlavaty, J., and Renner, M. 2007. Suicide genes for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 28:4-41.
116. Majhen, D., and Ambriovic-Ristov, A. 2006. Adenoviral vectors--how to use them in cancer gene therapy? *Virus Res* 119:121-133.
117. Figueiredo, M.L., Kao, C., and Wu, L. 2007. Advances in preclinical investigation of prostate cancer gene therapy. *Mol Ther* 15:1053-1064.
118. Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C.S., Eeles, R., Martin, F.L., Phillips, D.H., Crundwell, M., et al. 2007. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26:2667-2673.
119. Petrovics, G., Liu, A., Shaheduzzaman, S., Furusato, B., Sun, C., Chen, Y., Nau, M., Ravindranath, L., Chen, Y., Dobi, A., et al. 2005. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 24:3847-3852.
120. Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., et al. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644-648.
121. Barry, M., Perner, S., Demichelis, F., and Rubin, M.A. 2007. TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications. *Urology* 70:630-633.

122. Stanford, J.L., Just, J.J., Gibbs, M., Wicklund, K.G., Neal, C.L., Blumenstein, B.A., and Ostrander, E.A. 1997. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 57:1194-1198.
123. Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., Talcott, J., Hennekens, C.H., and Kantoff, P.W. 1997. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3320-3323.
124. Chang, B.L., Zheng, S.L., Hawkins, G.A., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Turner, A., Carpten, J.D., Bleecker, E.R., Walsh, P.C., Trent, J.M., et al. 2002. Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet* 110:122-129.
125. Linja, M.J., and Visakorpi, T. 2004. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92:255-264.
126. Gaddipati, J.P., McLeod, D.G., Heidenberg, H.B., Sesterhenn, I.A., Finger, M.J., Moul, J.W., and Srivastava, S. 1994. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* 54:2861-2864.
127. Taplin, M.E., and Balk, S.P. 2004. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem* 91:483-490.
128. Wetherill, Y.B., Petre, C.E., Monk, K.R., Puga, A., and Knudsen, K.E. 2002. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1:515-524.
129. Nam, R.K., Toi, A., Vesprini, D., Ho, M., Chu, W., Harvie, S., Sweet, J., Trachtenberg, J., Jewett, M.A., and Narod, S.A. 2001. V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology* 57:199-204.
130. Hsing, A.W., Chen, C., Chokkalingam, A.P., Gao, Y.T., Dightman, D.A., Nguyen, H.T., Deng, J., Cheng, J., Sesterhenn, I.A., Mostofi, F.K., et al. 2001. Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1077-1082.
131. Chang, B., Zheng, S.L., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Carpten, J.D., Hawkins, G.A., Bleecker, E.R., Walsh, P.C., Trent, J.M., Meyers, D.A., et al. 2001. Linkage and association of CYP17 gene in hereditary and sporadic prostate cancer. *Int J Cancer* 95:354-359.
132. Stanford, J.L., Noonan, E.A., Iwasaki, L., Kolb, S., Chadwick, R.B., Feng, Z., and Ostrander, E.A. 2002. A polymorphism in the CYP17 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:243-247.
133. Chang, B.L., Zheng, S.L., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Turner, A., Li, G., Walsh, P.C., Meyers, D.A., Isaacs, W.B., and Xu, J. 2004. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Cancer Res* 64:1997-1999.
134. Kibel, A.S., Suarez, B.K., Belani, J., Oh, J., Webster, R., Brophy-Ebbers, M., Guo, C., Catalona, W.J., Picus, J., and Goodfellow, P.J. 2003. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res* 63:2033-2036.
135. Morrison, N.A., Yeoman, R., Kelly, P.J., and Eisman, J.A. 1992. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6665-6669.
136. Skowronski, R.J., Peehl, D.M., and Feldman, D. 1993. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 132:1952-1960.
137. Zheng, S.L., Augustsson-Balter, K., Chang, B., Hedelin, M., Li, L., Adami, H.O., Bensen, J., Li, G., Johnasson, J.E., Turner, A.R., et al. 2004. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the CAncer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res* 64:2918-2922.
138. De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7:256-269.
139. Harden, S.V., Guo, Z., Epstein, J.I., and Sidransky, D. 2003. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 169:1138-1142.

140. Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Deweese, T.L., Lin, X., Brooks, J.D., Putzi, M.J., Nelson, C.P., Groopman, J.D., and Kensler, T.W. 2001. Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 952:135-144.
141. Gray, I.C., Phillips, S.M., Lee, S.J., Neoptolemos, J.P., Weissenbach, J., and Spurr, N.K. 1995. Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res* 55:4800-4803.
142. Komiya, A., Suzuki, H., Ueda, T., Yatani, R., Emi, M., Ito, H., and Shimazaki, J. 1996. Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 17:245-253.
143. Downward, J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15:177-182.
144. Couto, S.S., Cao, M., Duarte, P.C., Banach-Petrosky, W., Wang, S., Romanienko, P., Wu, H., Cardiff, R.D., Abate-Shen, C., and Cunha, G.R. 2009. Simultaneous haploinsufficiency of Pten and Trp53 tumor suppressor genes accelerates tumorigenesis in a mouse model of prostate cancer. *Differentiation* 77:103-111.
145. Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., et al. 2003. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4:209-221.
146. Kim, M.J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W.A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Cardiff, R.D., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. 2002. Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 62:2999-3004.
147. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
148. Gao, X., Porter, A.T., Grignon, D.J., Pontes, J.E., and Honn, K.V. 1997. Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* 31:264-281.
149. Latil, A., Bieche, I., Pesche, S., Volant, A., Valeri, A., Fournier, G., Cussenot, O., and Lidereau, R. 1999. Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer. *Hum Pathol* 30:809-815.
150. Tricoli, J.V., Gumerlock, P.H., Yao, J.L., Chi, S.G., D'Souza, S.A., Nestok, B.R., and deVere White, R.W. 1996. Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 15:108-114.
151. Bookstein, R., Shew, J.Y., Chen, P.L., Scully, P., and Lee, W.H. 1990. Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 247:712-715.
152. Schlechte, H., Lenk, S.V., Loning, T., Schnorr, D., Rudolph, B.D., Ditscherlein, G., and Loening, S.A. 1998. p53 tumour suppressor gene mutations in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur Urol* 34:433-440.
153. Nupponen, N., and Visakorpi, T. 1999. Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur Urol* 35:351-354.
154. Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H., Jordan, P., Blochlinger, A., Gasser, T.C., and Mihatsch, M.J. 1996. Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol* 148:1557-1565.
155. Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., and Eisenman, R.N. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:653-699.
156. Ellwood-Yen, K., Graeber, T.G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M.L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G.V., and Sawyers, C.L. 2003. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* 4:223-238.
157. Paronetto, M.P., Venables, J.P., Elliott, D.J., Geremia, R., Rossi, P., and Sette, C. 2003. Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLCgamma1 and Sam68. *Oncogene* 22:8707-8715.
158. Li, H., Ahonen, T.J., Alanen, K., Xie, J., LeBaron, M.J., Pretlow, T.G., Ealley, E.L., Zhang, Y., Nurmi, M., Singh, B., et al. 2004. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res* 64:4774-4782.
159. Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., and Herman, J.G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229.

160. Brothman, A.R., Swanson, G., Maxwell, T.M., Cui, J., Murphy, K.J., Herrick, J., Speights, V.O., Isaac, J., and Rohr, L.R. 2005. Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet* 156:31-36.
161. Lee, W.H., Morton, R.A., Epstein, J.I., Brooks, J.D., Campbell, P.A., Bova, G.S., Hsieh, W.S., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. 1994. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11733-11737.
162. Millar, D.S., Ow, K.K., Paul, C.L., Russell, P.J., Molloy, P.L., and Clark, S.J. 1999. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* 18:1313-1324.
163. Hoque, M.O., Begum, S., Topaloglu, O., Jeronimo, C., Mambo, E., Westra, W.H., Califano, J.A., and Sidransky, D. 2004. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res* 64:5511-5517.
164. Patra, S.K., Patra, A., and Dahiya, R. 2001. Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 287:705-713.
165. Yegnasubramanian, S., Haffner, M.C., Zhang, Y., Gurel, B., Cornish, T.C., Wu, Z., Irizarry, R.A., Morgan, J., Hicks, J., DeWeese, T.L., et al. 2008. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res* 68:8954-8967.
166. Wang, Q., Williamson, M., Bott, S., Brookman-Amissah, N., Freeman, A., Nariculam, J., Hubank, M.J., Ahmed, A., and Masters, J.R. 2007. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 26:6560-6565.
167. Takai, D., and Jones, P.A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3740-3745.
168. Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315-326.
169. Simon, J.A., and Lange, C.A. 2008. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 647:21-29.
170. Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16:2893-2905.
171. Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* 8:9-22.
172. Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., et al. 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419:624-629.
173. Yu, J., Yu, J., Rhodes, D.R., Tomlins, S.A., Cao, X., Chen, G., Mehra, R., Wang, X., Ghosh, D., Shah, R.B., et al. 2007. A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 67:10657-10663.
174. Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. 2003. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* 22:5323-5335.
175. Sander, S., Bullinger, L., Klapproth, K., Fiedler, K., Kestler, H.A., Barth, T.F., Moller, P., Stilgenbauer, S., Pollack, J.R., and Wirth, T. 2008. MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* 112:4202-4212.
176. Varambally, S., Cao, Q., Mani, R.S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., et al. 2008. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322:1695-1699.
177. Beke, L., Nuytten, M., Van Eynde, A., Beullens, M., and Bollen, M. 2007. The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. *Oncogene* 26:4590-4595.
178. Kunderfranco, P., Mello-Grand, M., Cangemi, R., Pellini, S., Mensah, A., Albertini, V., Malek, A., Chiorino, G., Catapano, C.V., and Carbone, G.M. 2010. ETS transcription factors

control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One* 5:e10547.

179. Shukeir, N., Arakelian, A., Kadhim, S., Garde, S., and Rabbani, S.A. 2003. Prostate secretory protein PSP-94 decreases tumor growth and hypercalcemia of malignancy in a syngenic in vivo model of prostate cancer. *Cancer Res* 63:2072-2078.
180. Hyakutake, H., Sakai, H., Yogi, Y., Tsuda, R., Minami, Y., Yushita, Y., Kanetake, H., Nakazono, I., and Saito, Y. 1993. Beta-microseminoprotein immunoreactivity as a new prognostic indicator of prostatic carcinoma. *Prostate* 22:347-355.
181. Agger, K., Cloos, P.A., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., and Helin, K. 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449:731-734.
182. Lan, F., Bayliss, P.E., Rinn, J.L., Whetstine, J.R., Wang, J.K., Chen, S., Iwase, S., Alpatov, R., Issaeva, I., Canaani, E., et al. 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 449:689-694.
183. Cho, Y.W., Hong, T., Hong, S., Guo, H., Yu, H., Kim, D., Guszczynski, T., Dressler, G.R., Copeland, T.D., Kalkum, M., et al. 2007. PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J Biol Chem* 282:20395-20406.
184. De Santa, F., Totaro, M.G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., and Natoli, G. 2007. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 130:1083-1094.
185. Xiang, Y., Zhu, Z., Han, G., Lin, H., Xu, L., and Chen, C.D. 2007. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res* 17:850-857.
186. Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., et al. 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439:871-874.
187. McGarvey, K.M., Greene, E., Fahrner, J.A., Jenuwein, T., and Baylin, S.B. 2007. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res* 67:5097-5102.
188. van der Vlag, J., and Otte, A.P. 1999. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* 23:474-478.
189. Abbas, A., and Gupta, S. 2008. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics* 3:300-309.
190. Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Fritzsche, F.R., Niesporek, S., Denkert, C., Dietel, M., et al. 2008. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer* 98:604-610.
191. Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M., et al. 2007. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep* 18:769-774.
192. Halkidou, K., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E., and Robson, C.N. 2004. Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate. *Eur Urol* 45:382-389; author reply 389.
193. Iljin, K., Wolf, M., Edgren, H., Gupta, S., Kilpinen, S., Skotheim, R.I., Peltola, M., Smit, F., Verhaegh, G., Schalken, J., et al. 2006. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 66:10242-10246.
194. Chen, H., Toyooka, S., Gazdar, A.F., and Hsieh, J.T. 2003. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 278:3121-3130.
195. Pruitt, K., Zinn, R.L., Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Kang, S.H., Watkins, D.N., Herman, J.G., and Baylin, S.B. 2006. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2:e40.
196. Chen, G., Shukeir, N., Potti, A., Sircar, K., Aprikian, A., Goltzman, D., and Rabbani, S.A. 2004. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced

metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 101:1345-1356.
197. Hutter, B., Helms, V., and Paulsen, M. 2006. Tandem repeats in the CpG islands of imprinted genes. *Genomics* 88:323-332.
198. Fournier, C., Goto, Y., Ballestar, E., Delaval, K., Hever, A.M., Esteller, M., and Feil, R. 2002. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J* 21:6560-6570.
199. Henckel, A., and Feil, R. 2008. [Differential epigenetic marking on imprinted genes and consequences in human diseases]. *Med Sci (Paris)* 24:747-752.
200. Jarrard, D.F., Bussemakers, M.J., Bova, G.S., and Isaacs, W.B. 1995. Regional loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs in human prostate tissues. *Clin Cancer Res* 1:1471-1478.
201. Herceg, Z. 2007. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 22:91-103.
202. Feinberg, A.P., and Tycko, B. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4:143-153.
203. Jablonka, E. 2004. Epigenetic epidemiology. *Int J Epidemiol* 33:929-935.
204. Sutherland, J.E., and Costa, M. 2003. Epigenetics and the environment. *Ann N Y Acad Sci* 983:151-160.
205. Belinsky, S.A., Klinge, D.M., Liechty, K.C., March, T.H., Kang, T., Gilliland, F.D., Sotnic, N., Adamova, G., Rusinova, G., and Telnov, V. 2004. Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 25:1063-1067.
206. van Doorn, R., Gruis, N.A., Willemze, R., van der Velden, P.A., and Tensen, C.P. 2005. Aberrant DNA methylation in cutaneous malignancies. *Semin Oncol* 32:479-487.
207. Pulling, L.C., Vuillemenot, B.R., Hutt, J.A., Devereux, T.R., and Belinsky, S.A. 2004. Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early and frequent in murine lung tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens. *Cancer Res* 64:3844-3848.
208. Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., and Waalkes, M.P. 2003. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* 286:355-365.
209. Li, H., and Minarovits, J. 2003. Host cell-dependent expression of latent Epstein-Barr virus genomes: regulation by DNA methylation. *Adv Cancer Res* 89:133-156.
210. Jicai, Z., Zongtao, Y., Jun, L., Haiping, L., Jianmin, W., and Lihua, H. 2006. Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 45:530-536.
211. van Engeland, M., Weijenberg, M.P., Roemen, G.M., Brink, M., de Bruine, A.P., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., Baylin, S.B., de Goeij, A.F., and Herman, J.G. 2003. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Res* 63:3133-3137.
212. Giovannucci, E., Rimm, E.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., and Willett, W.C. 1995. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 87:265-273.
213. Rowling, M.J., McMullen, M.H., and Schalinske, K.L. 2002. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. *J Nutr* 132:365-369.
214. Sohn, K.J., Stempak, J.M., Reid, S., Shirwadkar, S., Mason, J.B., and Kim, Y.I. 2003. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon. *Carcinogenesis* 24:81-90.
215. Lu, Q., Yang, Y.T., Chen, C.S., Davis, M., Byrd, J.C., Etherton, M.R., Umar, A., and Chen, C.S. 2004. Zn2+-chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 47:467-474.

216. Zapisek, W.F., Cronin, G.M., Lyn-Cook, B.D., and Poirier, L.A. 1992. The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 13:1869-1872.
217. Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Sasaki, Y., Takahama, M., and Konishi, Y. 1999. Hypomethylation of CpG sites and c-myc gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Jpn J Cancer Res* 90:909-913.
218. Lyn-Cook, B.D., Blann, E., Payne, P.W., Bo, J., Sheehan, D., and Medlock, K. 1995. Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:116-119.
219. Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., and Yang, C.S. 2003. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63:7563-7570.
220. Day, J.K., Bauer, A.M., DesBordes, C., Zhuang, Y., Kim, B.E., Newton, L.G., Nehra, V., Forsee, K.M., MacDonald, R.S., Besch-Williford, C., et al. 2002. Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* 132:2419S-2423S.
221. Kai, L., Samuel, S.K., and Levenson, A.S. Resveratrol enhances p53 acetylation and apoptosis in prostate cancer by inhibiting MTA1/NuRD complex. *Int J Cancer* 126:1538-1548.
222. Papoutsis, A.J., Lamore, S.D., Wondrak, G.T., Selmin, O.I., and Romagnolo, D.F. Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. *J Nutr* 140:1607-1614.
223. Davis, C.D., and Uthus, E.O. 2004. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:988-995.
224. Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. 2003. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23:5293-5300.
225. Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P., and Waalkes, M.P. 1997. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10907-10912.
226. Chen, H., Liu, J., Zhao, C.Q., Diwan, B.A., Merrick, B.A., and Waalkes, M.P. 2001. Association of c-myc overexpression and hyperproliferation with arsenite-induced malignant transformation. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:260-268.
227. Yoon, J.H., Smith, L.E., Feng, Z., Tang, M., Lee, C.S., and Pfeifer, G.P. 2001. Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res* 61:7110-7117.
228. Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
229. Guarente, L. 2005. Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev* 126:923-928.
230. Broday, L., Peng, W., Kuo, M.H., Salnikow, K., Zoroddu, M., and Costa, M. 2000. Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation. *Cancer Res* 60:238-241.
231. Zoroddu, M.A., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Molinari, H., Salnikow, K., Broday, L., and Costa, M. 2000. Interaction of Ni(II) and Cu(II) with a metal binding sequence of histone H4: AKRHRK, a model of the H4 tail. *Biochim Biophys Acta* 1475:163-168.
232. Ke, Q., Davidson, T., Chen, H., Kluz, T., and Costa, M. 2006. Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride. *Carcinogenesis* 27:1481-1488.
233. Watanabe, M., Nakayama, T., Shiraishi, T., Stemmermann, G.N., and Yatani, R. 2000. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol Oncol* 5:274-283.
234. Chavarro, J.E., Stampfer, M.J., Campos, H., Kurth, T., Willett, W.C., and Ma, J. 2008. A prospective study of trans-fatty acid levels in blood and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:95-101.
235. Crowe, F.L., Allen, N.E., Appleby, P.N., Overvad, K., Aardestrup, I.V., Johnsen, N.F., Tjonneland, A., Linseisen, J., Kaaks, R., Boeing, H., et al. 2008. Fatty acid composition of

plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 88:1353-1363.

236. Kobayashi, N., Barnard, R.J., Said, J., Hong-Gonzalez, J., Corman, D.M., Ku, M., Doan, N.B., Gui, D., Elashoff, D., Cohen, P., et al. 2008. Effect of low-fat diet on development of prostate cancer and Akt phosphorylation in the Hi-Myc transgenic mouse model. *Cancer Res* 68:3066-3073.
237. Beckers, A., Organe, S., Timmermans, L., Scheys, K., Peeters, A., Brusselmans, K., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. 2007. Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* 67:8180-8187.
238. Swinnen, J.V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., and Verhoeven, G. 2002. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 98:19-22.
239. Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Kern, S.G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr., and Hampton, G.M. 2001. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 61:5974-5978.
240. Swinnen, J.V., Vanderhoydonc, F., Elgamal, A.A., Eelen, M., Vercaeren, I., Joniau, S., Van Poppel, H., Baert, L., Goossens, K., Heyns, W., et al. 2000. Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* 88:176-179.
241. Brusselmans, K., De Schrijver, E., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. 2005. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 65:6719-6725.
242. Sabbisetti, V., Di Napoli, A., Seeley, A., Amato, A.M., O'Regan, E., Ghebremichael, M., Loda, M., and Signoretti, S. 2009. p63 promotes cell survival through fatty acid synthase. *PLoS One* 4:e5877.
243. Fiorentino, M., Zadra, G., Palescandolo, E., Fedele, G., Bailey, D., Fiore, C., Nguyen, P.L., Migita, T., Zamponi, R., Di Vizio, D., et al. 2008. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of beta-catenin in prostate cancer. *Lab Invest* 88:1340-1348.
244. Georget, V., Terouanne, B., Nicolas, J.C., and Sultan, C. 2002. Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry* 41:11824-11831.
245. Moore, S., Knudsen, B., True, L.D., Hawley, S., Etzioni, R., Wade, C., Gifford, D., Coleman, I., and Nelson, P.S. 2005. Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 114:563-571.
246. Berquin, I.M., Min, Y., Wu, R., Wu, J., Perry, D., Cline, J.M., Thomas, M.J., Thornburg, T., Kulik, G., Smith, A., et al. 2007. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J Clin Invest* 117:1866-1875.
247. Chen, Y., and Hughes-Fulford, M. 2001. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 91:41-45.
248. Kelavkar, U., Lin, Y., Landsittel, D., Chandran, U., and Dhir, R. 2006. The yin and yang of 15-lipoxygenase-1 and delta-desaturases: dietary omega-6 linoleic acid metabolic pathway in prostate. *J Carcinog* 5:9.
249. Patel, M.I., Kurek, C., and Dong, Q. 2008. The arachidonic acid pathway and its role in prostate cancer development and progression. *J Urol* 179:1668-1675.
250. Sen, M., McHugh, K., Hutzley, J., Philips, B.J., Dhir, R., Parwani, A.V., and Kelavkar, U.P. 2006. Orthotopic expression of human 15-lipoxygenase (LO)-1 in the dorsolateral prostate of normal wild-type C57BL/6 mouse causes PIN-like lesions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 81:1-13.
251. Chavarro, J.E., Stampfer, M.J., Li, H., Campos, H., Kurth, T., and Ma, J. 2007. A prospective study of polyunsaturated fatty acid levels in blood and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:1364-1370.
252. Fradet, V., Cheng, I., Casey, G., and Witte, J.S. 2009. Dietary omega-3 fatty acids, cyclooxygenase-2 genetic variation, and aggressive prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 15:2559-2566.

253. McEntee, M.F., Ziegler, C., Reel, D., Tomer, K., Shoieb, A., Ray, M., Li, X., Neilsen, N., Lih, F.B., O'Rourke, D., et al. 2008. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids enhance hormone ablation therapy in androgen-dependent prostate cancer. *Am J Pathol* 173:229-241.
254. Kelavkar, U.P., Hutzley, J., Dhir, R., Kim, P., Allen, K.G., and McHugh, K. 2006. Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6:omega-3 ratio in diet: athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy. *Neoplasia* 8:112-124.
255. Dimri, M., Bommi, P.V., Sahasrabuddhe, A.A., Khandekar, J.D., and Dimri, G.P. 2010. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31:489-495.
256. Freeman, M.R., and Solomon, K.R. 2004. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91:54-69.
257. Michaud, D.S., Augustsson, K., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willet, W.C., and Giovannucci, E. 2001. A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 12:557-567.
258. Kolonel, L.N., Nomura, A.M., and Cooney, R.V. 1999. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 91:414-428.
259. Eichholzer, M., Stahelin, H.B., Gutzwiller, F., Ludin, E., and Bernasconi, F. 2000. Association of low plasma cholesterol with mortality for cancer at various sites in men: 17-y follow-up of the prospective Basel study. *Am J Clin Nutr* 71:569-574.
260. Magura, L., Blanchard, R., Hope, B., Beal, J.R., Schwartz, G.G., and Sahmoun, A.E. 2008. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 19:1259-1266.
261. Platz, E.A., Till, C., Goodman, P.J., Parnes, H.L., Figg, W.D., Albanes, D., Neuhouser, M.L., Klein, E.A., Thompson, I.M., Jr., and Kristal, A.R. 2009. Men with low serum cholesterol have a lower risk of high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2807-2813.
262. Ahn, J., Lim, U., Weinstein, S.J., Schatzkin, A., Hayes, R.B., Virtamo, J., and Albanes, D. 2009. Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2814-2821.
263. Murtola, T.J., Tammela, T.L., Lahtela, J., and Auvinen, A. 2007. Cholesterol-lowering drugs and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2226-2232.
264. Platz, E.A., Leitzmann, M.F., Visvanathan, K., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Giovannucci, E. 2006. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 98:1819-1825.
265. Flick, E.D., Habel, L.A., Chan, K.A., Van Den Eeden, S.K., Quinn, V.P., Haque, R., Orav, E.J., Seeger, J.D., Sadler, M.C., Quesenberry, C.P., Jr., et al. 2007. Statin use and risk of prostate cancer in the California Men's Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2218-2225.
266. Jacobs, E.J., Rodriguez, C., Bain, E.B., Wang, Y., Thun, M.J., and Calle, E.E. 2007. Cholesterol-lowering drugs and advanced prostate cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2213-2217.
267. White, C. 1909. On the occurence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 13:3-10.
268. Swyer, G. 1942. The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* 2:372-375.
269. Graziani, S.R., Igreja, F.A., Hegg, R., Meneghetti, C., Brandizzi, L.I., Barboza, R., Amancio, R.F., Pinotti, J.A., and Maranhao, R.C. 2002. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 85:493-497.
270. Tatidis, L., Masquelier, M., and Vitols, S. 2002. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Biochem Pharmacol* 63:2169-2180.
271. Caruso, M.G., Notarnicola, M., Santillo, M., Cavallini, A., and Di Leo, A. 1999. Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res* 19:451-454.

272. Satoh, T., Yang, G., Egawa, S., Addai, J., Frolov, A., Kuwao, S., Timme, T.L., Baba, S., and Thompson, T.C. 2003. Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 97:1225-1233.
273. Yang, G., Truong, L.D., Timme, T.L., Ren, C., Wheeler, T.M., Park, S.H., Nasu, Y., Bangma, C.H., Kattan, M.W., Scardino, P.T., et al. 1998. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 4:1873-1880.
274. Tahir, S.A., Yang, G., Ebara, S., Timme, T.L., Satoh, T., Li, L., Goltsov, A., Ittmann, M., Morrisett, J.D., and Thompson, T.C. 2001. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 61:3882-3885.
275. Lasserre, R., Guo, X.J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A.M., Soudja, S.M., Lenne, P.F., Rigneault, H., Olive, D., et al. 2008. Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat Chem Biol* 4:538-547.
276. Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. 2005. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115:959-968.
277. Zhuang, L., Lin, J., Lu, M.L., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. 2002. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:2227-2231.
278. Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., and Laudet, V. 1997. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6803-6808.
279. Laudet, V. 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19:207-226.
280. Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294:1866-1870.
281. Glass, C.K. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407.
282. Bookout, A.L., and Mangelsdorf, D.J. 2003. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 1:e012.
283. Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:459-481.
284. Mouzat, K., Alves, G., Pommier, A., Viennois, E., Pihen, T., Caira, F., Baron, S., and JM, A.L. 2009. [Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction]. *Med Sci (Paris)* 25:141-144.
285. Souidi, M., Dubrac, S., Parquet, M., Volle, D.H., Lobaccaro, J.M., Mathe, D., Combes, O., Scanff, P., Lutton, C., and Aigueperse, J. 2004. [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* 28:279-293.
286. Chen, M., Beaven, S., and Tontonoz, P. 2005. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J Lipid Res* 46:2570-2579.
287. Giguere, V. 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20:689-725.
288. Aumais, J.P., Lee, H.S., DeGannes, C., Horsford, J., and White, J.H. 1996. Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 271:12568-12577.
289. Chen, J.D., and Evans, R.M. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
290. Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., et al. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.
291. Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. 1995. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378:681-689.
292. Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850.

293. Alberti, S., Steffensen, K.R., and Gustafsson, J.A. 2000. Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene* 243:93-103.
294. Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704.
295. Volle, D.H., Repa, J.J., Mazur, A., Cummins, C.L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D.J., and Lobaccaro, J.M. 2004. Regulation of the aldo-keto reductase gene akr1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 18:888-898.
296. Feltkamp, D., Wiebel, F.F., Alberti, S., and Gustafsson, J.A. 1999. Identification of a novel DNA binding site for nuclear orphan receptor OR1. *J Biol Chem* 274:10421-10429.
297. Lobaccaro, J.M., Repa, J.J., Lu, T.T., Caira, F., Henry-Berger, J., Volle, D.H., and Mangelsdorf, D.J. 2001. [Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]. *Ann Endocrinol (Paris)* 62:239-247.
298. Hu, X., and Lazar, M.A. 2000. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11:6-10.
299. Lazar, M.A. 2003. Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 1:e001.
300. Cummins, C.L., Volle, D.H., Zhang, Y., McDonald, J.G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D.J., and Lobaccaro, J.M. 2006. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116:1902-1912.
301. Volle, D.H., Frenoux, J.M., Mouzat, K., Vernet, P., Prod'homme, M., Britan, A., Saez, F., Henry-Berger, J., Kocer, A., Caira, F., et al. 2005. Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle. *Andrologie* 15:151-159.
302. Peet, D.J., Janowski, B.A., and Mangelsdorf, D.J. 1998. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 8:571-575.
303. Schroepfer, G.J., Jr. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80:361-554.
304. Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731.
305. Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A., and Saez, E. 2007. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 581:1721-1726.
306. Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., and Mangelsdorf, D.J. 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:266-271.
307. Song, C., Hiipakka, R.A., and Liao, S. 2001. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66:473-479.
308. Forman, B.M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G.J., Jr., and Evans, R.M. 1997. The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10588-10593.
309. Kliewer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., et al. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318-4323.
310. Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 2001. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6027-6032.
311. Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., et al. 2002. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 277:1705-1711.

312. Valledor, A.F. 2005. The innate immune response under the control of the LXR pathway. *Immunobiology* 210:127-132.
313. Baranowski, M. 2008. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 7:31-55.
314. Volle, D.H., and Lobaccaro, J.M. 2007. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 265-266:183-189.
315. Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14:2831-2838.
316. Talukdar, S., and Hillgartner, F.B. 2006. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res* 47:2451-2461.
317. Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., and Tontonoz, P. 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277:11019-11025.
318. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C., and Ntambi, J.M. 2006. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol* 26:6786-6798.
319. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11041-11048.
320. Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124:35-46.
321. Sun, L.P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6519-6526.
322. Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6511-6518.
323. Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14:2819-2830.
324. Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., and Uyeda, K. 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9116-9121.
325. Dentin, R., Denechaud, P.D., Benhamed, F., Girard, J., and Postic, C. 2006. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 136:1145-1149.
326. Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B.C., and Uyeda, K. 2004. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15597-15602.
327. Cha, J.Y., and Repa, J.J. 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282:743-751.
328. Denechaud, P.D., Bossard, P., Lobaccaro, J.M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. 2008. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118:956-964.
329. Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A., and Saez, E. 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219-223.
330. Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272:3137-3140.

331. Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Bjorkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J.A. 2001. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest* 107:565-573.
332. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. 2009. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325:100-104.
333. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., et al. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22:336-345.
334. Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275:28240-28245.
335. Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524-1529.
336. Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. 2002. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277:18793-18800.
337. Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. 2001. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 276:39438-39447.
338. Engel, T., Lorkowski, S., Lueken, A., Rust, S., Schluter, B., Berger, G., Cullen, P., and Assmann, G. 2001. The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 288:483-488.
339. Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. 2001. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:507-512.
340. Mak, P.A., Laffitte, B.A., Desrumaux, C., Joseph, S.B., Curtiss, L.K., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., and Edwards, P.A. 2002. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277:31900-31908.
341. Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. 2003. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17:985-993.
342. Fukuchi, J., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Chuu, C.P., and Liao, S. 2004. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7686-7689.
343. Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Hayes, D.F., et al. 2003. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11606-11611.
344. Croonquist, P.A., and Van Ness, B. 2005. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene* 24:6269-6280.
345. Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., et al. 2005. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12177-12182.
346. Wang, S., Garcia, A.J., Wu, M., Lawson, D.A., Witte, O.N., and Wu, H. 2006. Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1480-1485.
347. De Marzo, A.M., DeWeese, T.L., Platz, E.A., Meeker, A.K., Nakayama, M., Epstein, J.I., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. 2004. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem* 91:459-477.

348. Nagle, R.B., Ahmann, F.R., McDaniel, K.M., Paquin, M.L., Clark, V.A., and Celniker, A. 1987. Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res* 47:281-286.
349. van Leenders, G.J., and Schalken, J.A. 2001. Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int* 88 Suppl 2:35-42; discussion 49-50.
350. Liu, A.Y., Nelson, P.S., van den Engh, G., and Hood, L. 2002. Human prostate epithelial cell-type cDNA libraries and prostate expression patterns. *Prostate* 50:92-103.
351. Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B.E., Cao, Q., Prensner, J.R., Rubin, M.A., Shah, R.B., et al. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10:177-188.
352. Cerveira, N., Ribeiro, F.R., Peixoto, A., Costa, V., Henrique, R., Jeronimo, C., and Teixeira, M.R. 2006. TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* 8:826-832.
353. Birnie, R., Bryce, S.D., Roome, C., Dussupt, V., Droop, A., Lang, S.H., Berry, P.A., Hyde, C.F., Lewis, J.L., Stower, M.J., et al. 2008. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol* 9:R83.
354. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-463.
355. Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21.
356. Jaenisch, R., and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245-254.
357. Levine, S.S., King, I.F., and Kingston, R.E. 2004. Division of labor in polycomb group repression. *Trends Biochem Sci* 29:478-485.
358. Lund, A.H., and van Lohuizen, M. 2004. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 16:239-246.
359. Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., and Zhang, Y. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300:131-135.
360. Sado, T., Fenner, M.H., Tan, S.S., Tam, P., Shioda, T., and Li, E. 2000. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol* 225:294-303.
361. Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H., Jenuwein, T., Otte, A.P., and Brockdorff, N. 2003. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4:481-495.
362. Klawitter, J., Shokati, T., Moll, V., Christians, U., and Klawitter, J. 2010. Effects of lovastatin on breast cancer cells: a proteo-metabonomic study. *Breast Cancer Res* 12:R16.
363. Vedin, L.L., Lewandowski, S.A., Parini, P., Gustafsson, J.A., and Steffensen, K.R. 2009. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30:575-579.
364. Pommier, A.J., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., et al. 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29:2712-2723.
365. Paternot, S., Bockstaele, L., Bisteau, X., Kooken, H., Coulonval, K., and Roger, P.P. 2010. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle* 9:689-699.
366. Wang, W., and Macaulay, R.J. 2003. Cell-cycle gene expression in lovastatin-induced medulloblastoma apoptosis. *Can J Neurol Sci* 30:349-357.
367. Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2:764-776.

368. Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M., and Bostwick, D.G. 1997. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 57:524-531.
369. Friedman, J.M., Liang, G., Liu, C.C., Wolff, E.M., Tsai, Y.C., Ye, W., Zhou, X., and Jones, P.A. 2009. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 69:2623-2629.
370. Cao, P., Deng, Z., Wan, M., Huang, W., Cramer, S.D., Xu, J., Lei, M., and Sui, G. 2010. MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. *Mol Cancer* 9:108.
371. Dillard, P.R., Lin, M.F., and Khan, S.A. 2008. Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. *Mol Cell Endocrinol* 295:115-120.
372. Chiang, C.W., Huang, Y., Leong, K.W., Chen, L.C., Chen, H.C., Chen, S.J., and Chou, C.K. 2010. PKCalpha mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells. *J Biomed Sci* 17:35.
373. Kuroki, T., Ikuta, T., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Ohba, M., Huh, N., Mizuno, K., Ohno, S., Yamada, E., and Chida, K. 2000. Cholesterol sulfate, an activator of protein kinase C mediating squamous cell differentiation: a review. *Mutat Res* 462:189-195.
374. Dery, M.A., Michaud, M.D., and Richard, D.E. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37:535-540.
375. Kallen, J., Schlaeppi, J.M., Bitsch, F., Delhon, I., and Fournier, B. 2004. Crystal structure of the human RORalpha Ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 A. *J Biol Chem* 279:14033-14038.
376. Kallen, J.A., Schlaeppi, J.M., Bitsch, F., Geisse, S., Geiser, M., Delhon, I., and Fournier, B. 2002. X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 A: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure* 10:1697-1707.
377. Kim, E.J., Yoo, Y.G., Yang, W.K., Lim, Y.S., Na, T.Y., Lee, I.K., and Lee, M.O. 2008. Transcriptional activation of HIF-1 by RORalpha and its role in hypoxia signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1796-1802.
378. Kim, H.J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., and Gustafsson, J.A. 2009. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:558-563.
379. Fukuchi, J., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Hsu, S., Ko, A.L., Fitzgerald, M.L., and Liao, S. 2004. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7682-7685.
380. 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 Res* 66:6482-6486.
381. Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M.J. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625-1638.
382. Wright, M.E., Chang, S.C., Schatzkin, A., Albanes, D., Kipnis, V., Mouw, T., Hurwitz, P., Hollenbeck, A., and Leitzmann, M.F. 2007. Prospective study of adiposity and weight change in relation to prostate cancer incidence and mortality. *Cancer* 109:675-684.
383. Rodriguez, C., Freedland, S.J., Deka, A., Jacobs, E.J., McCullough, M.L., Patel, A.V., Thun, M.J., and Calle, E.E. 2007. Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:63-69.
384. Andersson, S.O., Wolk, A., Bergstrom, R., Adami, H.O., Engholm, G., Englund, A., and Nyren, O. 1997. Body size and prostate cancer: a 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. *J Natl Cancer Inst* 89:385-389.
385. Okasha, M., McCarron, P., McEwen, J., and Smith, G.D. 2002. Body mass index in young adulthood and cancer mortality: a retrospective cohort study. *J Epidemiol Community Health* 56:780-784.

386. Calle, E.E., and Kaaks, R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4:579-591.
387. Massengill, J.C., Sun, L., Moul, J.W., Wu, H., McLeod, D.G., Amling, C., Lance, R., Foley, J., Sexton, W., Kusuda, L., et al. 2003. Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 169:1670-1675.
388. Schatzl, G., Madersbacher, S., Thurridl, T., Waldmuller, J., Kramer, G., Haitel, A., and Marberger, M. 2001. High-grade prostate cancer is associated with low serum testosterone levels. *Prostate* 47:52-58.
389. Platz, E.A., Leitzmann, M.F., Rifai, N., Kantoff, P.W., Chen, Y.C., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Giovannucci, E. 2005. Sex steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1262-1269.
390. Severi, G., Morris, H.A., MacInnis, R.J., English, D.R., Tilley, W., Hopper, J.L., Boyle, P., and Giles, G.G. 2006. Circulating steroid hormones and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:86-91.
391. Baillargeon, J., and Rose, D.P. 2006. Obesity, adipokines, and prostate cancer (review). *Int J Oncol* 28:737-745.
392. Hsieh, L.J., Carter, H.B., Landis, P.K., Tucker, K.L., Metter, E.J., Newschaffer, C.J., and Platz, E.A. 2003. Association of energy intake with prostate cancer in a long-term aging study: Baltimore Longitudinal Study of Aging (United States). *Urology* 61:297-301.
393. Boileau, T.W., Liao, Z., Kim, S., Lemeshow, S., Erdman, J.W., Jr., and Clinton, S.K. 2003. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *J Natl Cancer Inst* 95:1578-1586.
394. Mukherjee, P., Sotnikov, A.V., Mangian, H.J., Zhou, J.R., Visek, W.J., and Clinton, S.K. 1999. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 91:512-523.

Résumé

Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation de la consommation de glucides, d'acides gras et de cholestérol liée aux changements des habitudes alimentaires dans la plupart des pays industrialisés est à l'origine de nombreuses pathologies telles que l'obésité, les troubles cardio-vasculaires, le développement du diabète de type II et la survenue de cancers. Plusieurs arguments bibliographiques suggèrent notamment que le cholestérol puisse être un élément à risque dans la survenue du cancer de la prostate. D'une part, l'hypercholestérolémie est associée à une augmentation des cas de cancer de la prostate et, d'autre part, les cellules cancéreuses présentent des dérèglements du métabolisme des lipides associés à l'accumulation de cholestérol dans les tumeurs solides.

Les objectifs de ces travaux ont été d'analyser le rôle du cholestérol dans le développement du cancer de la prostate et d'étudier le rôle des récepteurs nucléaires LXRs (*liver X receptors*), régulateurs fondamentaux de l'homéostasie du cholestérol, dans les mécanismes associés à l'initiation et à la progression tumorale.

Nos résultats montrent qu'une accumulation de cholestérol, induite par un régime chez les souris déficientes en LXRs, peut initier les premières étapes du développement tumoral par des mécanismes épigénétiques mettant en jeu l'action répressive de l'histone méthyltransférase EZH2 sur des gènes suppresseurs de tumeur. En parallèle, l'activation pharmacologique des LXRs dans des cellules cancéreuses humaines réduit la croissance tumorale en augmentant la mort des cellules par des mécanismes faisant intervenir les *rafts* lipidiques.

Au total, nos travaux révèlent l'existence d'une relation entre la consommation excessive de cholestérol et la modification d'empreintes épigénétiques, mécanisme de plus en plus associé aux processus carcinogéniques. Nos données indiquent également que les LXRs, en s'opposant à l'accumulation de cholestérol intracellulaire, ralentissent l'initiation et la progression du cancer de la prostate. Ainsi, toute stratégie thérapeutique visant à diminuer le cholestérol intra-tumoral, telle que l'activation pharmacologique des LXRs, peut être considérée comme une piste thérapeutique dans le cadre du cancer de la prostate.

Mots clés : Cancer, Prostate, Cholestérol, LXR, *Rafts*, EZH2.

Abstract

In the recent decades, increased consumption of carbohydrates, fatty acids and cholesterol, linked to changes in dietary habits in most industrialized countries, is the cause of various diseases such as obesity, cardio-vascular troubles, development of type II diabetes and the onset of cancer. Literature reveals several arguments suggesting that cholesterol may be a risk factor in the occurrence of prostate cancer. First, hypercholesterolemia has been associated with an increased incidence of prostate cancer and, second, cancer cells exhibit deregulations of lipid metabolism associated with cholesterol accumulation in solid tumors.

The objectives of this work were to analyze the role of cholesterol in the development of prostate cancer and to study the role of nuclear receptors LXRs (liver X receptors), fundamental regulators of cholesterol homeostasis, in the mechanisms associated with tumor initiation and progression.

Our results show that cholesterol overload induced by a diet in *lxr* knockout mice may initiate the early stages of tumor development by epigenetic mechanisms involving the repressive action of histone methyltransferase EZH2 on tumor suppressor genes. In parallel, the pharmacological activation of LXRs in human cancer cells reduced tumor growth by increasing cell death through mechanisms involving lipid rafts.

Taken together, our data reveal the existence of a relationship between environmental factors such as diet consumption of cholesterol and changes of epigenetic imprinting, a mechanism increasingly associated with carcinogenic process. Our data also indicate that LXRs protect from the initiation and progression of prostate cancer by blocking the accumulation of intracellular cholesterol. Thus, all therapeutic strategies leading to intra-tumoral cholesterol lowering, such as pharmacological activation of LXRs, may be relevant treatments of prostate cancer.

Key words: Cancer, Prostate, Cholesterol, LXR, Rafts, EZH2.