HAL
open science

Rôle de la caspase-1 dans les phénomènes de mort cellulaire dans le cancer colorectal

Valentin Derangère Derangère

To cite this version:

Valentin Derangère Derangère. Rôle de la caspase-1 dans les phénomènes de mort cellulaire dans le cancer colorectal. Biologie cellulaire. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS063 . tel-01379200v2

HAL Id: tel-01379200

https://theses.hal.science/tel-01379200v2

Submitted on 13 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

INSERM U866

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Biologie Cellulaire

par

Valentin Derangère, Docteur en Pharmacie

Le 10 Octobre 2014

RÔLE DE LA CASPASE-1 DANS LES PHENOMENES DE MORT CELLULAIRE DANS LE CANCER COLORECTAL

Directeur de Thèse

François GHIRINGHELLI

Membres du Jury :

Dr Jean Luc PERFETTINI	Rapporteur
Pr Jean Marc LOBACCARO	Rapporteur
Pr Bruno CHAUFFERT	Examinateur
Dr David MASSON	Examinateur
Dr Cédric REBE	Co-encadrant

Remerciements

Tout d'abord, je remercie vivement le Professeur François Ghiringhelli. Merci pour ton accueil dans ton équipe en Janvier 2010 au sein de l'unité INSERM U866 de Dijon. Merci pour ta confiance, tes encouragements et ton excellence scientifique pendant ces quatre années. Ton leadership est incontestable, tu sais puiser le meilleur de chacun d'entre nous et créer une émulation au sein d'une équipe qui ne cesse de s'agrandir.

Je remercie le Docteur Cédric Rébé, pour m'avoir formé et enseigné la plupart des techniques de laboratoires depuis mon arrivée au sein de l'équipe. Mille mercis pour ta pédagogie, ta patience, ton investissement et ton aide dans toutes mes démarches. Merci pour ton écoute et tes coups de « boost » dans les moments où j'ai parfois l'impression de perdre pied. Cette page de remerciements est pour moi l'occasion de te présenter avec la plus grande sincérité toute ma gratitude. Ici ou ailleurs, j'espère pouvoir continuer à partager avec toi plus que des discussions scientifiques.

Je présente mes remerciements à l'ensemble des membres du jury, à mes rapporteurs Mrs Jean-Luc Perfettini et Jean-Marc Lobaccaro ainsi qu'à mes examinateurs Mrs Bruno Chauffert et David Masson pour avoir accepté de juger ce travail. En espérant que ce celui-ci ait été en conformité à vos attentes.

Je remercie l'ensemble des membres passés et actuels de l'équipe de François : Angélique pour ta gentillesse et ton soutien sans faille, Fanny et Mélanie, les « expatriées » en post-doc, je pense fort à vous deux et vous souhaite le meilleur !, Hélène et Fred, Grégoire, Lionel, Sylvain pour ta pédagogie, Julie, Alessandra (L'Italia s'è desta !), Magalie, Aurélie F., Romain B., Dominique, Mickaël, Aziz ainsi que les nouveaux doctorants Pierre (notre gourou !), Etienne, Alexia, Marion, Flavie, Aurélie R. Merci à M Martin pour son insatiable curiosité scientifique et ses remarques toujours pertinentes. Un merci particulier à Romain, pour les moments passés à vélo sur les routes de Côte d'Or et de Saône et Loire à discuter de tout et de rien. Bonne continuation à toi pour tes études et tes exploits à vélo, rendez-vous en haut du Ventoux l'année prochaine ! Un merci particulier également à Emeric (Gignac-Deschamps-Wenger) pour les rigolades (mais aussi des discussions

scientifiques !!) dans les transports en commun. Merci à Florence Bouyer pour m'avoir enseigné la pharmacologie tout au long de mes études pharmaceutiques et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche lors de mon passage dans son laboratoire en 2006 ! Merci à tous pour votre bonne humeur quotidienne et pour tous les moments partagés au labo.

Une pensée amicale à l'ensemble du personnel du 3ème étage de l'Unité 866, aux groupes de Carmen, de Laurent et de l'EPHE. Un merci particulier à Guillaume (le triathlète de l'étage !!), Seb pour son aide en microscopie, Arlette pour son aide en cytométrie (et accessoirement en sommellerie et gastronomie !!) et à mes compagnons de promo de M2 : Jean, Pierre-Simon et Aymeric !

Un énorme merci à Christel ! Merci pour ta bonne humeur, pour tout le travail que tu abats quotidiennement et pour ton aide administrative. Sans toi, ce travail n'aurait pût aboutir correctement. Avec en plus l'accent du Sud-Ouest qui nous réchauffe pendant les (trop) longs mois d'hiver !

Merci à mes parents, Max, Amandine, Faustine, et … (réponse en Novembre), Alain et Colette, Isa et Nico, ainsi que l'ensemble de ma famille et de ma belle-famille pour leur soutien incommensurable et inaltérable pendant toutes ces (30… aïe…) années dans mes « entreprises » que ce soit dans les études, la musique et le sport.

Merci à Julie, mon épouse pour me supporter quotidiennement. Merci pour ton soutien dans les moments les plus difficiles, pour ta compréhension et ton amour. A deux c'est toujours plus facile !

« Idéalement, nous sommes ce que nous pensons. Dans la réalité, nous sommes ce que nous accomplissons ». Ayrton Senna

« *…Come on, come live the life you're given* » Sarah Bettens

Résumé

Le cancer du côlon reste un problème majeur de santé publique puisqu'il constitue en France en 2013 le deuxième cancer en termes de mortalité. La chirurgie, la radiothérapie et les traitements par chimiothérapies classiques secondés par les thérapeutiques ciblées ne constituent pas toujours un arsenal efficace mettant ainsi en évidence la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous avons étudié la possibilité soit d'utiliser de nouvelles thérapeutiques (ligands du récepteur *Liver X Receptor* (LXR)), soit d'améliorer les conditions de traitements classiques (chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique (CHIP)) ainsi que le rôle de la caspase-1 dans ces événements.

Nous avons d'abord démontré que les agonistes de LXR, un récepteur nucléaire aux oxystérols, pouvaient activer une mort de type pyroptotique dans les cellules cancéreuses coliques en permettant la construction de l'inflammasome et le clivage de la caspase-1. De plus, nous soulignons le potentiel thérapeutique des agonistes de LXR, puisque nous mettons en évidence une perte de localisation nucléaire du récepteur LXRβ dans les cellules tumorales coliques par rapport aux cellules épithéliales saines qui ne sont pas sensibles à la cytotoxicité des ligands de LXR.

Nous démontrons également que la caspase-1 pourrait aussi avoir un rôle dans un modèle *in vitro* de CHIP lorsque celle-ci associe l'oxaliplatine à l'hypotonie. Cette technique chirurgicale utilisée pour des patients atteints de carcinose péritonéale consiste en l'infusion de chimiothérapie dans la cavité abdominale à 42°C pendant un temps variant généralement de 30 à 60 minutes. Même si cette procédure a permis l'augmentation de la survie chez des patients au pronostic vital sombre, les résultats de notre modélisation *in vitro* montrent que l'efficacité de la CHIP pourrait être améliorée.

Mots clés : cancer colique, LXR, oxystérols, CHIP, pyroptose, caspase-1

Abstract

Colon cancer is a major public health matter because it has reached the second rank of cancer mortality in 2013 in France. Surgery, radiotherapy and standard chemotherapies helped by targeted therapies are not often efficient enough, underlying the need of using new therapies.

Against this background, we have studied the possibilities to use new therapies (Liver X Receptor (LXR) ligands) or to improve classical treatment conditions (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPC)) and the implication of caspase-1.

We have first demonstrated that the nuclear receptor (LXR) agonists can induce pyroptotic cell death of colon cancer cell lines by inflammasome activation and subsequent caspase-1 cleavage. Moreover LXR agonists can act as a targeted therapy because we show that nuclear localization of LXRβ in normal colon cells turns into a cytoplasmic expression in colon tumor cells leading LXRβ ready to induce pyroptosis by its agonists.

We also demonstrated that caspase-1 could have an implication in an in vitro model of HIPC when it associates oxaliplatin and hypotony. This surgery procedure used for patients suffering from peritoneal carcinomatosis involves a 42°C chemotherapy bath inside the abdominal cavity during 30 to 60 minutes. Although HIPC has increased global survival of patients with poor prognosis, the results of our study indicates that HIPC combining oxaliplatin and hypotony could significantly improve the procedure efficacy.

Key words: colorectal cancer, LXR, oxysterols, IHPC, pyroptosis, caspase-1

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES ..... **- 6 -**

TABLE DES FIGURES ..... **- 10 -**

LISTE DES ABREVIATIONS ..... **- 11 -**

AVANT PROPOS ..... **- 13 -**

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE ..... **- 14 -**

I. Le cancer colorectal ..... **- 15 -**

1. Epidemiologie et classifications ..... - 15 -

a. Epidemiologie ..... - 15 -

b. Classifications cliniques ..... - 16 -

c. Classifications moléculaires ..... - 18 -

2. Prise en charge du cancer colorectal ..... - 19 -

a. Chirurgie ..... - 19 -

b. Chimiothérapies ..... - 20 -

3. La chimiothérapie intrapéritonéale : une prise en charge des métastases coliques dans la cavité péritonéale ..... - 22 -

II. Mort cellulaire ..... **- 24 -**

1. Morts cellulaires conventionnelles ..... - 24 -

a. L'apoptose ..... - 24 -

b. Mort cellulaire par autophagie ..... - 28 -

c. La nécrose ..... - 31 -

2. Les morts cellulaire atypiques ..... - 32 -

a. L'anoikis ..... - 32 -

b. La catastrophe mitotique ..... - 33 -

c. L'entose ..... - 33 -

3. Activation de la caspase-1 et pyroptose ..... - 34 -

a- Généralités sur la caspase-1 ..... - 34 -

b- L'inflammasome : plateforme d'activation de la caspase-1 ..... - 34 -

c- Les signaux d'assemblage de l'inflammasome NLRP ..... - 36 -

d. La pyroptose ..... - 38 -

III. Les récépteurs Liver X Receptor (LXRs) ..... - 40 -

1. Aspects généraux des récepteurs LXRs ..... - 40 -

a. Structure, répartition et ligands des LXRs ..... - 40 -

b. Rôles des LXRs dans le métabolisme lipidique ..... - 43 -

2. Mort cellulaire et LXRs ..... - 45 -

3. LXRs, oxystérols et inflammation : rôles controversés ..... - 46 -

4. LXRs en cancérologie ..... - 49 -

a. Cancer de la prostate ..... - 50 -

b. Cancers mammaires ..... - 51 -

c. Cancers coliques ..... - 52 -

d. Autres types de cancers ..... - 52 -

PARTIE EXPERIMENTALE ..... - 56 -

I. ETUDE DES MECANISMES METTANT EN JEU LE RECEPTEUR LXR EN CANCEROLOGIE COLORECTALE ..... - 57 -

1. Article 1 : Liver X Receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells ..... - 57 -

2. Article 2 : La localisation subcellulaire de LXRβ conditionne les phénomènes de mort induite par les agonistes LXR dans le cancer colique humain ..... - 105 -

a. Introduction ..... - 105 -

b. Matériels et Méthodes ..... - 105 -

Cultures cellulaires ..... - 105 -

Marquage AnnexineV/7AAD ..... - 106 -

Immunofluorescence ..... - 106 -

Extraction cytoplasmes - noyaux ..... - 106 -

Tests d'activité de la caspase-1 ..... - 107 -

Test de relargage de l'ATP ..... - 107 -

Immunohistochimie ..... - 107 -

c. Résultats ..... - 108 -

d. Perspectives ..... - 111 -

II. Hypotonie et derives du platine activant la caspase-1, une modelisation *in vitro* de la chimiotherapie intraperitoneale ..... - 114 -

1. Introduction ..... - 114 -

2. Matériels et méthodes ..... - 115 -

a. Culture cellulaire ..... - 115 -

b. Réactifs et traitements ..... - 115 -

c. Tests de viabilité ..... - 115 -

d. Dosage intracellulaire du platine ..... - 115 -

e. Marquage Annexine V / 7AAD ..... - 116 -

f. Tests d'activité de la caspase-1 ..... - 116 -

g. Expérimentation animale ..... - 116 -

h. Récupération et précipitation des surnageants ..... - 116 -

3. Résultats ..... - 117 -

4. Discussion et conclusions ..... - 121 -

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES ..... - 125 -

BIBLIOGRAPHIE ..... - 128 -

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation simplifiée de l'apoptose extrinsèque..... - 26 -

Figure 2 : Représentation simplifiée de l'apoptose intrinsèque..... - 27 -

Figure 3 : Phase terminale de l'autophagie ..... - 29 -

Figure 4 : La nécroptose : une nécrose régulée.. ..... - 32 -

Figure 5 : Représentation schématique simplifiée des différents membres de la famille des NLRs et de leurs sous domaines (d'après Kersse, 2011)..... - 35 -

Figure 6 : Schéma de l'activation de l'inflammasome..... - 37 -

Figure 7 : Tableau récapitulatif des aspects morphologiques et biochimiques principaux des morts cellulaires conventionnelles et de la pyroptose..... - 39 -

Figure 8 : Représentation schématique simplifiée des récepteurs LXRα et β ..... - 41 -

Figure 9 : Récapitulatif non exhaustif des ligands des LXRs..... - 43 -

Figure 10 : Tableau récapitulatif des effets connus des récepteurs LXRs et de leurs agonistes en cancérologie ..... - 54 -

LISTE DES ABREVIATIONS

25OH-Chol : 25 hydroxycholesterol
5-FU : 5 fluorouracile
7AAD : 7-aminoactinomycin D
ABC : ATP binding cassette
AES : Amino Enhancer Split
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AnnV : Annexine V
APAF-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1
ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATG : Autophagy related genes
ATP : Adénosine tri phosphate
BAF : Bafilomycine A
BAK : B-cell lymphoma 2-homologous antagonist/killer
BAX : B-cell lymphoma 2-associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bid : BH3 interacting domain death agonist
BIR : Baculovirus inhibitor repeat
BIT1 : Bcl-2 inhibitor of transcription
BSA : Bovine serum albumin
CARD : Caspase activation and recruitment domain
Casp1 : Caspase-1
CASR : Calcium-sensing receptor
CathB inh : Inhibiteur de la Cathepsine B
CBX : Carbenoxolone
CholT : Toxine cholérique sous unité B
Co : Contrôle
COX : Cyclooxygenase
Ctr1 : Copper transporter
DAMP : Damage associated molecular pattern
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole
DAPK1 : Death-associated protein kinase 1
DCC : Deleted in colon cancer
DISC : Death inducing signaling complex
DMSO : Diméthylsulfoxide
DSS : Dextran Sodium Sulfate
ECM : Extracellular matrix
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
FASL : Fas ligand
Fig : Figure
G2,5% : Glucose 2,5%
G5% : Glucose 5%
HMGB1 : High mobility group box 1
IAP : Inhibitors of apoptosis proteins
ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule
IF : Immunofluorescence
IL : Interleukine
iNOS : indicible nitric-oxide synthase
IP : Immunoprécipitation
kD : Kilodalton
LRR : Leucin rich repeat
LXR : Liver X Receptor
Mb : Membrane
MMP9 : Matrix metalloproteinase 9
MOMP : Mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA : messenger RNA
mTOR : mammalian target of rapamycin
NAC : N-acétyl cysteine
NCDD : Nomenclature Committee on Cell Death
Neg : Negative control
NLR : Nod like receptor
NLS : Nuclear localization signal
oxATP : ATP oxidé
P2X7 : Purinergic receptor 2, ligand-gated ion channel 7
PAMP : Pathogen associated molecular pattern
PANX1 : Pannexine 1
PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS : Phosphate buffered saline
PLA : Proximity ligation assay
PP2A : protéine phosphatase 2 A
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
Prob : Probénécide
PSA : Pénistreptomycine Amphotéricine B
PYD : Pyrin domain
RAR : Retinoic acid receptor

RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire
RIP : Receptor-interacting protein
RNA : Ribonucleic acid
ROCK1 : Rho-associated protein kinase
ROS : Reactive oxygen species
RT : Reverse transport (relative au cholesterol)
RXR: Retinoid X Receptor
SDS : Sodium dodécyl sulfate
siRNA/shRNA : Small interfering RNA / small hairpin RNA
SMAC : Second mitochondria-derived activator of caspases
SVF : Sérum de veau fœtal
SYK : Spleen tyrosine kinase
TLR : Toll like receptor
TNFR : Tumor necrosis factor receptor
TNFα : Tumor necrosis factor α
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
VCAM : Vascular cell adhesion molecule
VDAC : Voltage-dependent anion channel

AVANT PROPOS

La pathologie cancéreuse représente un problème majeur de santé publique dans les pays développés par le nombre de décès qu'elle cause chaque année et par le coût induit par la prise en charge globale des malades.

Les drogues de chimiothérapie ont une place importante dans l'arsenal thérapeutique aux côtés de la chirurgie et de la radiothérapie. Les cellules cancéreuses échappent malheureusement aux effets cytotoxiques des médicaments de chimiothérapies par divers mécanismes de résistance. L'enjeu des dernières années en termes de recherche a donc été de trouver de nouvelles molécules, ou de nouvelles cibles thérapeutiques pour augmenter la survie ou même obtenir la rémission des malades. Ainsi, l'émergence des thérapeutiques ciblées et la compréhension de leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire ont permis d'améliorer la prise en charge des patients mais restent encore insuffisantes.

Le travail effectué au sein de l'équipe de François Ghiringhelli s'inscrit également dans la recherche de nouvelles molécules cytotoxiques par la compréhension de mécanismes cellulaires et biomoléculaires et par la description de morts cellulaires atypiques impliquant l'activation de la caspase-1. Nous montrons ainsi que :

- L'activation du récepteur nucléaire LXRβ peut entrainer de manière spécifique la mort de type pyroptotique des cellules cancéreuses coliques par un effet non transcriptionnel ;

- L'hypotonie permet d'augmenter la toxicité des sels de platine dans une modélisation de chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale par activation de la caspase-1.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CANCER COLORECTAL

1. Epidemiologie et classifications

a. Epidemiologie

En 2012, le cancer colorectal était le troisième cancer en termes d'incidence avec 42000 cas derrière le cancer de la prostate et le cancer du sein. Il touche en proportion assez similaire les sujets masculins et féminins avec 23000 nouveaux cas par an pour les hommes (constituant le troisième cancer le plus fréquent) et 19000 nouveaux cas par an pour les femmes (constituant le deuxième cancer le plus fréquent). Les personnes âgées de 50 ans et plus représentent près de 95% des nouveaux cas de cancer colorectal estimés en 2012 (49% pour les personnes âgées entre 50 et 74 ans). Alors que les taux d'incidence augmentent régulièrement avec l'âge, de manière similaire pour les deux sexes, une augmentation plus rapide est observée chez l'homme au-delà de 50 ans. Ainsi il passe de 99,1 pour 100 000 hommes chez les 50-64 ans à 262,8 chez les 65-74 ans, contre 66,4 et 145,5 pour 100 000 respectivement, chez la femme.

Chez l'homme, les taux régionaux d'incidence standardisés à la population mondiale estimés en 2010 varient entre 32,1 (Corse) et 41,7 (Pays de la Loire) pour 100 000 hommes. La moitié des régions présente un taux d'incidence standardisé inférieur à la moyenne nationale de 38,8 pour 100 000. Les régions à fort taux d'incidence sont le Pays de la Loire, le Nord-Pas-de-Calais, la Haute-Normandie, la Bretagne et le Poitou-Charentes. À l'opposé, celles ayant les plus faibles incidences sont la Corse, la Basse-Normandie, l'Île-de-France et le Midi-Pyrénées. Chez la femme, les taux régionaux d'incidence standardisés à la population mondiale estimés en 2010 varient entre 20,8 (Basse-Normandie) et 25,4 (Haute-Normandie) pour 100 000 femmes. La Haute-Normandie, la Picardie, Le Nord-Pas-de-Calais et l'Aquitaine et la région PACA s'opposent aux régions de la Basse-Normandie, de l'Alsace et de l'Auvergne. La Bourgogne apparait comme une région assez fortement touchée par le cancer colorectal uniquement chez les femmes puisque son taux d'incidence standardisé est supérieur à la moyenne nationale.

Le cancer colorectal reste un cancer dévastateur puisqu'il est le deuxième cancer en termes de mortalité chez l'homme avec 9300 décès (loin derrière le cancer du poumon) comme chez la femme avec 8500 décès (derrière le cancer du sein) en 2012. La répartition de la mortalité en fonction de l'âge est similaire à celle de l'incidence. Alors que les taux spécifiques de mortalité par cancer colorectal augmentent régulièrement avec l'âge, et sont similaires pour les deux sexes jusqu'à 50 ans, une augmentation plus rapide est observée chez l'homme au-delà de 50 ans. Ainsi ils passent de 26,7 pour 100 000 hommes chez les 50-64 ans à 83 chez les 65-74 ans. Pour les mêmes tranches d'âge, ces taux sont respectivement de 17,6 et 43,3 pour 100 000 chez la femme (l'ensemble des données épidémiologiques est issu du rapport « *Les cancers en France en 2013* » de l'Institut National du Cancer)

b. Classifications cliniques

Plusieurs classifications ont été utilisées par le passé à savoir la classification de Dukes et la classification d'Astler-Coller. A ce jour, la classification TNM, une troisième classification éditée par l'*Union for International Cancer Control* (UICC) et préconisée par la société nationale française de gastroentérologie depuis 2010 est utilisée par les cliniciens et les anatomopathologistes afin de standardiser et limiter les risques de confusions créées par les deux autres classifications. En outre, sa qualité de définition permet une précision beaucoup plus fine et une meilleure discrimination des différents stades de la tumeur tout en restant concis.

Les trois lettres, définissent comme suit :

T : définit le site de la tumeur primaire et sa profondeur tissulaire, dans le cas du côlon, on a :

Tis : tumeur in-situ localisée en intra-épithéliale ou intra-muqueuse

T1 : envahissement de la sous-muqueuse

T2 : envahissement de la musculeuse

T3 : envahissement de la sous-séreuse

T4a : pénétration du péritoine viscéral

T4b : envahissement d'un organe avoisinant

N : définit le nombre de ganglions envahis par des métastases, avec :

N0 : absence de métastase ganglionnaire

N1a : un ganglion envahi

N1b : 2 à 3 ganglions envahis

N2a : 4 à 6 ganglions envahis

N2b : à partir de 7 ganglions envahis

M : définit la présence de métastases connues quel qu'en soit leur siège, avec :

M0 : absence de métastase

M1a : présence de métastases touchant un organe à distance

M1b : présence de métastases dans plusieurs organes à distance ou atteinte péritonéale

En découle une classification de stade qui sera utilisée pour déterminer la prise en charge :

Stade 0 : Tis, N0, M0

Stade I : T1-2, N0, M0

Stade IIa: T3, N0, M0

Stade IIb: T4a, N0, M0

Stade IIc: T4b, N0, M0

Stade IIIa: T1-2, N1, M0 ; T1, N2a,M0

Stade IIIb: T3-T4a, N1, M0 ; T2-T3, N2a, M0 ; T1-T2, N2b, M0

Stade IIIc: T4a, N2a, M0 ; T3-4, N2b, M0 ; T4b, N1-2, M0

Stade IVa: Tout T, tout N, M1a

Stade IVb: Tout T, tout N, M1b

c. Classifications moléculaires

Depuis une vingtaine d'années, un effort de classification moléculaire des cancers colorectaux a été effectué afin de pouvoir déterminer un pronostique quant à la survie des patients et/ou à l'efficacité des chimiothérapies et ainsi garantir une meilleure prise en charge des patients.

Deux grandes voies de carcinogénèse se distinguent : l'instabilité chromosomique avec stabilité microsatellitaire (MSS) associant la perte d'hétérozygotie (LOH pour *Loss Of Heterozygosity*) du locus du chromosome 18q21, et l'instabilité microsatellitaire (MSI) associant une déficience ou une inactivation des gènes du *Mismatch Repair* (MMR) codant pour la réparation de l'ADN (Lenz, 2007).

La voie MSS est retrouvée principalement dans les cancers colorectaux sporadiques. La perte du locus 18q21 est ainsi nettement délétère chez les patients atteints de cancers colorectaux de stade 2 puisque la survie globale à 5 ans pour ces patients est de 54% contre 93% pour les patients sans perte allélique. Pour ces patients, la survie est finalement comparable à celle de patients atteints de cancers de stade 3 suggérant qu'une chimiothérapie aurait alors pu être envisageable (Jen et al., 1994).

La voie MSI est majoritairement impliquée dans les formes familiales comme la maladie de Lynch, sans pour autant exclure les formes sporadiques de cancers colorectaux. Dans ce cas, l'expression de protéines comme MLH1, MSH2 ou MSH6 du système MMR est diminuée. Le statut MSI+ est généralement associé avec un meilleur pronostique clinique mais aussi avec une plus grande résistance vis-à-vis des traitements de chimiothérapies (Popat et al., 2005).

D'autres mutations peuvent également avoir un intérêt notamment en situation métastatique. Le statut KRAS est ainsi recherché et apparait comme un facteur prédictif de réponse aux anti-EGF lorsque KRAS n'est pas muté (Lievre et al., 2006). Le statut BRAF mutant, quant à lui, est également étudié et apparait comme un marqueur pronostique négatif quant à la survie des patients (Tran et al., 2011).

2. Prise en charge du cancer colorectal

L'extension locale et métastatique conditionne le traitement et la résécabilité de la tumeur:

En l'absence de métastase, on réalise une résection première sauf s'il existe un envahissement postérieur empêchant une résection en bloc de type R0 (résection totale) du cancer et des organes et structures envahies ; un traitement préopératoire peut dans ce cas être discuté pour rendre résécable cette lésion.

Si le site métastatique est non résécable, il n'y a pas d'indication formelle au traitement initial du cancer primitif sauf si la tumeur est hémorragique, s'il existe un syndrome occlusif ou une perforation. Une chimiothérapie première est alors discutée. Si le site métastatique est résécable, une résection de la tumeur primitive et des métastases est réalisée en un ou deux temps en fonction des symptômes et des localisations avec chimiothérapie entre les deux temps selon extension.

a. Chirurgie

Il s'agit de l'exérèse du cancer avec une marge distale et proximale d'au minimum 5 cm (sur pièce fraiche), une exérèse en bloc du mésocôlon attenant avec repérage du pédicule vasculaire (pour les tumeurs de la charnière recto-sigmoïdienne il faut enlever 5 cm de mésorectum sous le pôle inférieur de la tumeur). La résection per coelioscopique est recommandée. En cas de suspicion de tumeur infiltrant les tissus adjacents, l'exérèse chirurgicale doit être monobloc, enlevant la tumeur et son extension locale. Un traitement néoadjuvant par chimiothérapie peut se discuter avec l'avis d'experts pluridisciplinaires.

En cas de découverte peropératoire d'une tumeur de la charnière rectosigmoïdienne infiltrant au niveau vésical ou utérin, il est possible de réaliser une stomie d'amont avant de débuter une radiochimiothérapie puis une nouvelle intervention à visée d'exérèse. En cas de doute sur l'existence de métastases hépatiques, une échographie peropératoire est recommandée.

En fonction des régions atteintes, les exérèses suivantes sont réalisées :

-côlon droit : hémicolectomie droite avec anastomose iléo-transverse

-sigmoïde et côlon gauche : colectomie segmentaire ou hémi-colectomie gauche et anastomose colorectale

- jonction recto-sigmoïdienne : résection recto-sigmoïdienne avec anastomose colorectale.

La résection endoscopique d'un cancer *in situ* ou intra muqueux peut être un traitement adéquat notamment pour les lésions avec foyers de carcinomes sous muqueux. La résection endoscopique est considérée comme suffisante uniquement en cas d'envahissement sous muqueux superficiel et si la pièce de polypectomie présente l'ensemble des critères de sécurité (limite de résection saine, absence de foyer de carcinome indifférencié, absence d'emboles vasculaires ou lymphatiques et marge de sécurité supérieure à 1mm).

b. Chimiothérapies

Cas du cancer du côlon localisé :

Elle s'appuie sur de grands essais randomisés menés dans les années 1980 comparant l'association de 5-fluorouracile (5-FU) à une chirurgie seule pour des cancers de stade III qui ont montré une réduction de la mortalité de 30% et un gain en survie de 10% à 5 ans. Les résultats sont plus modestes pour les stades II (2 à 5% de bénéfice selon le risque de récidive) (Gray et al., 2007).

Aujourd'hui la chimiothérapie adjuvante est donc indiquée dans les stades III et se discute avec le patient et en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) pour les stades II selon le risque de récidive (Benson et al., 2004)

-risque faible ou modéré de récidive : T3, plus de 12 ganglions analysés, absence d'emboles veineux et/ou lymphatiques, pas d'engainements périnerveux, tumeur bien ou moyennement différenciée, absence de perforation ou d'occlusion.

-risque élevé : T4, moins de 12 ganglions analysés, présence d'emboles veineux et/ou lymphatiques, présence d'engainements périnerveux, tumeur peu différenciée révélée par une occlusion ou une perforation.

Les principaux régimes de chimiothérapie validés sont soit une monothérapie par 5-FU soit une association 5-FU et oxaliplatine (Haller et al., 2011). Ce traitement doit être débuté dans les 8 semaines qui suivent la chirurgie et s'étale sur une durée de 6 mois.

Cancer du rectum localisé:

Actuellement, malgré la diminution du risque de récidive locale, le risque de récidive métastatique après exérèse d'un cancer du rectum reste de l'ordre de 20 à 60 % selon le stade TNM initial. Contrairement au cancer du côlon, il n'existe pas de preuve formelle quant à l'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante dans le cancer du rectum.

Il existe des arguments dans la littérature en faveur de la chimiothérapie adjuvante par fluoropyrimidines mais, en raison de l'hétérogénéité des patients inclus, de la chirurgie réalisée et des chimiothérapies utilisées, toute conclusion avec des preuves suffisantes est impossible. Ce bénéfice semble toutefois similaire à ce qui est observé dans le cancer du côlon (Bachet et al., 2010).

La topographie rectale doit également être prise en considération dans l'indication d'une chimiothérapie adjuvante. En effet le risque de rechute locale pour les tumeurs du haut rectum est faible et leur pronostic est identique à celui du cancer du côlon. En revanche, pour les cancers du moyen et du bas rectum, l'indication d'une chimiothérapie adjuvante ou d'une simple surveillance dans les stades II ou III se discute en RCP en fonction de l'existence de facteurs de risque.

Par analogie au cancer du côlon, la chimiothérapie dure environ 6 mois et doit débuter dans les 6 à 8 semaines suivant la chirurgie. Les protocoles FOLFOX4 simplifié, XELOX, LV5FU2 et fluoropyrimidines orales sont des options.

Cancers colorectaux métastatiques

En cas de métastases synchrones à priori résécables, la chirurgie s'encadre d'une chimiothérapie dite péri-opératoire dont le but est non seulement de faciliter le geste chirurgical mais aussi de tester la chimiosensibilité de la maladie en écartant ainsi les maladies rapidement évolutives sous chimiothérapie. Plusieurs associations de chimiothérapies ont été testées et ont montré un bénéfice en survie (globale et/ou sans progression) et le FOLFOX est le protocole recommandé. En cas de métastases non résécables, le traitement repose alors exclusivement sur la chimiothérapie dans le but de maintenir la qualité de vie et d'allonger la survie du patient. Il existe plusieurs protocoles de chimiothérapie qui reposent principalement sur le 5-FU, l'oxaliplatine et l'irinotécan auxquels s'ajoutent les thérapeutiques ciblées comme les anti-EGFR et le bévacizumab (Hochster et al., 2008). De multiples combinaisons de ces agents sont possibles et leur choix dépend du caractère agressif de la maladie, de l'existence d'anomalies génétiques, de l'état général du patient et de ses souhaits. Chez un patient en bon état général, non symptomatique, présentant une maladie peu évolutive, une mono-chimiothérapie est initiée et une escalade thérapeutique est ensuite proposée en cas d'évolutivité de la maladie (Ducreux et al., 2011).

3. La chimiothérapie intrapéritonéale : une prise en charge des métastases coliques dans la cavité péritonéale

La carcinose péritonéale est définie par l'envahissement de cellules tumorales dans la cavité péritonéale. Elle résulte de l'implantation de métastases principalement d'origine ovarienne ou gastro-intestinale et est associée à un mauvais facteur pronostic avec une médiane de survie inférieure à 6 mois pour les carcinoses d'origine non-ovarienne (Sadeghi et al., 2000). Dans le cas des carcinoses d'origine colique, l'envahissement tumoral peut se faire accidentellement par une rupture de la paroi intestinale lors d'une chirurgie ou par dissémination passive au travers de la séreuse (Ceelen and Bracke, 2009). Les cellules adhèrent par la suite à la matrice extracellulaire au sein du péritoine par l'intermédiaire de protéines de la famille des intégrines (Burleson et al., 2004) et dans une moindre mesure à la surface des cellules mésothéliales grâce aux molécules d'adhésion cellulaire comme ICAM-1 et/ou VCAM-1 dont l'expression est augmentée en cas de stress ou de lésions

(Alkhamesi et al., 2005). Les cellules mésothéliales peuvent cependant apparaitre comme une barrière à l'adhésion en masquant partiellement le collagène de type I de la matrice extracellulaire, partenaire préférentiel des intégrines et donc de l'attachement des cellules (Kawamura et al., 2001).

Les patients atteints de carcinose péritonéale présentent généralement un bilan d'extension métastatique touchant plusieurs organes. De ce fait, le traitement reposait sur des chimiothérapies par voie générale mais les concentrations atteignant la cavité abdominale n'étaient pas suffisantes (Otto, 1995). La chimiothérapie intrapéritonéale fut donc proposée pour augmenter les concentrations de drogues anticancéreuses *in situ* et épargner les tissus sains périphériques. L'addition d'une chimiothérapie locorégionale a montré un effet bénéfique sur le contrôle de la maladie et la survie des patients présentant une masse tumorale inférieure à 1 ou 0.5 cm de diamètre selon les études. (Lu et al., 2010). Ainsi, classiquement, la technique de chimiothérapie péritonéale commence d'abord par une cytoréduction chirurgicale macroscopiquement complète. S'en suit une procédure de bain de chimiothérapie dont de nombreux paramètres, pourtant essentiels sont peu standardisés à savoir : la drogue utilisée, la température, la pression, le temps d'exposition à la drogue, chirurgie ouverte avec un opérateur homogénéisant le bain (technique dite « du colisée ») ou en procédure fermée, l'homogénéisation se faisant de manière contrôlée par l'inclinaison de la table chirurgicale limitant l'exposition du personnel soignant aux médicaments de chimiothérapie.

II. MORT CELLULAIRE

Les cellules normales et tumorales, sous l'action de contraintes physiques (température, taux d'oxygène ou de dioxyde de carbone par exemple), chimiques (drogues de chimiothérapie, modifications électrolytiques du milieu environnant par exemple), ou durant leur développement sont amenées à mourir. Cependant la mort cellulaire ne peut être cantonnée qu'à une étape de la vie de la cellule et sa manière de mourir pourra conditionner le sort des cellules voisines. Au fur et à mesure des progrès scientifiques, les biologistes ont pu définir une nomenclature des différentes morts cellulaires basée sur les changements morphologiques, biochimiques et les conséquences observées lors de la mort cellulaire. Ainsi, l'apoptose était classiquement appelée « mort cellulaire programmée » soulignant son importance lors du développement et l'embryogénèse. Aujourd'hui ce terme est devenu impropre puisque les recherches ont pu démontrer que les cellules mourantes lors du développement partageaient des caractéristiques apoptotiques et non-apoptotiques (Baehrecke, 2002) et que les autres types de mort cellulaires pouvaient être également finement régulés (Festjens et al., 2006).

Le *Nomenclature Comitee on Cell Death* (ou NCDD) passe en revue régulièrement les dernières avancées sur les différents types de mort cellulaire dans le but de les clarifier, de les classifier et d'homogénéiser la littérature scientifique (Galluzzi et al., 2012; Kroemer et al., 2009)

1. Morts cellulaires conventionnelles

a. L'apoptose

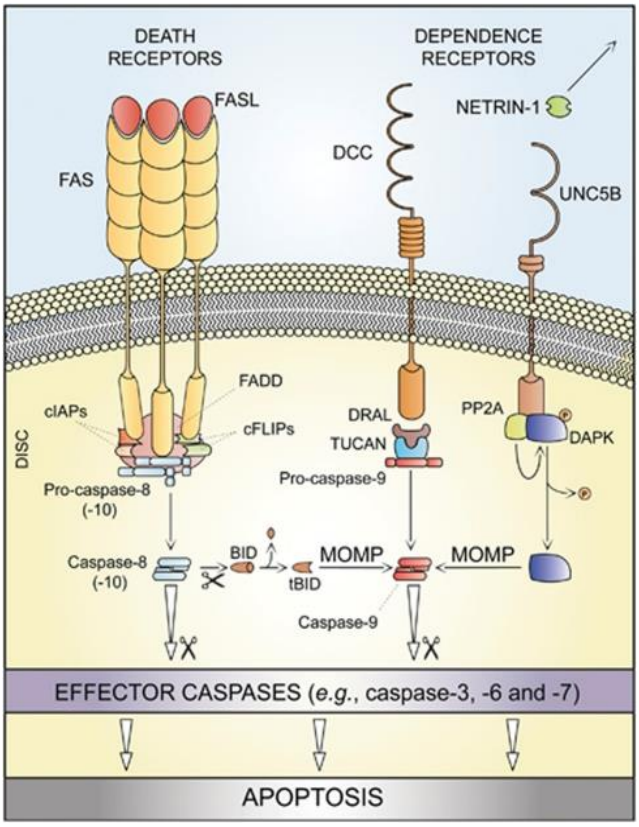
Le terme apoptose a été défini en 1972 par John F. Kerr (Kerr et al., 1972). Il décrit pour la première fois des cellules rondes anormales chez l'humain et le rat dans plusieurs organes (utérus, prostate, côlon) dans des conditions de développement normal ou de stress provoqué. Il mentionne également la présence de corps apoptotiques, c'est-à-dire des fragments cellulaires plus ou moins ovoïdes, denses contenant parfois des restes de noyau. Depuis la publication de ces travaux, les mécanismes provoquant l'apoptose et la compréhension de ce phénomène ont été l'enjeu de nombreux travaux scientifiques tant en recherche fondamentale et clinique. Il apparaît ainsi que l'activation par le clivage protéolytique des caspases

(cysteinyl-aspartate-cleaving proteases) constitue un rôle essentiel dans la mise en place de ce processus.

De manière générale et simplifiée, on distingue :

L'apoptose extrinsèque qui désigne la mort induite par des signaux extracellulaires exerçants leurs activités par des récepteurs transmembranaires spécifiques (Figure 1). Elle peut être initiée par la fixation de ligands comme le FAS ligand (ou FASL ou encore CD95L), la superfamille des ligands du *Tumor Necrosis Factor* (ou TNF) comprenant le TNFα ou encore le *TNF-related apoptosis inducing factor* (mieux connu sous l'acronyme TRAIL) qui se fixent sur leur récepteur respectif FAS, TNFR1, TRAILR1-2 (Wajant, 2002). Les « récepteurs à la dépendance », comme le récepteur à la nétrine peuvent également induire une apoptose extrinsèque lorsque la concentration des ligands passe en dessous d'un seuil critique (Mehlen and Bredesen, 2011). L'activation des récepteurs FAS, TNFR ou TRAIL conduit généralement à la formation d'un complexe supramoléculaire nommé « *Death Inducing Signaling Complex* » (ou DISC). La partie « *Death Domain* » (ou DD) intracellulaire de ces récepteurs recrute ainsi des protéines comme RIPK1 (ou RIP1), « *Fas Associated protein with a Death Domain* », diverses isoformes de cFLIP aux propriétés pro ou antiapoptotiques, mais aussi des protéines antiapoptotiques de la famille des IAPs. La construction du DISC entraine l'activation par clivage enzymatique de la caspase-8 (Stupack, 2013). La caspase-8 peut en retour directement cliver la caspase-3, l'effecteur classique de l'apoptose (cellules dites de type I). Dans d'autres cas (cellules dites de type II), la caspase-8 active le clivage du *BH3-interacting domain* (ou BID) entrainant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, le relargage de son contenu (notamment le cytochrome c) et l'assemblage, via la protéine APAF-1, de l'apoptosome, un autre complexe supramoléculaire ayant pour rôle de cliver la caspase-9. Une fois activée, la caspase- 9 peut à son tour activer la caspase-3 pour induire l'apoptose (Barnhart et al., 2003). Les récepteurs à la dépendance, comme UNC5B, DCC (*Deleted in Colon Cancer*) et le *Patch Receptor*, activent également l'apoptose via des adaptateurs cytoplasmiques (Bialik and Kimchi, 2006; Guenebeaud et al., 2010). Dans les cas de DCC et du *Patched Receptor*, en l'absence de ligand, les récepteurs interagissent avec DRAL qui recrute alors la protéine TUCAN ou encore NLRP1 qui clive en retour

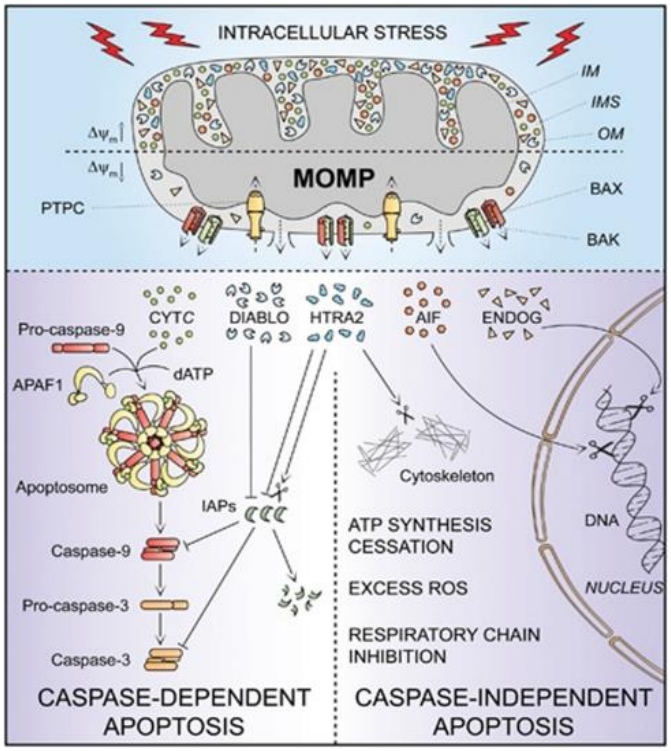
la procaspase-9. Pour UNC5B, l'absence de nétrine-1, son ligand, provoque l'assemblage d'un complexe comprenant la protéine phosphatase 2 A (PP2A) et la protéine *Death Associated Protein Kinase 1* (DAPK-1). Cette interaction conduit à déphosphorylation de DAPK-1 révélant ainsi son activité proapototique par activation de la caspase-9.



<u>Figure 1 :</u> Représentation simplifiée de l'apoptose extrinsèque. Activée par les récepteurs de la famille du TNF elle conduit au clivage de la caspase-8 puis des caspases effectrices avec perméabilisation de la membrane mitochondriale pour les cellules de type II, ou sans, pour les cellules de type I. Activée par les récepteurs à la dépendance, en l'absence de leurs ligands, elle conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et au clivage de la caspase-9 puis des caspases effectrices (d'après Galluzzi et al 2012).

L'apoptose intrinsèque est déclenchée par des facteurs de stress intracellulaires (Figure 2) assez hétérogènes comme les dommages à l'ADN, l'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium, l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique par exemple. Ces signaux activent des voies intracellulaires différentes mais toutes convergent vers la mitochondrie et à sa

perméabilisation majoritairement régulée par les protéines Bak et Bax appartenant toutes les deux à la famille de Bcl-2 et les récepteurs VDAC. La perméabilisation de la membrane mitochondriale a de multiples effets délétères pour la cellule : l'inhibition de la production d'ATP, le relargage de protéines toxiques comme le cytochrome c, AIF, SMAC, HTRA2, l'endonucléase G (ENDOG) et le blocage des chaines respiratoires conduisant à l'accumulation d'espèces radicalaires de l'oxygène (ou *reactive oxygen species* ou ROS). Comme décrit plus haut le cytochrome c participe à l'assemblage de l'apoptosome, tandis que AIF et l'ENDOG migrent dans le noyau pour fragmenter l'ADN de manière indépendante des caspases (Joza et al., 2001). SMAC et HTRA2 quant à eux vont inhiber les molécules IAPs aux propriétés antiapoptotiques agissant finalement comme des catalyseurs en favorisant l'activation des caspases effectrices (Chai et al., 2000).

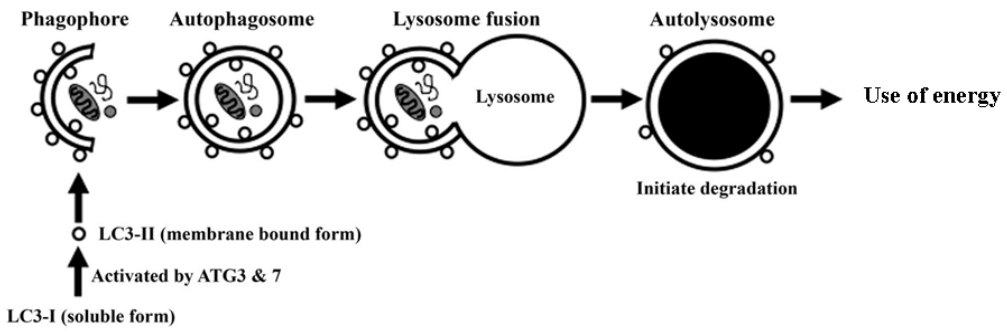


<u>Figure 2 :</u> Représentation simplifiée de l'apoptose intrinsèque : induite par de multiples stress intracellulaires, la perméabilisation mitochondriale provoque le relargage de médiateurs proapototiques comme le cytochrome c, DIABLO ou HTRA2 menant à la formation de l'apoptosome et au clivage de la caspase-9 puis de la caspase-3. L'apoptose intrinsèque peut aussi être indépendante des caspases notamment par l'intermédiaire d'AIF et de l'ENDOG qui en étant adressés au noyau conduisent au clivage de l'ADN (d'après Galluzzi et al 2012).

b. Mort cellulaire par autophagie

L'autophagie a d'abord été décrite morphologiquement par une vacuolisation importante du cytoplasme en y associant l'idée de mort cellulaire, sans en avoir réellement la preuve fonctionnelle, en pensant que ce processus engendrerait inéluctablement la mort de la cellule. Le terme de « mort autophagique » ou mort de « type II » avait alors été définit. L'autophagie a été mise en évidence dans deux contextes bien distincts et différents : le développement de la drosophile (Denton et al., 2009) et la mort cellulaire des cellules cancéreuses en réponse aux agents de chimiothérapie et en l'absence de modulateurs de l'apoptose comme les caspases ou BAX (Shimizu et al., 2004).

Chez les mammifères, l'autophagie est régulée par la protéine kinase *mammalian target of rapamycin* (ou mTOR). En présence de nutriments (glucose, facteurs de croissance…) mTOR est activée au sein du complex mTORC1 et favorise les voies de survies comme AKT et la phosphorylation de la protéine ATG13 (*autophagy related genes 13*). En situation de privation nutritive ou d'inhibition pharmacologique de mTOR, par la rapamycine par exemple, ATG13 devient hypophosphorylé et peut alors recruter ATG1 (ou ULK1) et initier l'autophagie (Maiuri et al., 2007). La formation de l'autophagosome, vésicule de l'autophagie comprenant des organelles et des fragments de cytoplasme, repose également sur la formation du complexe composé notamment de beclin1 et de VPS34 phosphorylé. ATG8 (ou LC3) est activé successivement par ATG4 (menant à LC3 I), puis par ATG3 et ATG7 pour donner la forme couplée à la phosphatidyléthanolamine (LC3 II). La translocation de LC3 II à la membrane de l'autophagosome est d'ailleurs la technique la plus utilisée pour caractériser l'autophagie (Mathew et al., 2007). LC3 II intervient alors dans l'élongation et la maturation de l'autophagosome en se liant aux phosphatydilinositols de la membrane de la vésicule et à p62 pour faciliter la fermeture de l'autophagosome (Pankiv et al., 2007). L'autophagosome mature peut alors fusionner avec le lysosome pour former un autolysosome et subit l'action des hydrolases lysosomales (Maiuri et al., 2007) (Figure 3).



<u>Figure 3 :</u> Phase terminale de l'autophagie : après activation par ATG4, LC3 I est pris en charge par ATG3 et ATG 7 pour être flanqué d'un résidu éthanolamine et interagir avec la double membrane du phagophore. En recrutant des protéines cytoplasmiques comme p62, l'autophagosome est formé et fusionne avec le lysosome pour donner naissance à l'autolysosome. La digestion de son contenu peut être une source énergétique notamment pour la cellule tumorale (d'après Lai, JC pathol, 2014).

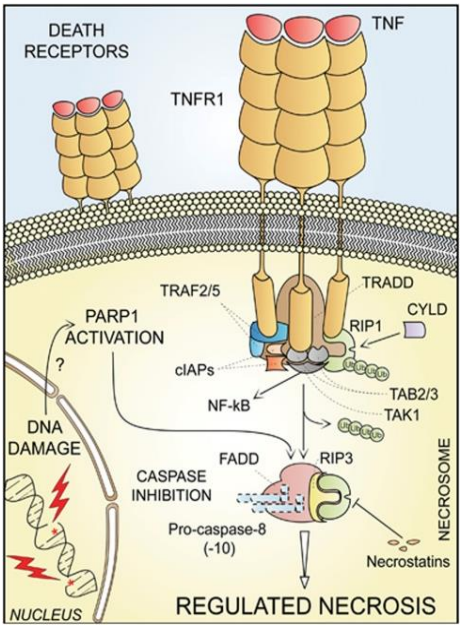
Dans un contexte de cancer et notamment de cancer colique, l'autophagie peut apparaître comme une source énergétique pour la cellule tumorale. La digestion de ses organelles assure alors le métabolisme cellulaire nécessaire à la prolifération et pallie ainsi au possible manque nutritif de l'apport sanguin. Dans ce sens, les cellules tumorales coliques présentent souvent un marquage LC3 positif fort et spécifique comparées aux cellules de la muqueuse saine adjacente. Cela est renforcé lorsque la tumeur possède un environnement vasculaire inadéquat quant à sa prolifération (Sato et al., 2007). Plus récemment, le marquage LC3 s'est révélé comme un marqueur pronostic en fonction de sa localisation subcellulaire dans le cancer colorectal avancé (Stade IIA à III) (Giatromanolaki et al., 2010). Enfin l'activation de l'autophagie a des effets controversés quant à l'efficacité des chimiothérapies. La stratégie de SiRNA visant ATG5 et Beclin1 potentialise l'effet de l'oxaliplatine dans la lignée Caco-2 (Shi et al., 2012), la chloroquine, inhibiteur de l'acidification du lysosome, bloque la résistance au 5-FU induite par l'autophagie dans les cellules colon26 (Sasaki et al., 2012). L'utilisation de l'hydrochloroquine, inhibiteur de l'acidification du lysosome, a fait l'objet de plusieurs études cliniques en association avec des thérapeutiques ciblées, dans plusieurs modèles de cancer humain (Amaravadi et al., 2011). Toutefois, d'autres études montrent que l'induction de l'autophagie peut être bénéfique dans la mort ou l'arrêt de prolifération des cellules tumorales. Cette activation peut être médiée par des composés naturels comme le

resveratrol (Miki et al., 2012), ou des composés synthétiques comme l'AZD-2014 (Huo et al., 2014).

Néanmoins, si les caractéristiques à proprement parlé de l'autophagie font consensus (vacuolisation, fusion du lysosome et de l'autophagosome par exemple) la place de celle-ci en tant que mort cellulaire à part entière reste encore aujourd'hui très discutée. Il est ainsi démontré que l'autophagie permet la résistance, la différentiation et la survie des cellules (Mizushima and Levine, 2010). Si les cellules cancéreuses HeLa sont cultivées en conditions de restrictions nutritives et qu'en plus l'autophagie est inhibée par siRNA ou shRNA visant ATG5, la mort de type apoptose est alors déclenchée (Boya et al., 2005). De plus, l'inhibition de la fusion du lysosome et de l'autophagosome conduit également à une mort de type apoptotique des cellules HeLa malgré l'accumulation de vacuoles autophagiques (Gonzalez-Polo et al., 2005). Plus récemment, un screening de 1400 molécules a permis de démontrer que les molécules entrainant une mort autophagique conduisait également les cellules vers l'apoptose lorsque l'autophagie était inhibé dans la lignée d'ostéosarcome U2OS (Shen et al., 2011). Cependant, de nombreuses études montrent que l'autophagie est nécessaire pour entrainer la mort dans plusieurs modèles. Ainsi, l'inhibition de Beclin-1 restaure la clonogénicité des cellules ovariennes HOSE surexprimant l'oncogène RAS (Elgendy et al., 2011). De plus, le trioxyde d'arsenic utilisé en hématologie est capable d'induire l'autophagie des cellules U937 et KT1. L'inhibition de Beclin-1 ou d'ATG7 dans ces modèles permet la survie cellulaire mettant en évidence un rôle prédominant de l'autophagie dans la mort induite par le trioxyde d'arsenic (Goussetis et al., 2010). Enfin, le gossypol, un BH3 mimétique possède la capacité d'induire l'autophagie et la mort cellulaire de plusieurs lignées cellulaires de glioblastome. Sous l'effet de l'inhibition de Beclin-1 et d'ATG5, la mort de ces lignées est diminuée (Voss et al., 2010). A ce jour, la mort autophagique est donc controversée puisqu'elle partage des caractéristiques propres à l'autophagie mais également de l'apoptose. La question au centre du débat est : « est ce que les cellules meurent *par* autophagie ou *accompagnées* par l'autophagie ? » (Shen et al., 2012).

c. La nécrose

Pendant de nombreuses années, la nécrose a été mise de côté par le monde scientifique et était définie comme un phénomème peu régulé ne possédant pas de caractéristiques apoptotiques ou autophagiques. D'un point de vue morphologique, la nécrose se caractérise par une augmentation du volume intracellulaire, le gonflement des organelles, la rupture de la membrane plasmique et la perte du contenu intracellulaire (Galluzzi et al., 2007). Depuis une dizaine d'années, les travaux de plusieurs équipes ont permis de décrire et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la nécrose. Le terme de nécroptose est d'ailleurs largement retrouvé dans la littérature pour définir la nécrose régulée. Ainsi, les dommages à l'ADN (alkylations), l'activation des récepteurs de mort (FAS, TNFR, TRAILR…) ou des *Toll Like Receptors* (TLR3 et TLR4) peuvent conduire à la nécrose, notamment en présence d'inhibiteurs pharmacologiques des caspases (la caspase-8 est la plus étudiée dans ce contexte) comme le z-VAD par exemple, ou par diminution de leur expression (souris KO ou interférence à l'ARN). L'activation de TNFR1 mène habituellement au recrutement intracellulaire de RIP1 et à son ubiquitination par les protéines de la famille de cIAP. Les voies de survie cellulaire sont alors engagées par TAK1, TAB2 et TAB3, appelé complexe de type I, menant à l'activation nucléaire de NF-kB. Dans le cas où la caspase-8 est inhibée, en parallèle avec l'action de désubiquitinase comme la cylindromatose (O'Donnell et al., 2011), RIP1 perd sa fonction de survie cellulaire activatrice de NF-kB. RIP1 recrute alors TRADD, FADD, et RIP3 pour former un complexe de type II et engager le nécrosome (Figure 4). L'intéraction RIP1/RIP3 est effectuée grâce au domain RHIM des deux protéines. Placée en aval du nécrosome, RIP3 se lie à la protéine MLKL, la phosphoryle et la necroptose est alors déclenchée (Sun et al., 2012). Cette nécrose dépendante de RIP1 est spécifique puisque la nécrostatine, un inhibiteur de RIP1 peut la bloquer. Cependant, il a également été démontré que le cytomégalovirus pouvait induire la nécrose avec un mécanisme propre à RIP3 et indépendant de RIP1 car la nécrostatine n'avait pas d'effet d'inhibition (Upton et al., 2010).



<u>Figure 4 :</u> La nécroptose : une nécrose régulée. La stimulation du TNFR1 peut entrainer le recrutement intracellulaire de TRADD, TRAFs, cIAP et RIP1. Dans ce cas RIP1 est polyubiquitiné par cIAP menant au recrutement des TABs et TAK, à l'activation nucléaire de NF-kB et la survie cellulaire. Dans des conditions d'inhibition de la caspase-8 notamment, de désubiquitination de RIP1 par l'enzyme de la cylindromatose (CYLD) ou activation de la PARP1, RIP1 et RIP3 interagissent avec FADD pour former le nécrosome et enclencher la nécroptose, la nécrose programmée (d'après Galluzzi et al 2012).

2. <u>Les morts cellulaires atypiques</u>

a. L'anoikis

L'anoikis est la mort cellulaire induite par la perte de contacts cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire (ECM) (Gilmore, 2005). Elle se place à l'interface de l'apoptose extrinsèque et intrinsèque. La perte d'attachement à l'ECM permet l'arrêt des phosphorylations de voies de survie régulées par les intégrines, comme la voie AKT par exemple. Ceci conduit au recrutement et à l'activation des facteurs proapoptotiques comme BAX et BAK, à la diminution de l'expression de facteurs antiapoptotiques comme Bcl-xL puis à la rupture de la membrane mitochondriale et l'apoptose intrinsèque (Rosen et al., 2000). D'autres études ont montré que la perte d'attachement des cellules adhérentes peut provoquer une signalisation par le FASL et l'activation spécifique de la caspase-8 et l'apoptose par la voie extrinsèque (Aoudjit and Vuori, 2001). Cependant, l'anoikis peut être activée par une voie indépendante des caspases. Ainsi, des cellules métastatiques de prostate humaine

dépourvues de caspase-3 et surexprimant Bcl-2 peuvent également subir l'anoikis (Bondar and McConkey, 2002) par relocalisation de la protéine Bcl-2 inhibitor of transcription (Bit1) de la mitochondrie vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme Bit 1 peut interagir avec *Amino Enhancer Split* (AES) et déclencher la mort des cellules (Jan et al., 2004). Le mécanisme précis reste tout de même flou et peu décrit. Cette mort cellulaire est intéressante car la résistance à l'anoikis définit la prolifération des métastases coliques dans le cas de carcinose péritonéale.

b. La catastrophe mitotique

Elle est fréquemment définit comme une mort cellulaire déclenchée par une mitose anormale et intervenant pendant la mitose incriminée ou l'interphase suivante (Kroemer et al., 2009). Durant cette mitose anormale, les cellules présentent des malformations nucléaires comme les micronucléisations (fragments de chromosomes) ou multinucléisations (présence de plusieurs noyaux), définies comme les caractéristiques sans équivoques de la catastrophe mitotique. Cette mort cellulaire est souvent liée à l'activation de la caspase-2 en réponse aux dommages à l'ADN (Vakifahmetoglu-Norberg and Zhivotovsky, 2010) ou l'activation du gène suppresseur de tumeur p53 (Castedo et al., 2006). Les travaux menés ces dernières années ont montré que la catastrophe mitotique pouvait engendrer la sénescence des cellules (Eom et al., 2005) en fonction du statut d'expression de mTOR (Korotchkina et al., 2010) et n'est de ce fait plus toujours cataloguée comme une « pure » mort cellulaire mais plutôt définie dans ce cas, d'antioncogénique.

c. L'entose

L'entose, définie par Overholtzer en 2007, se définit par le phénotype « cellule dans la cellule » ou « canibalisme cellulaire ». Elle est causée par une perte d'adhésion à l'ECM sans pour autant induire l'apoptose, la différenciant ainsi de l'anoikis. Elle intervient sans l'activation des caspases et est insensible à l'inhibition de Bcl-2. Elle est en revanche liée à l'activation de la GTPase Rho et à sa sérine thréonine kinase ROCK1, stabilisant l'actine et facilitant la « phagocytose » de la cellule (Overholtzer et al., 2007). La cellule phagocytée semble d'abord normale au sein de la cellule partenaire puis disparaît probablement dégradée par les hydrolases lysosomales. L'entose est caractérisée et définit pour le moment par trois points clés : la cellule

phagocytée doit rester au sein de sa partenaire et doit être dégradée dans le lysosome, impliquant que l'entose doit être inhibée par les bloqueurs du lysosome ; le « cannibalisme cellulaire » doit impliquer des cellules de même type, excluant l'intervention de réelles cellules aux capacités phagocytaires connues, comme les macrophages par exemple ; enfin le processus doit être indépendant des caspases.

3. Activation de la caspase-1 et pyroptose

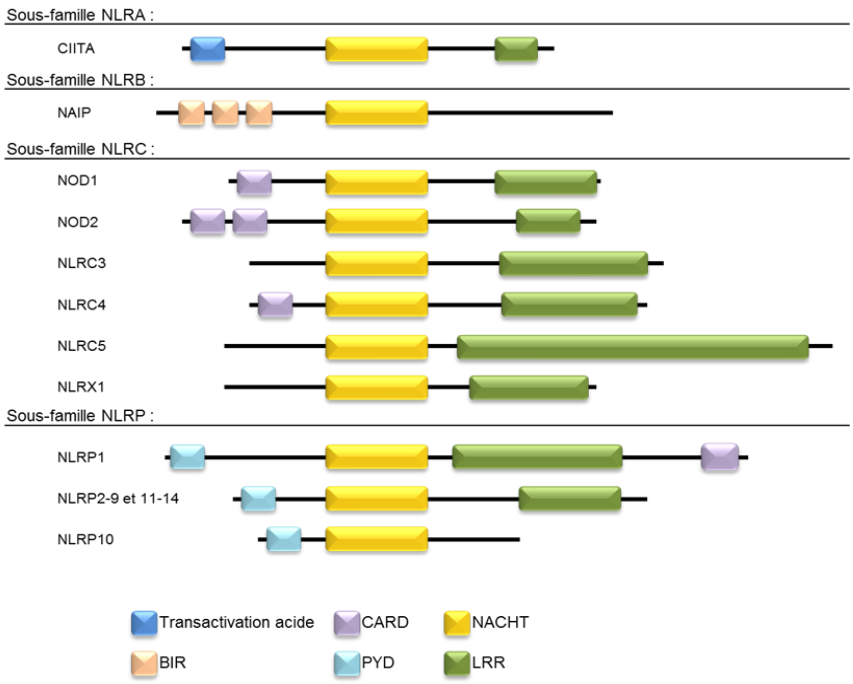
a- Généralités sur la caspase-1

La caspase-1, appelée également ICE pour *Interleukin 1 Converting Enzyme* appartient à la famille des caspases dites « inflammatoires » au même titre que les caspases-4,-5 et -12 qui n'impliquent pas forcément la mort cellulaire. Elle est codée par le gène CASP1 porté sur le bras long du chromosome 11 chez l'humain (11q23) et est présente dans le cytoplasme sous forme inactive de 45kD, sa forme active étant formée d'un hétérodimère de 10 et 20kD tous deux issus du clivage de la proforme. Une fois activée, la caspase-1 peut à son tour cliver ses substrats en reconnaissant spécifiquement l'enchainement d'acides aminés YVAD (Trp-Glu-His-Asp). Les cibles de la caspase-1 étant principalement les cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 β (IL1β), l'IL18 et l'IL33, il n'est pas étonnant de retrouver cette caspase active dans des maladies comme les cryopyrinopathies, la goutte ou l'athérosclérose (Masters, 2013). En cancérologie, l'activation de la caspase-1 est équivoque puisque la présence d'IL1β dans la région tumorale permet d'une part le recrutement de cellules immunosuppressives favorisant la prolifération tumorale et son échappement au système immunitaire de l'hôte (Tu et al., 2008) (Bruchard 2013) mais aussi de lymphocytes T CD8 via l'IL18, qui quant à eux provoquent une réponse antitumorale efficace (Ghiringhelli et al., 2009).

b- L'inflammasome : plateforme d'activation de la caspase-1

L'activation de la caspase-1 se déroule au sein d'un complexe intracellulaire multiprotéique appelé inflammasome. Les protéines essentielles pour la construction de cette plateforme appartiennent à la famille des *Nod-Like-Receptor* (NLR). Cette famille est classiquement subdivisée en quatre sous famille NLRA, NLRB, NLRC et NLRP. Toutes les protéines des différentes classes contiennent un domaine NACHT (NAIP, CIITA, HET-E et TP-1) et un LRR (*Leucin Rich Repeat*) à l'exception de

NAIP, seul représentant de la famille NLRB chez l'homme (Figure 5). En revanche la présence de certains domaines diffère en fonction de la sous famille : domaine de transactivation acide uniquement retrouvé dans la sous famille NLRA, le domaine BIR (*baculovirus inhibitor repeat*) retrouvé chez NAIP, le domaine CARD (*caspase activation and recruitment domain*) chez la famille des NLRC et NLRP1 ou le domaine PYD (*pyrin domain*) chez les constituants de la famille NLRP. La sous famille des NLRP est la plus étudiée et parmi ses 14 membres, seuls cinq NLRP sont capables d'induire la formation d'un inflammasome fonctionnels à savoir NLRP1, 2, 3, 6 et 12. Exceptée NLRP1, les autres protéines ne contiennent pas de CARD, l'activation de la caspase-1 se fait alors par interaction avec la protéine ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) par le domaine PYD. ASC, comme son nom l'indique contient un domaine CARD qui peut alors se charger de l'activation de la caspase-1 au sein de l'inflammasome et du clivage de la caspase-1 (Kersse et al., 2011)

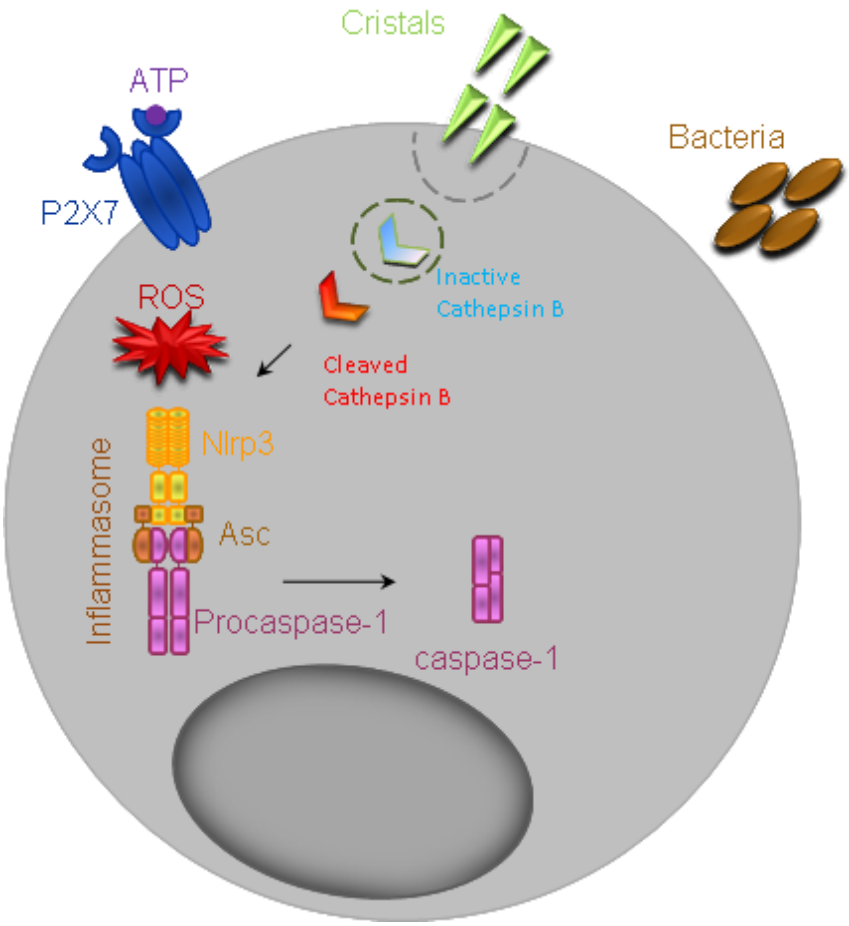


<u>Figure 5 :</u> Représentation schématique simplifiée des différents membres de la famille des NLRs et de leurs sous domaines (d'après Kersse, 2011).

c- Les signaux d'assemblage de l'inflammasome NLRP

Plusieurs facteurs connus sous le terme « signaux de danger » peuvent activer la construction de l'inflammasome. D'abord, on retrouve les motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Ces molécules d'origine exogène sont exprimées par les bactéries (endotoxines comme le lipopolysaccharide), les virus (ARN et ADN double brin) ou les parasites (protéines fongiques de *Candida albicans* par exemple). En stimulant la voie des TLR (TLR4 notamment), ces PAMPs permettent l'augmentation de l'expression de NLRP3 et donc favorise l'activation de l'inflammasome. D'autres molécules, les motifs moléculaires associés aux dangers ou DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) peuvent activer la formation de l'inflammasome. On retrouve dans cette famille des DAMPs, l'adénosine tri phosphate (ATP) via la signalisation du récepteur purinergique P2X7, la sortie du noyau de la protéine high mobily group box 1 (HMGb1), les protéines de choc thermiques (HSP), les cristaux (urate, cholesterol, silice entre autres) phagocytés, provoquant l'acidification lysosomale et la maturation de la cathepsine B, ou les ROS (Di Virgilio, 2013) (Figure 6).

Au niveau cellulaire, les différents types d'inflammasomes et leurs activateurs partagent un mécanisme commun qui consiste en un changement de la composition ionique du milieu intracellulaire. Ainsi les travaux de Perregaux ont démontré avant même la découverte de la caspase-1 que la nigéricine, un ionophore spécifique du potassium (K+) (et non la monensine spécifique des ions Na+) permettait le clivage de l'IL1β dans des modèles de macrophages murins et de monocytes humains (Perregaux et al., 1992). La concentration intracellulaire de 90mM, seuil de déclenchement de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* (Petrilli et al., 2007), facilite l'oligomérisation de la protéine ASC et donc l'activation de la caspase-1 (Fernandes-Alnemri et al., 2007). Le relargage d'ions K+ peut intervenir de manière spécifique par des transporteurs membranaires (Na+/K+ ATPases, jonctions GAP…) dans le cas des DAMPs ou de manière aspécifique par perméabilisation de la membrane cellulaire dans le cas des PAMPs. Les mouvements ioniques (et notamment des cations) devront être plus étudiés dans le futur chez l'homme puisque la stimulation des senseurs au calcium (CASR pour *calcium-sensing receptor*) des monocytes de souris permet l'activation de la caspase-1 (Lee et al., 2012).



<u>Figure 6 :</u> Schéma de l'activation de l'inflammasome : Divers stimuli peuvent enclencher la construction de l'inflammasome. Les PAMPs, comme les bactéries ou les dérivés viraux ou parasitaires mais aussi les DAMPs, comme les cristaux d'urate par exemple, l'ATP via la signalisation purinergique ou en encore les ROS. Nlrp3 interagit avec Asc par le domaine PYD, puis Asc recrute la procaspase-1 par le domain CARD. La caspase-1 est alors activée et peut exercer ses fonctions, comme l'induction de la pyroptose ou la maturation de l'IL1β ou de l'IL18.

d. La pyroptose

L'activation de la caspase-1 peut également être liée à la mort cellulaire. En 2000, Brennan et Coockson (Brennan and Cookson, 2000) décrivent une mort de type nécrotique étrange et particulière de macrophages murins infectés par *Salmonella typhimurium*. Les cellules, 4 heures après l'infection bactérienne présentent des fragmentations diffuses de l'ADN, des marquages Annexine V et 7AAD positifs, sans activation de la caspase-3 ni clivage de la PARP, mais un clivage de la caspase-1. Ils mettent en évidence et définissent la pyroptose, du grec « pyro » (le feu) et « ptosis » (la chute). Depuis, les travaux ont montré que d'autres bactéries (*Shigella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aerugonisa*…) pouvaient induire cette mort atypique mais aussi d'autres composés comme les DAMPs (ATP notamment). Dans ce contexte, la caspase-1 peut soit être activée au sein de l'inflammasome classique (comme décrit plus haut) mais aussi dans une autre plateforme, le pyroptosome consistant en l'oligomérisation de la protéine ASC, sans l'intermédiaire des NLRs (Fernandes-Alnemri et al., 2007). En plus des interleukines inflammatoires, comme l'IL1β (Miao et al., 2006) et l'IL18 (Tsutsui et al., 1999), la caspase-1 peut également dans ce cas cliver la caspase-7 (Lamkanfi et al., 2008) et ainsi orienter les cellules vers la pyroptose. Les mécanismes expliquant pourquoi l'activation de la caspase-1 dirige vers soit la sécrétion de chimiokines ou la mort cellulaire demeurent flous. A ce jour, la pyroptose est donc une mort cellulaire partageant des caractéristiques apoptotiques et nécrotiques (Figure 7). Elle est définit par une rupture rapide de la membrane plasmique, le clivage de l'ADN, l'activation de la caspase-1 (bloquée par son inhibiteur Y-VAD ou une diminution de l'expression de cette dernière) et enfin la maturation et le relargage des interleukines IL1β et IL18. La pyroptose a été décrite dans plusieurs types cellulaires, principalement dans des macrophages et les monocytes mais dernièrement, elle a été aussi mise en évidence dans des kératinocytes humains (Soong et al., 2012), des cardiomyocytes de rats diabétiques (Luo et al., 2014) ou encore dans des cellules neuronales (Adamczak et al., 2014) et gliales murines (Alfonso-Loeches et al., 2014).

Mort cellulaire	*Aspects morphologiques*	*Aspects biochimiques*
Apoptose	Arrondissement de la cellule Réduction du volume nucléiare (pyknosis) Fragmentation nucléaire (karyorrhexis) "Blebbing" de la membrane plasmique	Activation des protéines de la famille de Bcl-2 Activation des caspases Externalisation des phosphatidylsérines Perte du potentiel mitochondrail transmembranaire Rupture de la membrane mitochondriale Formation de ROS Fragmentation de l'ADN
Mort autophagique	Défaut de condensation de la chromatine Vaccuolisation du cytoplasme Accumulation d'autophagosomes	Conversion de LC3-I en LC3-II Implication des ATG Dégradation de p62
Necrose	Condensation modérée de la chromatine Gonflement du contenu cytoplasmique et des organelles Rupture de la membrane plasmique	Activation des calpaïnes et des cathepsines Fuite d'ATP et de LDH Phosphorylation, ubiquitination de RIP-1 Formation de ROS Perméabilisation du lysosome Clivage de la PARP-1 Incorporation des colorants vitaux
Pyroptose	Rupture de la membrane plasmique Gonflement du contenu cytoplasmique	Activation de la caspase-1 et de la caspase-7 (facultatif) Sécrétion d'IL1β et d'IL18 Fuite d'ATP, et de LDH Incorporation des colorants vitaux

<u>Figure 7 :</u> Tableau récapitulatif des aspects morphologiques et biochimiques principaux des morts cellulaires conventionnelles et de la pyroptose (adaptée de Kroemer et al, 2009 et complétée).

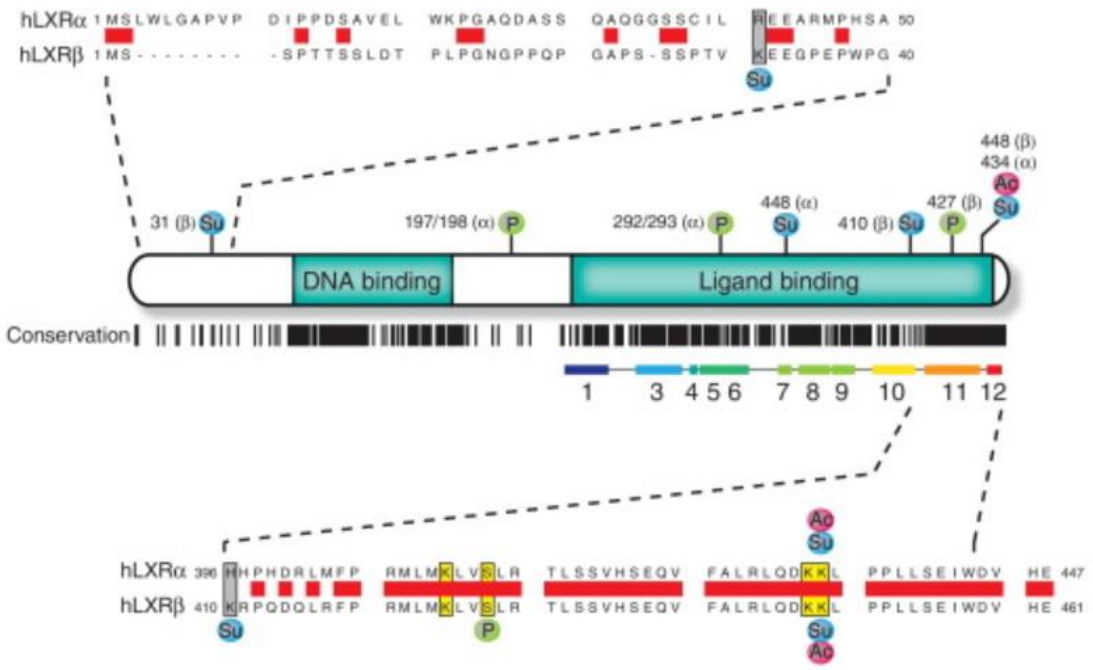
III. LES RECEPTEURS LIVER X RECEPTOR (LXRS)

1. Aspects généraux des récepteurs LXRs

a. *Structure, répartition et ligands des LXRs*

Il existe deux isoformes du récepteur chez les mammifères, LXRα et LXRβ, codées par les gènes NR1H3 sur le chromosome 11 (11p11.2) pour LXRα et NR1H2 sur le chromosome 19 (19p13.3) pour LXRβ. Les deux isoformes du récepteur possèdent 80% d'identité d'un point de vue de leurs résidus aminoacides. La répartition tissulaire est différente selon l'isoforme. Ainsi, LXRá est retrouvé en grande quantité dans les cellules à forte activité métabolique, alors que l'expression de LXRβ est plus ubiquitaire (Edwards et al., 2002; Hong and Tontonoz, 2014; Repa and Mangelsdorf, 2000).

Les LXRs sont des récepteurs nucléaires constitués de quatre domaines : 1) une partie N-terminale ayant la fonction d'activation en absence de ligand (*Activation Function* 1 ou AF-1), 2) un domaine liant l'ADN (*DNA Binding Domain* ou DBD) comprenant deux doigts de zinc, 3) une poche hydrophobe liant le ligand (*Ligand Binding Domain* ou LBD) et nécessaire pour la dimérisation et 4) une partie C-terminale ayant la fonction d'activation en présence du ligand (*Activation Function 2* ou AF-2) (Edwards et al., 2002). De plus plusieurs types de modifications post-traductionnelles ont été décrites à titre d'acétylation, ubiquitinylation, phosphorylation et SUMOylation dans les deux isoformes de LXR (Figure 8) (Jakobsson et al., 2012).



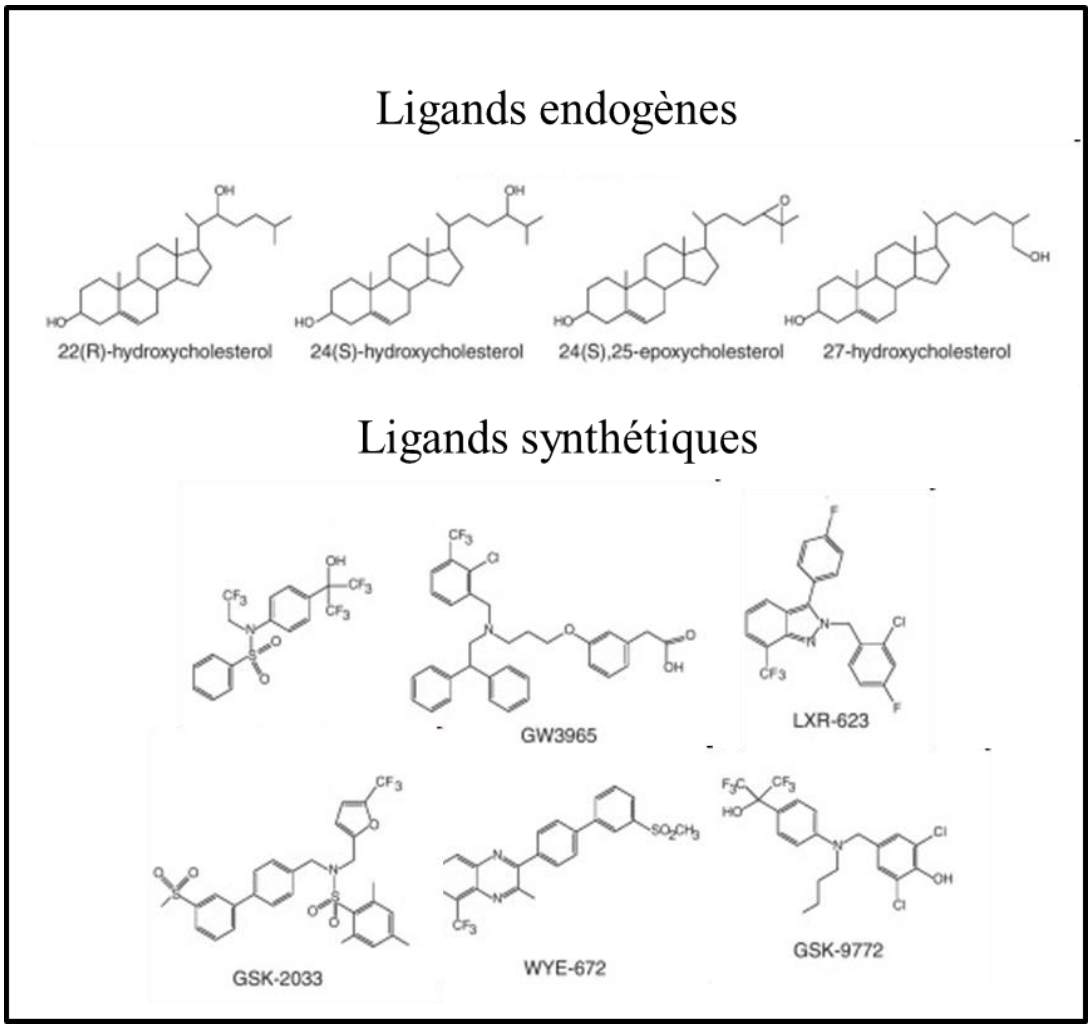
<u>Figure 8 :</u> Représentation schématique simplifiée des récepteurs LXRα et β : les deux isoformes partagent près de 80% d'identité dans leurs résidus amino-acides. Les régions les plus conservées sont le DBD et le LBD. Les sites propices aux modifications post-traductionnelles connues (Ac : acétylation, P : phosphorylation, Su : SUMOylation) ont été agrandis en haut et en bas du schéma. Les segments colorés numérotés de 1 à 12 représentent les hélices du LBD (D'après Jakobsson, 2012).

Les récepteurs LXRs exercent majoritairement leur activité sur l'ADN en s'hétérodimérisant avec le *Retinoïd X Receptor* (RXR) un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires. Le complexe ainsi formé va pouvoir se fixer sur des éléments de réponse à LXR (*LXR Response Element* ou LXRE) dans la région promotrice des gènes cibles et induire leur expression. Les LXREs majoritairement reportés sont des séquences de type *Direct Repeat* 4 (DR4), constituées de 2 demis sites hexamèriques AGGTCA séparées par 4 nucléotides (Edwards et al., 2002), même si d'autres sites non consensus ont également été décrits (Boergesen et al., 2012) comme les CNRE (*cAMP Negative Response Element*) (Tamura et al., 2000).

Les ligands physiologiques des LXRs appartiennent à la famille des oxystérols. Il s'agit de dérivés monooxygénés du cholestérol, comme le 22 (R) hydroxycholesterol ou le 24 (S) hydroxycholesterol par exemple comportant un radical hydroxyle en plus sur la chaîne latérale portée par le noyau cyclopentanophénantrène (Janowski et al., 1996). Ces oxystérols peuvent provenir de trois voies : production endogène par voie

enzymatique, oxydation endogène du cholestérol par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou encore par la voie alimentaire. D'autres composés naturels isolés de plantes, comme l'acide pylocarpique, ou de champignons, comme la paxilline ont été décrits pour avoir des effets agonistes sur les LXRs, ou antagonistes, comme la riccardine C issue de la plante grasse *Blasia pusilla* (Huang, 2014).

Les deux agonistes synthétiques non stéroïdiens communément utilisés en études expérimentales sont le T0901317 et le GW3965 qui peuvent moduler l'activité des deux isoformes LXRα et LXRβ. Depuis quelques années, sont apparus un antagoniste, le GSK-2033 (Zuercher et al., 2010), et des ligands spécifiques de LXRβ comme le WYE-672 (Hu et al., 2010) ou le GSK-9772 (Chao et al., 2008) mais leur utilisation reste restreinte et cantonnée à une publication pour chaque composé. L'agoniste panisoformique LXR-623 est à ce jour la seule molécule décrite comme ayant été testée chez l'Homme sain. Après avoir montré des effets prometteurs dans des modèles d'athérosclérose chez l'animal, la toxicité du LXR-623 sur le système nerveux central chez l'Homme, à titre de troubles psychiatriques notamment, a finalement conduit à l'arrêt de l'étude pharmacocinétique et pharmacodynamique de ce composé (Katz et al., 2009) (Figure 9).



<u>Figure 9 :</u> Récapitulatif non exhaustif des ligands des LXRs : les ligands naturels appartenant à la famille des oxystérols et les ligands synthétiques. Le T0901317 et GW3965 sont les agonistes les plus utilisés, le LXR-623 a été testé chez des individus sains, les agonistes spécifiques de LXRβ, le WYE-672 et le GSK-9772 et l'antagoniste GSK-2033 (D'après Jakobsson, 2012).

b. Rôles des LXRs dans le métabolisme lipidique

Il est essentiel de rappeler que les récepteurs LXRs sont avant tout des régulateurs majeurs du métabolisme du cholestérol et de la lipogenèse. Ils apparaissent ainsi comme des « senseurs » du cholestérol intracellulaire, protégeant les cellules d'une éventuelle accumulation de cholestérol en stimulant plusieurs mécanismes tel le transport inverse du cholesterol (ou *reverse transport*, RT). Le RT du cholestérol consiste en un retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il sera éliminé sous forme inchangé ou sous forme d'acides biliaires. Le RT est initié par une expulsion du cholestérol depuis la cellule vers les HDL (*High Density*

Lipoproteins) ou l'Apolipoprotéine E (ApoE) circulantes en utilisant les transporteurs cellulaires NPC1 et NPC2 (*Niemann Pick C1 et C2*) et membranaires (*ATP Binding Cassette* (ABC) A1 et G1) du cholestérol. Une surcharge intracellulaire de cholestérol engendre une production accrue d'oxystérols conduisant à l'activation de LXR. Une fois activés les récepteurs LXRs vont augmenter l'expression des transporteurs NPC1, NPC2 (Rigamonti et al., 2005), ABCA1 et ABCG1 (Kennedy et al., 2001) et ainsi favoriser le RT du cholesterol.

Au niveau hépatocytaire, l'hétérodimère LXR/RXR induit l'expression de l'ARNm du récepteur scavenger de type B1 (SR-B1), en se fixant sur le promoteur de ce gène (Malerod et al., 2002). Ce récepteur permet la capture des HDL circulantes par les hépatocytes, et donc la dégradation du cholestérol. Au niveau périphérique (intestinal et macrophagiques), l'activation des LXRs permet l'augmentation de l'expression de IDOL (*Inducible Degrader of the LDLR*) entrainant la dégradation du récepteur aux LDL par ubiquitynylation et limitant ainsi son absorption (Zelcer et al., 2009).

L'excrétion fécale du cholestérol est initiée par la cholesterol 7α-hydrolase (CYP7A1) au niveau biliaire. Sa transcription peut être induite chez la souris par les agonistes LXR (Menke et al., 2002), et donc augmenter l'excrétion fécale du cholestérol (Goodwin et al., 2003). Chez l'homme, deux cibles de LXR, ABCG5 et ABCG8 vont jouer ce rôle au niveau du foie et vont également contrôler les flux entrant et sortant de cholestérol au niveau luminal des entérocytes conférant ainsi un rôle des récepteurs LXRs dans l'absorption intestinale du cholestérol provenant de l'alimentation, (Yu et al., 2002).

De plus, la lipogenèse hépatique est régulée par les récepteurs LXRs. Soit directement en se fixant sur les LXREs présents dans les régions promotrices de gènes codant pour certaines enzymes clés de la synthèse des acides gras comme l'acide gras synthétase, la stearoyl-CoA desaturase, ou encore l'acétyl-CoA carboxylase. Soit indirectement en se fixant sur le LXRE du promoteur de la SREBP-1c (*Sterol Response Element Binding Protein-1c*) qui est elle-même un facteur de transcription pour les enzymes essentielles de la lipogenèse (Schultz et al., 2000).

2. Mort cellulaire et LXRs

L'activation des récepteurs LXRs peut induire la mort cellulaire par apoptose dans plusieurs modèles cellulaires. Ceci peut être expliqué par l'augmentation de la transcription de certains gènes cibles de LXRs.

Lorsque des fibroblastes humains sont traités *in vitro* par la staurosporine, un agent apoptotique, une augmentation de la transcription de LXRα peut être détectée suivie par l'augmentation de l'expression de deux gènes cibles l'ApoE et ABCA1. L'augmentation de l'ApoE est corrélée positivement à l'activation de la caspase-3 et donc à la l'apoptose des fibroblastes *in vitro* (Quinn et al., 2004).

Le traitement de la lignée leucémique monocytaire (THP-1) par l'agoniste LXR T0901317 *in vitro* permet d'augmenter l'expression de la protéine ABCG1. Cette augmentation est également corrélée positivement à l'activation de la caspase-3 menant à l'apoptose de ces cellules (Seres et al., 2008).

Une costimulation des récepteurs LXRs et RXRα dans les monocytes/macrophages humains permet l'augmentation de la synthèse de cytokines proapoptotiques comme le TNFα par fixation de l'hétérodimère LXR/RXR sur le promoteur du gène codant pour le TNFα. (Landis et al., 2002).

Un élément de réponse à LXRs est présent dans la région promotrice du gène codant pour PPARγ, un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires. La stimulation par un agoniste de LXRs entraine l'augmentation de l'expression de PPARγ, notamment dans les adipocytes (Seo et al., 2004) et les macrophages (Rebe et al., 2009). Les agonistes de PPARγ (familles des glitazones) peuvent induire l'apoptose par différents mécanismes suivant le type cellulaire (Elrod and Sun, 2008).

L'activation des LXRs par son ligand synthétique induit l'expression du récepteur à l'acide rétinoïque (RARα) dans les monocytes et les macrophages humains (Rebe et al., 2009). Les agonistes de RARα (comme le *All-Trans Retinoic acid* ou ATRA) conduisent à l'apoptose de cellules de différents types de cancers et principalement des cellules leucémiques promyélocytaires (Okuno et al., 2004). Un pré-traitement

de ces cellules avec un agoniste de LXR pourrait potentialiser les effets des agonistes de RARα (ATRA) sur la mort des cellules leucémiques.

Les TLRs sont également des gènes cibles des LXRs. L'expression de TLR4 est notamment augmentée de manière LXRα/RXRα dans un modèle de macrophages humains primaires différenciés (Fontaine et al., 2007), soulignant le potentiel des LXRs dans d'autres voies de mort comme la nécrose ou la pyroptose.

On peut ainsi penser que les récepteurs LXRs pourraient conduire à la mort cellulaire soit directement en induisant des gènes cibles montrés comme participant à l'apoptose, comme ApoE, ABCG1 ou le TNFα, ou indirectement en induisant d'autres récepteurs nucléaires comme PPARγ ou RARα.

3. LXRs, oxystérols et inflammation : rôles controversés

De nombreuses études ont d'abord identifié les récepteurs LXR, α et β pour être responsables d'activités anti-inflammatoires.

Historiquement, il avait été démontré que LXRα jouait un rôle prédominant dans la survie des macrophages en réponse aux stimuli bactériens et en diminuant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires comme la Nitric Oxid Synthase (NOS), la cyclooxygenase 2 (COX-2) ou l'IL6 (Joseph et al., 2003). La capacité effectrice des macrophages est également régulée par LXRs en augmentant l'expression de Mertk (N et al., 2009) et de TGM2 (Rebe et al., 2009), deux protéines responsables de la phagocytose des cellules apoptotiques et des neutrophiles sénescents par les macrophages.

Des effets bénéfiques sur l'inflammation ont également été observés sur les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose amyotrophique latérale (Bigini et al., 2010) ou encore au niveau hépatique où LXRs inhibe l'expression de protéines pro-inflammatoire comme l'haptoglobine ou la *Serum Amyloid A* (Venteclef et al., 2010).

Au niveau des autres cellules du système immunitaire, les LXRs réduisent les signaux d'activation et de recrutement des cellules $TCD4^+$ (Walcher et al., 2010), la maturation des lymphocytes B (Heine et al., 2009), le relargage de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes après stimulation par le LPS (Myhre et al., 2008).

Des effets controversés sont en revanche observés pour les cellules dendritiques (DC). L'activation de la voie LXRα au sein des DC permet l'inhibition de CXCR7 à leur surface en provoquant la perte de la migration des DC vers les ganglions lymphatiques et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T inhibant ainsi la réponse inflammatoire (Villablanca et al., 2010). Cependant, une autre étude précise que l'activation de la voie LXR par des ligands endogènes ou exogènes induit la maturation des DC et l'augmentation de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL12, l'IL6, l'IL8 ou le TNFα (Torocsik et al., 2010).

Des résultats discordants sont également retrouvés dans les phénomènes de pathologies inflammatoires osseuses. Les LXRs peuvent ainsi protéger de l'évolution de l'arthrite chez la souris (Park et al., 2010) et bloquer l'inflammation et la douleur dans un modèle d'arthrite chez le rat (Li et al., 2010) mais également provoquer la destruction du cartilage chez des souris atteintes de polyarthrite rhumatoïde (Asquith et al., 2011).

L'ambiguïté de l'activation des récepteurs LXRs en faveur ou en défaveur de l'inflammation est également alimentée par leurs ligands, notamment les ligands naturels, souvent corrélés avec une activité pro-inflammatoire en favorisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1β, l'IL6 ou l'IL8 (Vejux and Lizard, 2009). Les oxystérols peuvent ainsi contribuer aux dysfonctionnements inflammatoires des cellules endothéliales dans des modèles d'athérosclérose (Lemaire et al., 1998) mais aussi conduire à l'instabilité de la plaque d'athérome en induisant une surexpression de la Matrix metalloprotéinase 9 (MMP9) (Blankenberg et al., 2003). Ils permettent également l'expression membranaire de CD36, une molécule notamment responsable de l'adhésion des macrophages à la plaque d'athérome (Leonarduzzi et al., 2010).

Les oxysterols peuvent passer la barrière hémato-encéphalique et être impliqués dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou Parkinson. Dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de 24-(S) et le 27-hydroxycholesterol (Shafaati et al., 2011) est corrélée avec l'apparition de la maladie. En interaction avec le peptide β-amyloïde, ces oxystérols sont également responsables de la mort par apoptose et par nécrose des cellules neuronales , *in vitro* (Gamba et al., 2011) en provoquant l'accumulation de ROS au sein des cellules. Dans la maladie de

Parkinson, la quantité de 7-kétostérol, de 7-α- 7-β-, 24-(S) et de 27-hydroxycholestérol est deux fois plus importante dans le cerveau des patients atteints de la maladie comparé aux sujets sains (Cheng et al., 2011).

Les oxystérols prennent également part aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la rectocolite hémorragique ou la maladie de Crohn où une prise alimentaire riche en cholestérol aggrave l'évolution de ces maladies. De plus, le mélange en plusieurs oxystérols est connu pour pouvoir induire l'apoptose des cellules coliques humaines Caco-2 en culture (Biasi et al., 2009). Dans ce même modèle cellulaire, le même cocktail d'oxystérols (mais également le 7β-hydroxycholesterol seul) est capable d'induire l'expression et le relargage de cytokines comme l'IL1β, l'IL6 ou l'IL8 (Mascia et al., 2010). Dans ce contexte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, Jakobsson a rapporté en 2014, l'effet délétère de la suppression de LXRβ aggravant les signes cliniques de colites induites au DSS (Dextran Sodium Sulfate) chez des souris LXRβ KO et LXRαβKO. Ceci est expliqué par un recrutement accru de macrophages et à l'exposition du côlon aux cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL8. Le traitement par gavage de souris « wild type » par le GW3965, agoniste synthétique des LXRs, restaure plus rapidement le poids perdu par la colite et diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Jakobsson et al., 2014).

Enfin l'accumulation d'oxystérols est également corrélée à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Rodriguez and Larrayoz, 2010). Dans un modèle de cellules humaines de la rétine ARPE19, les oxystérols favorisent la sécrétion d'IL8 et l'apoptose de ces cellules (Dugas et al., 2010).

D'un point de vue biomoléculaire, les effets d'oxystérols sont expliqués par une activation des voies de la phosholipase C, la phosphorylation de ERK et la migration nucléaire de NF-kB dans des lignées macrophagiques comme U937 (Leonarduzzi et al., 2005). Les auteurs utilisant un cocktail d'oxystérols (contenant du 7α- et 7β-hydroxycholesterol, du cholesterol α- et cholesterol β-epoxide, du cholestan-3β,5α,6β-triol, 7-ketocholesterol et du 25-hydroxycholesterol) restent cependant flous quant au rôle précis d'un oxystérol. La voie NF-kB a été également mise en évidence dans des trophoblastes primaires humains lorsque ceux-ci sont traités par le 25-hydroxycholesterol ou le 7-kétocholesterol (Aye et al., 2012). Cependant peu

d'études cherchent à connaître l'impact du récepteur LXR sur les effets pro-inflammatoires induits par les oxystérols. Récemment, Sallam a montré que les ligands naturels des LXRs comme le 22-(S)-hydroxycholesterol ou la surcharge en cholestérol pouvaient activer LXR pour induire l'expression de LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) spécifiquement dans les macrophages, favorisant leur survie et leur accumulation dans la plaque d'athérome (Sallam et al., 2014).

Par l'intermédiaire des LXRs, les oxystérols induisent l'expression des SREBPs entrainant au niveau hépatique une augmentation de la lipogénèse et contribue aux phénomènes de stéatose. Ce dysfonctionnement hépatique est d'ailleurs largement reporté chez les souris traitées par le T0901317 et, dans une moindre mesure, par le GW3965. L'effet plus prononcé du T0901317 peut être expliqué par le fait qu'il est aussi un ligand de PXR, entrainant l'expression du CD36 (Mitro et al., 2007) L'accumulation d'acide gras provoque alors un stress oxydatif, l'inflammation et la fibrose du tissu hépatique (Schuppan and Schattenberg, 2013). De plus au niveau pulmonaire, il a été décrit que l'expression constitutive de SREPB provoquait l'accumulation de lipides et de cytokines inflammatoires comme le TNFα ou l'IL1β au niveau des cellules épithéliales bronchiques (Plantier et al., 2012).

Pour conclure, de nombreuses publications tendent à montrer un effet anti-inflammatoire des récepteurs LXRs lorsque ceux-ci sont activés par leurs ligands synthétiques comme le T0901317 ou le GW3965, même si quelques études montrent le contraire, notamment en ce qui concerne les DC et le tissu hépatique. Les oxystérols sont quant à eux avérés pour avoir un effet néfaste quant à l'inflammation dans de nombreux modèles de pathologies chroniques inflammatoires. Finalement les effets des oxystérols, ligands naturels des LXRs et l'activation des récepteurs LXRs, que ce soit l'isoforme α ou β sont encore mal compris dans le contexte de l'inflammation et de l'immunité.

4. LXRs en cancérologie

Contrairement à PPARγ, très peu de données existent dans la littérature sur l'utilisation de molécules agonistes des récepteurs LXRs dans le traitement du cancer chez l'Homme (Elrod and Sun, 2008). Cependant, les articles de recherche

s'accumulent depuis quinze ans et démontrent clairement un potentiel des récepteurs LXR et de leurs ligands en cancérologie humaine (De Boussac et al., 2013). Les principales données ont été montrées sur des cellules de cancer de la prostate, du sein, et plus récemment du côlon. L'ensemble de ces connaissances est synthétisé et reporté plus loin (Figure 10).

a. Cancer de la prostate

En 2004, Fukuchi et al furent les premiers à décrire l'action des agonistes des récepteurs LXRs en cancérologie. Leurs modèles visaient principalement des lignées de cancer de la prostate. Ces cellules sécrétant un taux de cholestérol jusqu'à dix fois plus élevé que des cellules de prostate indemne de tout phénomène, l'implication des récepteurs LXRs semblait donc intéressante à rechercher. Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation d'agonistes LXRs induit une inhibition de la prolifération des cellules LNCaP, qui est plus importante avec un traitement par l'agoniste synthétique, le T0901317 plutôt qu'avec les agonistes naturels (22(R)-hydroxycholesterol et 24(S)-hydroxycholesterol). Le T0901317 induit une diminution de l'expression de skp2 une protéine impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation de p27 par le protéasome (Kokontis et al., 1998). La protéine p27 est impliquée dans l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Fukuchi et al. montrent que le T0901317 induit également une augmentation de l'expression de p27, ce qui conduit à un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et un arrêt de la prolifération. Enfin, certaines cellules sont moins sensibles à l'effet anti-prolifératif du T0901317, comme les cellules MB435S. Ceci est corrélé à une expression de LXRα et β moins importante que dans les cellules LNCaP, et la surexpression de LXRα restaure la sensibilité des cellules au T0901317. L'un des moyens de lutter contre les cancers de la prostate est de limiter la production d'hormones androgènes dont les cellules cancéreuses ont besoin pour proliférer (Kokontis et al., 1998). Ainsi des souris porteuses de tumeur de prostate (induites par injection sous cutanée) voient leur tumeur régresser après castration. Mais dans un deuxième temps les cellules tumorales deviennent androgène-indépendantes et prolifèrent à nouveau. Dans ce contexte il a été montré qu'un traitement des souris par le T0901317 conduisait à un ralentissement de la croissance de la tumeur aussi bien chez des souris porteuses d'une tumeur androgène-dépendante (non castrées)

(Fukuchi et al., 2004) qu'androgène-indépendante (après castration des souris) (Chuu et al., 2006). L'agoniste synthétique T0901317 a été montré comme agissant comme un antagoniste des récepteurs aux androgènes, ce qui permettrait d'expliquer son effet sur la prolifération des cellules cancéreuses induite par les androgènes. (Chuu et al., 2007). Plus récemment, les agonistes des récepteurs LXRs ont été décrits comme des inhibiteurs de la voie de survie Akt, en favorisant l'efflux de cholesterol (un activateur de la voie Akt) via ABCG1, ils limitent la phosphorylation d'Akt au niveau des rafts lipidiques et entrainant l'apoptose et la survie des cellules LNCap (Pommier et al., 2010). De plus, chez les souris LXRαβKO, les voies Akt et MAPK sont actives de manière constitutive dans les cellules épithéliales prostatiques favorisant la prolifération de ces cellules prouvant que les LXRs et ces voies de survies sont intimement liées (Dufour et al., 2013).

b. Cancers mammaires

Les récepteurs LXRs sont également exprimés dans plusieurs lignées de cancers mammaires. Ainsi, le traitement par le T0901317 ou GW3965 permet l'inhibition de la prolifération dans les lignées cellulaires (MCF7 et T47D) exprimant le récepteur aux oestrogènes (ER). Cette inhibition se traduit par un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Vedin et al., 2009). Ce blocage est corrélé avec une diminution de l'ARNm codant pour Skp2, les cyclines A2 et D1, mais aussi avec une augmentation de l'expression de la protéine p53 (Vedin et al., 2009). De plus, chez la souris le T0901317 est capable d'augmenter l'expression de l'œstrogène sulfotransferase (Est) dans le foie, conduisant à une diminution du taux d'oestrogènes circulantes. Ainsi, chez les souris porteuses de tumeurs mammaires œstrogène-dépendantes (cellules MCF-7), le T0901317 est capable de freiner la croissance tumorale, mais n'a aucun effet sur la croissance de tumeurs issues de cellules œstrogène-indépendantes (cellules MDA-MB-231) (Gong et al., 2007). Cependant cet effet anti-tumoral ne serait pas dû à un effet direct sur les cellules tumorales, puisque le T0901317 n'augmente pas l'expression d'Est dans ces cellules. Enfin, les LXRs peuvent diminuer les transcrits induits par le facteur de transcription E2F2 qui contrôle de nombreuses protéines du cycle cellulaire en faveur de la prolifération, en diminuant son expression dans plusieurs modèles mammaires humains (Nguyen-Vu et al., 2013)

c. Cancers coliques

Un rôle des récepteurs LXRs sur la prolifération de cellules de cancer du côlon (HCT116) a été récemment mis en évidence. Les récepteurs LXRs peuvent fixer et titrer la β-caténine en excès dans ces cellules. La β-caténine est connue pour être un oncogène qui peut agir comme un facteur de transcription si elle n'est pas dégradée par le protéasome. Elle induit notamment l'expression de MYC et de MMP7 (*Matrix Metalloproteinase 7*), toutes deux étant retrouvées fréquemment augmentées dans les cancers du côlon. En présence d'un ligand agoniste, LXRα et LXRβ sont capables de se fixer sur le promoteur des gènes codant pour MYC et MMP7 et réprimer ainsi leur expression. Les récepteurs LXRs ont donc un rôle antiprolifératif sur les cellules cancéreuses coliques HCT116 *in vitro* (Uno et al., 2009). Dans les lignées de cancers coliques, les agonistes LXRs diminuent l'expression des cyclines B1 et E ralentissant ainsi la prolifération des cellules. La protéine Rb est connue pour ses propriétés répressives de tumeurs en agissant comme inhibiteur de la prolifération cellulaire. Cependant, elle est maintenue phosphorylée et inactive dans de nombreux types de cancers (Lee et al., 1984). Le GW3965 provoque la déphosphorylation de la protéine Rb dans les cellules HCT116 et renforce les effets décrits plus haut sur les cyclines (Vedin et al., 2012). Plus récemment, l'isoforme LXRα a été démontrée pour avoir un rôle antiprolifératif sur les cellules HT29. La surexpression de cette isoforme dans les cellules HT29 permet le ralentissement *in vitro* de la prolifération cellulaire et *in vivo* de la croissance tumorale chez les souris porteuses de tumeurs HT29. Des résultats similaires ont été observés dans un modèle de carcinogénèse colique induite par le DSS dans des souris LXRα transgéniques et chez des animaux $Apc^{-/-}$/LXRα (Lo Sasso et al., 2013).

d. Autres types de cancers

Le taux plasmatique de LDL oxydées (LDLox) est corrélé à un fort risque de cancer de l'ovaire. *In vitro*, la prolifération des cellules de cancer de l'ovaire peut être stimulée par les LDLox. Ce phénomène peut être reversé en présence de T0901317 (Scoles et al., 2010).

Le récepteur aux LDL, sous stimulation de ses ligands, peut être couplé à un récepteur à l'EGF muté (EGFRvVIII) favorisant la prolifération des cellules de

glioblastome par signalisation de la PI3 kinase. Cette mutation de l'EGFR a pu être mise en évidence dans des modèles murins et chez des patients atteints de glioblastome. Les agonistes LXRs, en favorisant la dégradation des récepteurs aux LDL par l'enzyme IDOL, et en favorisant l'élimination du cholestérol de l'organisme permet d'inhiber cette voie de survie en deux points distincts et apparaissent comme une potentielle thérapeutique ciblée pour ce type de cancer (Guo et al., 2011). Dans plusieurs modèles de mélanomes murins, les ligands de LXRs via l'isoforme LXRβ, conduisent à l'augmentation de l'expression de l'ApoE dans la tumeur et le tissu stromal, limitant la diffusion de métastases. De plus, le GW3965 permet de potentialiser *in vivo* les effets de la décarbazine, du vemurafenib et de l'anticorps antiCTLA4, trois thérapeutiques utilisées en pratique clinique contre le mélanome (Pencheva et al., 2014). Le T0901317 peut également conduire au clivage de la caspase-3 dans des cellules de mélanome murin B16F10 de manière dépendante de l'isoforme LXRβ, tout en épargnant les mélanocytes normaux L10BIOBR. Le T0901317 retarde également la croissance tumorale dans un modèle de souris C57Bl/6 porteuses de tumeurs B16F10 implantées en injection sous cutanée (Zhang et al., 2014).

Enfin, les souris femelles LXRβ KO développent spontanément des tumeurs au niveau de la vésicule biliaire notamment dans un contexte de stimulation hormonale. Cette prolifération anormale des cellules épithéliales vésiculaires est corrélée à une augmentation de synthèse de TGFβ. Ce phénomène n'est ni retrouvé chez les souris LXRα KO, ni LXRαβ KO, ni LXRβ KO ovariectomisées soulignant l'importance de LXRβ dans le développement des tumeurs vésiculaires chez les sujets de sexe féminin non ménopausés (Gabbi et al., 2010).

Organes Lignées	**Isoforme(s) impliquée(s)**	**Mécanismes décrits**	**Validation *in vivo***	**Date, Auteur, Journal**
Prostate, LnCap	**LXRα**	Transcriptionnel, diminution de l'expression de skp2, stabilisation de p27, arrêt en G1	Oui	2004, Fukuchi, *Cancer Research*
Prostate, LnCap androgénodépendantes	***ND***	Indirect, les agonistes synthétiques LXR agissent comme des antagonistes aux récepteurs androgèniques	Non	2007, Chuu, *Biochemical and Biophysical Research Communications*
Prostate, LnCap	**LXRα, LXRβ**	Transcriptionnel indirect, augmentation de l'expression d'ABCG1, rupture des rafts lipidiques, diminution de l'expression d'Akt au sein des rafts, arrêt de la prolifération et activation de la caspase-3	Oui	2010, Pommier, *Oncogene*
Sein, cellules ER+ MCF7, T47D	***ND***	Transcriptionnel, diminution de l'expression de skp2, des cyclines A2 et D1, augmentation de l'expression de p53	Non	2009, Vedin, *Carcinogenesis*
Sein, cellules oestrogenodépendantes MCF7	**LXRα, LXRβ**	Transcriptionnel indirect, augmentation de l'expression de l'*Estrogen Sulfo Transferase* au niveau hépatique, dimintion du taux d'oestrogenes circulant	Non	2007, Gong, *Molecular Endocrinology*
Sein, cellules ER+ MCF7, T47D	***ND***	Transcriptionnel,diminution de l'expression de l'E2F2 et des gènes de la famille de l'E2F par les agonistes synthétiques de LXR	Non	2013, Nguyen-Vu, *Breast Cancer Research*
Ovaires, SKOV3, CAOV3, OVCAR3	***ND***	Inverse les effets promitogènes des LDLox et diminution de l'expression de la cardiotropine 1 par les cellules	Non	2010, Scoles, *Gynecologic Oncology*
Glioblastome, U87	***ND***	Dégradation du récepteur aux LDLox par IDOL, activation de la caspase-3	Oui	2011, Guo, *Cancer Discovery*
côlon, HCT116	**LXRα et LXRβ**	Transcriptionnel indirect, titration de la β-caténine et fixation sur le promoteur de la MMP7 et Myc	Non	2009, Uno, *Biochemical Pharmacology*
côlon, HCT116, Colo205	**LXRα et LXRβ**	Transcriptionnel, diminution de l'expression des cyclines B1 et E, stabilisation de Rb	Oui	2012, Vedin, *Molecular Carcinogenesis*
côlon, HT29 surexprimant LXRα	**LXRα**	La surexpression de LXRa protège la carcinogénèse colique induite par au DSS	Oui	2013, Lo Sasso, *Gastroenterology*
Mélanome, B16F10, MeWo, HT144, SK-Mel-2	**LXRβ**	Transcriptionnel indirect, augmentation de l'expression de l'ApoE dans les tissus tumoraux et stromaux limitant l'extension métatstatique	Oui	2014, Pencheva, *Cell*
Mélanome, B16F10	**LXRβ**	Activation de la caspase-3	Oui	2014, Zhang, *Cancer Cell international*
Vésicule biliaire, cholangiocytes primaires	**LXRβ**	Les souris LXRβ KO développent spontanément des tumeurs vésiculaires,augmentation de synthèse de TGFβ	Oui	2010, Gabbi, *Proc Natl Acad Sci USA*

Figure 10 : Tableau récapitulatif des effets connus des récepteurs LXRs et de leurs agonistes en cancérologie (*ND* : non déterminé).

Objectifs du travail de thèse

Durant les quatre années passées au sein de l'équipe de François Ghiringhelli, mon travail a consisté à comprendre le rôle de la caspase-1 dans les phénomènes de mort des cellules tumorales coliques humaines et murines et son implication dans la pyroptose.

J'ai d'abord tenté de décrypter les mécanismes de mort cellulaire induits par les agonistes du récepteur LXR dans des modèles de lignées cancéreuses coliques. En 2010, peu de résultats étaient publiés sur les effets de ces agonistes sur la mort des cellules coliques. Les données disponibles pour les autres types de cellules cancéreuses décrivaient principalement des effets génomiques à savoir une diminution de l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire provoquant le ralentissement de la croissance tumorale. Les résultats obtenus durant ma thèse montrent que les agonistes LXR induisent également l'activation de la caspase-1 et la mort par pyroptose des cellules tumorales coliques de manière non transcriptionnelle via LXRβ.

Dans un deuxième temps, en collaboration avec le service de chirurgie digestive et le service de gastroentérologie du CHU de Dijon, mon travail a consisté à étudier la mort de cellules tumorales coliques dans un modèle de chimiothérapie intrapéritonéale en associant l'oxaliplatine et le glucose 2,5%, un soluté hypotonique, afin d'améliorer la prise en charge des patients atteint de carcinose péritonéale et de tenter de standardiser cette procédure chirurgicale. Les résultats obtenus, encore préliminaires, montrent que l'association oxaliplatine - milieu hypotonique permet d'augmenter l'efficacité de la technique de chimiothérapie intrapéritonéale in vitro par activation de la caspase-1 et une mort atypique restant à définir.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. ETUDE DES MECANISMES METTANT EN JEU LE RECEPTEUR LXR EN CANCEROLOGIE COLORECTALE

1. Article 1 : Liver X Receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells

"Liver X Receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells" (Derangere et al., 2014)

Les récepteurs Liver X Receptor (LXR) α et β appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont classiquement connus pour être des régulateurs majeurs des flux de cholesterol dans l'organisme en assurant notamment son élimination lors d'une surcharge de ce dernier. Depuis le milieu des années 2000, ces récepteurs et leurs ligands sont également étudiés et ont été démontrés pour avoir un effet antitumoral sur plusieurs modèles de cellules cancéreuses humaines et murines.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux effets des agonistes synthétiques et naturels des récepteurs LXRs dans plusieurs lignées tumorales coliques humaines (HCT116, HT29, HCT8, SW480) et murines (CT26). Ainsi, nous montrons que les ligands de LXRs sont capables d'activer la formation de l'inflammasome et la maturation de la caspase-1. Ces effets sont dépendants très majoritairement de l'isoforme LXRβ et sont expliqués par l'interaction rapide et transitoire de cette dernière avec la pannexine-1, un pore transmembranaire, qui permet le relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP relargué est capté de manière auto/paracrine par son récepteur purinergique P2X7 et enclenche en retour la formation de l'inflammasomme et la mort atypique de type pyroptose des cellules cancéreuses coliques. Cette cascade d'évènement et ses effets ont également pu

être validés *in vivo*, dans un modèle de souris Balb/c porteuses de tumeurs CT26WT et de CT26 sh-Control, sh-LXRβ, sh-Nlrp3 et sh-Caspase-1 ou l'utilisation d'inhibiteur de la pannexine-1 comme le probénécide.

Nous montrons ainsi pour la première fois, un rôle direct et non transcriptionnel du récepteur LXRβ dans des phénomènes de mort cellulaire.

Liver X Receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells

Running Title: LXRβ-pannexin 1 mediated caspase-1 activation

Valentin Derangère[1,2,3], Angélique Chevriaux[1,2], Flavie Courtaut[1,3], Mélanie Bruchard[1,3], Hélène Berger[1,3], Fanny Chalmin[1,3], Sébastien Z. Causse[1], Emeric Limagne[1,3], Frédérique Végran[1,3], Sylvain Ladoire[1,2,3], Benoit Simon[4], Wilfrid Boireau[4], Aziz Hichami[1,3], Lionel Apetoh[1,2,3], Grégoire Mignot[1], François Ghiringhelli[1,2,3,*], Cédric Rébé[1,2,*].

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 866, Dijon, 21079, France.

2. Centre Georges François Leclerc, Dijon, 21000, France.

3. Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, 21000, France.

4. Institut Franche-Comté Electronique, Mécanique, Thermique et Optique–Sciences et Technologies (FEMTO-ST), Département Micro Nano Sciences & Systèmes, Université de Franche Comté, Besançon, 25044, France.

* CR and FG share co-senior authorship.

Corresponding author: Cédric Rébé, INSERM UMR 866, 7 bd Jeanne d'Arc, Dijon, 21079, France. Tel: +33 (0)3 80 39 33 53. Fax: +33 (0)3 80 39 33 34. E-mail: crebe@cgfl.fr.

ABSTRACT

Liver X Receptors (LXRs) have been proposed to have some anticancer properties, through molecular mechanisms that remain elusive. Here we report for the first time that LXR ligands induce caspase-1 dependent cell death of colon cancer cells. Caspase-1 activation requires NLRP3 inflammasome and ATP-mediated P2X7 receptor activation. Surprisingly, LXRβ is mainly located in the cytoplasm and has a non-genomic role by interacting with pannexin 1 leading to ATP secretion. Finally LXR ligands have an antitumoral effect in a mouse colon cancer model, dependent on the presence of LXRβ, pannexin 1, NLRP3 and caspase-1 within the tumor cells. Our results demonstrate that LXRβ, through pannexin 1 interaction, can specifically induce caspase-1-dependent colon cancer cell death by pyroptosis.

Key words: Pyroptosis, LXR, Caspase-1, NLRP3, Pannexin 1, Colon Cancer

Abbreviations: 7-AAD: 7-Amino-Actinomycin D; ABCA1: ATP-Binding Cassette transporter A1; ABCG1: ATP-Binding Cassette transporter G1; ASC: Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD domain; CAC: colitis-associated cancer; CARD: Caspase Activation and Recruitment Domain; FAS: Fatty Acid Synthase; LDL: Low Density Lipoprotein; LXR: Liver X Receptor; NLRP3: Nod-Like-Receptor Pyrin domain containing 3; PLA: Proximity Ligation Assay; PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor; PS: Phosphatidylserine; RXR: Retinoid X Receptor; shRNA: Short Hairpin RNA; siRNA: Small interfering RNA; Skp2: S-phase–associated kinase protein-2; VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel.

INTRODUCTION

Liver X Receptor α (LXRα) and β belong to the nuclear receptor family. LXRα is expressed primarily in the liver, intestine, adipose tissue, and macrophages, whereas LXRβ is widely expressed in all tissues. They function as transcription factors through heterodimerization with RXR (Retinoid X Receptor). After activation by natural ligands, such as oxysterols, they increase the expression of target genes encoding proteins implicated in lipid metabolism and more particularly in cholesterol efflux (e.g. abca1 and abcg1) or fatty acid synthesis (e.g. fas)[1].

It has been shown that LXRs are expressed in different cancer cell types and are implicated in cell proliferation and cell death in vitro and in vivo. In prostate and breast cancer cells, the synthetic ligand of LXR, T0901317, induces a decrease in skp2 expression leading in turn to the stabilization of p27 and the arrest of cells in G1 phase[2, 3]. In mice, T0901317 treatment leads to a delay in androgen-dependent and androgen independent tumor development[3, 4]. More recently, T0901317 has also been described to repress AKT pathway, leading to apoptosis of LNCaP prostate cancer cells[5]. T0901317 could also reverse oxidized LDL induced proliferation of many ovarian cancer cell lines[6] and could disturb cholesterol homeostasis by reducing LDL uptake and upregulating cholesterol efflux, both leading to glioblastoma cell death[7]. Finally, LXRs were shown to be able to decrease colon cancer cell proliferation through inhibition of the oncogenic activity of β-catenin[8] or by modulating the expression of cell cycle regulators[9].

However a common feature of these reports is that all these mechanisms only involved the transcriptional activity of LXR. Our study unravels a new non transcriptional function of LXR and shows that synthetic and natural LXR agonists could induce colon cancer cell death through caspase-1 activation. LXR ligands induce ATP release through a direct interaction of LXRβ with pannexin 1. Extracellular ATP then activates P2X7 receptor, leading to caspase-1 activation using the NOD-like receptor NLRP3 and the adaptor ASC. Finally, T0901317 treatment of tumor bearing mice slows down tumor progression in an LXRβ, caspase-1, NLRP3 and pannexin 1-dependent manner.

RESULTS

LXR agonists induce colon cancer cell death

We first tested the effect of the LXR agonist T0901317 on cell viability of four human colon cancer cell lines (HCT116, HT29, HCT8 and SW480) that all express both LXRα and LXRβ isoforms (Supplementary Figure 1). We showed that this agonist had a dose- and time- dependent effect on cell viability (Figure 1A and Supplementary Figure 2). The effect of T0901317 was largely due to its capacity to induce cell death. Indeed, T0901317 induced apoptotic cell death as measured by phosphatidylserine (PS) exposure (annexin V+ cells) and more importantly necrotic cell death as measured by cell membrane rupture (annexin V+/7-AAD+ cells) (Figure 1B). This was confirmed by the induction of cell permeabilization (Trypan blue staining and LDH release) and by chromatin condensation and fragmentation (Hoechst staining and subG1 detection) (Figure 1C and 1D and Supplementary Figure 3). Other LXR agonists, such as the synthetic compound GW3965 and the natural ligand 25- hydroxycholesterol (25OH-chol) also had the capacity to induce cell death in HCT116 cells (Figure 1E). The effect of T0901317 was abrogated by silencing the expression of the isoform β (but not isoform α), showing that it specifically depends on LXR and more particularly on LXRβ (Figure 1F). These results show that LXR agonists induce colon cancer cell death, and more particularly necrotic-like cell death.

LXR agonists induced cell death is mediated by caspase-1

To extend the mechanism responsible for LXR agonist induced cell death, we first check whether caspases were activated in our model. T0901317 induced an early caspase-1 activation (within the first hour of treatment) and a late caspase-7 activation whereas no caspase-3, -8 nor -9 activation could be detected, using specific antibodies targeting cleaved/activated caspases by western blot (Figure 2A). This was confirmed with the FLICA fluorescent probes specific for activated caspase-1 or caspase-3/7 (Figure 2B). Caspase-1 activation was also observed with other LXR ligands as assessed by FLICA-1 measurement and also by the detection of the cleaved caspase-1 p20 fragment by western blotting (Figure 2C). LXRβ silencing

inhibited caspase-1 activation, confirming that LXRβ was required for T0901317-mediated effects (Figure 2D). Moreover, the silencing of caspase-1 (by shRNA) nhibited T0901317 induced cell death and more specifically necrotic-like cell death, as shown by the more important effect of caspase-1 silencing on membrane permeabilization (annexin V+/7-AAD+ cells) than on PS exposure (annexin V+/7-AAD-cells) (Figure 2E). Caspase-1 and -7 activation and membrane permeabilization are two main features of pyroptotic cell death[10]. The involvement of pyroptosis in T0901317-mediated cell death was confirmed by cell swelling until becoming a balloon-shaped vesicle around the nucleus (Supplementary Figure 4). Finally the transcriptional effect of T0901317 on HCT116 cells was tested. We found that mRNA expression of LXR target genes (i.e. srebf1 and abca1) was induced after 24 hours of treatment and not after one hour when caspase-1 was already activated. The well-known transcription inhibitor actinomycin D can inhibit these effects on target genes, but had no effect on LXR ligand-mediated cell death (Supplementary Figure 5). All in all, these experiments show that LXR ligands induce pyroptosis of colon cancer cells, independently of any transcription activity.

LXR agonist induced cancer cell pyroptosis is mediated by the NLRP3 inflammasome- dependent activation of caspase-1

Caspase-1 is classically activated within the macromolecular complex called inflammasome. The well characterized NLRP3 inflammasome (which contains NLRP3, ASC and caspase-1) is known to be activated by autologous signals[11]. All the NLRP3 inflammasome components were expressed in colon cancer cells (Figure 3A). One of the main inflammasome activation marker is the oligomerization of ASC in a large structure called ASC pyroptosome, which could be isolated by chemical crosslinking with disuccinimidyl suberate[12]. HCT116 cell treatment by T0901317 induced the formation of ASC pyroptosome after 1 hour of treatment (Figure 3B). Moreover, silencing NLRP3 or ASC decreased the ability of T0901317 to induce cell membrane permeabilization and caspase-1 activation, suggesting that the NLRP3 inflammasome is required for caspase-1 activation and pyroptosis induction in our model (Figure 3C). The NLRP3 inflammasome assembly can be mediated by ROS production, lysosome permeabilization (and cathepsin B activation) or activation of the ATP-mediated P2X7 receptor pathway11. The inhibition of ROS generation (with

N-Acetyl Cystein or Apocynin or by silencing VDAC1 or VDAC2), lysosome acidification (with bafilomycin A) or cathepsin B activation (with CA-074Me) had no effect (Figure 3D and Supplementary Figure 6). On the other hand, the inhibition of P2X7 pathway using oxidized ATP (an antagonist of the P2X7 receptor) limited the cytotoxic effect and caspase-1 activation induced by T0901317 (Figure 3D). The importance of P2X7 was confirmed by silencing its expression (Figure 3E). Overall, T0901317 induces cancer cell pyroptosis through P2X7-mediated NLRP3 inflammasome activation of caspase-1.

ATP release is required for LXR agonist induced caspase-1 activation and cancer cell deat

Because P2X7 activation can be mediated by extracellular ATP[13], we tested whether LXR agonists could induce ATP release from colon cancer cells. Indeed T0901317, GW3965 and 25-hydroxycholesterol were all able to induce transient ATP release from HCT116 cells, within the first 10 minutes of ligand exposure (Figure 4A and 4B). ATP release has been described to be mediated through the opening of pannexin 1 channel14. T0901317 was able to induce pannexin 1 opening as assessed by YO-PRO-1 internalization (Supplementary Figure 7). In addition, the pharmacological inhibition of pannexin 1 with carbenoxolone (CBX) or probenecid (Prob) or the silencing of pannexin 1 expression with siRNA, inhibited ATP release (Figure 4C and 4D) showing that pannexin 1 is implicated in T0901317-mediated ATP release. This effect was also dependent on the β isoform of LXR as LXRβ silencing also inhibited ATP release from HCT116 cells (Figure 4D). Finally, inhibition of pannexin 1-mediated ATP release using inhibitors (Figure 4E and 4F) or siRNA (Figure 4G and 4H) also impeded T0901317 induced cell death and caspase-1 activation. Thus, LXR agonists induce ATP-dependent caspase-1 activation through pannexin 1 channel opening.

LXR agonist mediates the interaction of LXRβ with pannexin 1

We next wondered how activated LXRβ can directly open pannexin 1. We first showed that LXRβ was partly localized at the plasma membrane level, as detected by the co-localization of LXRβ with cholera toxin in untreated HCT116 cells by immunofluorescence studies (Figure 5A). Moreover, we isolated plasma membrane-

enriched fractions from untreated or T0901317-treated HCT116 cells. At the basal level, such as pannexin 1, LXRβ was already present in this fraction but no accumulation of LXRβ at the membrane could be observed under T0901317 treatment (Supplementary Figure 8). Secondly, surface plasmon resonance experiments suggested that LXRβ and the C-terminal domain of pannexin 1 could associate in vitro (Figure 5B). Co-immunoprecipitation experiments also support this observation, as LXRβ could interact with endogenous pannexin 1 within 10 minutes of T0901317 treatment (Figure 5C and Supplementary Figure 9). This interaction was confirmed in HCT116 cells by Proximity Ligation Assay (PLA) as observed with the presence of fluorescent dots (representative of LXRβ – pannexin 1 heterodimerization foci) at the plasma membrane level in cells treated for 10 minutes with T0901317 (Figure 5D and 5E). Thus all these experiments show that LXRβ interacts with pannexin 1 to trigger ATP release. LXR agonist reduces tumor growth in mice. With the objective to determine whether LXR agonists could also have an effect on tumor growth in vivo, we tested the effect of T0901317 on murine CT26 colon cancer cells. First we observed that T0901317 induced pyroptosis stigmata, i.e. membrane permeabilization and caspase-1 activation, in CT26 cells in vitro (Figure 6A and 6B). These phenomena were abrogated when LXRβ, NLRP3 or caspase-1 were silenced (Figure 6A and 6B). As observed in human colon cancer cells, T0901317 was also able to induce transient ATP release (Figure 6C) and the pannexin 1 inhibitor probenecid could also block LXR agonist-mediated cell death and caspase-1 activation (Figure 6D and 6E). To determine whether LXR agonists could have an effect on tumors, Balb/c mice were s.c. injected with CT26 cells, treated i.p. with probenecid or vehicle. After 20 days, tumors were collected, dissociated and treated or not with T0901317 ex vivo. We observed that caspase-1 was specifically activated by T0901317 in CD45- tumor cells, and not in CD45+ hematopoietic infiltrating cells in a pannexin 1-dependent manner (Supplementary Figure 10). Then, Balb/c mice s.c. injected with CT26 cells were daily treated i.p. with 30 or 60mg/kg T0901317 or the vehicle. T0901317-treated mice presented a reduced tumor growth compared to tumor bearing mice treated with the vehicle (Figure 7A). This observation correlated with a higher caspase-1 activation in tumor cells from T0901317-treated mice (Figure 7B). Moreover, the tumor growth was not affected by LXR agonist when mice were treated concomitantly with probenecid, suggesting that pannexin 1 was involved in T0901317-mediated effects on tumor growth (Figure 7C).

Finally, we observed that T0901317 had no effect on tumor growth when CT26 cells were transfected with shRNA targeting either LXRβ, NLRP3 or caspase-1, as compared with cells transfected with control shRNA (Figure 7D). Altogether our results demonstrate that T0901317 can reduce tumor growth by inducing LXRβ, pannexin 1 and NLRP3-dependent caspase-1 activation pathway, specifically in tumor cells.

DISCUSSION

This study reports for the first time that LXR agonists can induce the association of LXRβ with pannexin 1 in colon cancer cells. This interaction triggers the opening of pannexin 1 and subsequent ATP release. Then, extracellular ATP activates the P2X7 pathway, leading to caspase-1 activation through assembly of the NLRP3 inflammasome and eventually to cell death (Figure 8). The LXR agonist-induced features are characteristics of pyroptosis, i.e. ATP release, caspase-1 activation and to a less extent late caspase-7 activation, membrane permeabilization and chromatin fragmentation [10]. To our knowledge, this is the first time that pyroptosis could be chemically induced in cancer cells, without any bacterial or viral infection. Moreover the treatment of tumor bearing mice with LXR agonist decreases tumor growth in an LXRβ, caspase-1, NLRP3 and pannexin 1-dependent manner. It has been previously suggested that LXR could be a powerful target in cancer treatment [15]. Many studies have shown that LXR agonists could inhibit cancer cell proliferation by modulating cell cycle protein expression2, through caspase-3-dependent apoptosis [8, 9, 16] and / or induce cancer cell death, mainly [5, 7]. We demonstrate here for the first time that LXR agonist activation of LXRβ can induce pyroptotic cell death through an NLRP3 inflammasome-dependent caspase-1 activation pathway. This effect seems to be quite surprising, as many studies report that LXR is mainly a negative regulator of inflammation by downregulating the expression of selective inflammatory genes (e.g. il1b, il6, inos, cox2, mmp9, mcp1, mcp3) through a process that involves DNA interaction, known as transrepression[17, 18]. Here we show that LXRβ is localized in the cytoplasm and has a non-genomic effect on the plasma membrane pore pannexin 1 (by direct interaction and activation) within the first minutes of agonist treatment, ruling out any transcriptional activity of LXR in our model. Some non-genomic effects of LXRβ were previously described. First, LXR ligands present anti-

thrombic effects, through interaction of LXRβ with Syk, PLC-γ2 and PPAR-γ leading to the regulation of platelet functions[19]. Secondly, Hozoji et al. described that in THP-1 cells, LXRβ is associated with ABCA1 at the plasma membrane level and that 9 under agonist treatment, LXRβ dissociates from ABCA1 to promote cholesterol efflux and translocates to the nucleus to exert its transcriptional activity[20, 21]. The cytoplasmic and sub-membrane localization of LXRβ could account for its interaction with the intra-cellular C-terminal domain of pannexin 1. Chekeni et al. have described that this domain is responsible for the maintaining of the closed conformation of this pore and that the cleavage of this portion by caspase-3 leads to the opening of pannexin 1 and ATP release 14. Our results suggest that the opening of pannexin 1 could not only be induced by caspase-3 cleavage and removal of the C-terminal domain, but also by the ability of LXRβ to cover this domain. The importance of inflammasome components in colon cancer carcinogenesis was reported in colitis-associated cancer (CAC) experiments[22, 23, 24]. These studies show that mice deficient in NLRP3, ASC, or caspase-1 were more susceptible to colitis and CAC. This effect is partially due to the hematopoietic compartment, but Zaki et al. demonstrated that NLRP3 signaling in non-hematopoietic cells (mucosal epithelial cells) is critical for protection against Dextran Sulfate Sodium injury[23]. Even if the effects of NLRP3 in this context are dependent on caspase-1 and mature IL18 the real molecular mechanisms and its effects on established tumors remain unknown. Here we provide evidences for the importance of NLRP3, caspase-1 and ASC within cancer cells themselves in the effects of LXR agonist on tumoral growth in vivo and on cell death in vitro.

Recently, it has been demonstrated that activation of caspase-1 not only leads to inflammation, but in certain circumstances causes an inflammatory form of cell death called pyroptosis. Pyroptosis was first described in myeloid cells infected by pathogens or bacteria and was also characterized by an early membrane permeabilization and the release of the cytoplasmic content into the extracellular environment acting as a danger signal for neighboring immune cells [25]. Among these signals, pyroptotic cells can release “find-me signals”, such as ATP, that will attract macrophages and facilitate the phagocytosis of dead cells [26]. In addition we have previously shown, that LXR agonists could induce the expression of transglutaminase 2 in macrophages, through an LXRα/RARα-dependent mechanism,

leading to an increased efficacy of dead cell efferocytosis[27]. This raises the hypothesis that LXR ligands could control cancer cell growth 1) by inducing LXRβ-dependent pyroptosis of cancer cells and 2) by activating LXRα in macrophages and promoting the phagocytosis of dying cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human colorectal carcinoma HCT116, colorectal adenocarcinoma HT29, HCT8 and SW480, murine colon carcinoma CT26 and epithelial human HEK293T cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All colon cancer cell lines were grown in RPMI 1640 with ultraglutamine (Lonza) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Lonza) and with Pen/Strep Amphotericin B (PSA, Lonza) 1%. HEK293T cells were grown in DMEM 4,5g/L glucose (Lonza) with 10% FBS. All cell lines were grown in an atmosphere of 95% air and 5% CO2 at 37°C.

Reagents

T0901317 was purchased from Bertin Pharma and dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich). GW3965 (G6295) and 25-hydroxycloesterol (25-OH chol, H1015) were purchased from Sigma-Aldrich. GW3965 was dissolved in DMSO and 25-OH chol in 100% ethanol. Staurosporine, Oxidized ATP (A 6779), Bafilomycin A1 (B1793), carbenoxolone (C4790), N-acetyl cysteine (A7250) and ATP (A7699) were all purchased from Sigma-Aldrich. Apocynin (17838) was obtained from Merck, Cathepsin B inhibitor (CA074Me) from Calbiochem, Flag-TRAIL from Enzo Life sciences and water soluble probenecid (FP-288653) from Interchim.

Viability assay

Cells were seeded in 24 wells dishes (Falcon) at 50000 cells/mL the day before treatment with LXR agonists. After treatment, cells were washed two times with PBS and fixed with 100% ethanol for 30 minutes before crystal violet staining. Crystal

violet was then resuspended in 33%acetic acid and OD was read at 590nm with a Wallac 2 spectophotometer (PerkinElmer).

Cell death determination

For Annexin V/7-AAD labeling, cells were seeded in 24 well dishes as described above. After treatment with different LXR agonists for 24 hours, cells were harvested and washed two times with cold PBS and then incubated with Annexin V (FITC) / 7-AAD kit (BD Biosciences) according to manufacturer's protocol. Annexin V binding and 7-AAD incorporation were detected by an LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using Flowjo software. Staining of nuclear chromatin with Hoechst 33342 was used for identification of morphologic changes by fluorescence microscopy. Cell viability was also determined by using a trypan blue dye exclusion assay. For LDH release assay, cells were seeded the day before treatment with LXR agonists and treated in optimem medium (Invitrogen) during 24 hours. The supernatant was harvested, centrifuged 4 minutes at 420g and finally incubated with Cytotox96-release kit (Promega G1780) according to manufacturer's instructions.

Caspase Activity

To assess caspase-1, or caspase-3/7 activity, the FAM-YVAD-FMK or SR-DEVD-FMK fluorescent probes (AbdSerotec) binding to cleaved caspases were used according to the manufacturer's instructions. Briefly, 250000 cells were concomitantly incubated with probes for 1 hour during the final hour of treatment with LXR agonists and then washed two times in apoptosis buffer before flow cytometry analysis.

ATP supernatant assay

Cells were incubated for the indicated times with either vehicle or different LXR agonists in RPMI 1640, 1% BSA, 10mM Hepes (Gibco) medium. Cell suspensions were then centrifuged at 425g for 3 minutes at room temperature. Supernatants were transferred to a fresh tube. ATP measurement was done on supernatants using a luciferase/luciferine assay (G7570) from Promega according to the manufacturer's instructions with a Wallac 2 luminometer (PerkinElmer).

ASC pyroptosome purification

ASC complexes were isolated as previously described[28]. 3 10^6 cells were treated during indicated times in 6 wells plate and harvested by scrapping, then washed in ice-cold PBS and resuspended in 500 µL ice-cold buffer (20 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 1% NP-40 0.1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate and complete protease inhibitor mixture [CPIM], Roche). Cells were lysed by shearing 10 times through a 21 gauge needle and centrifuged at 330g for 10 min. at 4°C. The pellets were washed twice in 1 mL ice-cold PBS (centrifuged 330g for 3 min. at 4°C) and resuspended in 500 µL PBS. Four mM disuccinimydyl suberate (DSS from a fresh 100 mM stock prepared from DSS equilibrated to RT and made up in dry DMSO) were added and the pellets were incubated at RT for 30 min. with rotation. The samples were then centrifuged at 330g for 10 min. at 4°C. The supernatant was removed and the cross-linked pellets were resuspended in 30 µL Laemmli sample buffer. The samples were boiled for 5 min at 95°C and analysed by Western blotting.

Immunoprecipitation

Cells (50 × 10^6) were lysed in 1 mL lysis buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 15 mM KCl, 1% CHAPS, 5mM MgCl2, 1mM EDTA, 1mM EGTA and complete protease inhibitor mixture [CPIM]) for 30 minutes on ice. After centrifugation at 14 000g at 4°C for 30 minutes, supernatants were precleared during 2 hours at 4°C in the presence of 30 µL of mixed Sepharose 6B (6B100, Sigma Aldrich) and protein G (17-0618-01, Amersham). After centrifugation at 1000g for 3 minutes the supernatant was incubated with anti-LXRβ antibody (PP-K8917, Perseus Proteomics) antibody (2 µg/mL) at 4°C for 20 hours and during the last hour with 40 µL of mixed Sepharose. The precipitates were washed 4 times in lysis buffer and analyzed by immunoblotting.

Western blotting

Whole-cell lysates were prepared as described previously[29], by lysing the cells in boiling buffer (1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris [pH 7.4]) in the presence of complete protease inhibitor mixture. The viscosity of the samples was reduced by sonication. Whole-cell lysates or immunoprecipitation samples were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE), and electroblotted to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). After incubation for 2 hours at RT by 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS)–0.1% Tween-20, membranes were incubated overnight with the primary antibody diluted in TBS-milk-Tween, washed, incubated with the secondary antibody

for 30 minutes at RT, and washed again before analysis with a chemiluminescence detection kit (Amersham). The following mouse mAbs were used: anti–β-actin (A1978) and anti-Flag M2 (F3165) from Sigma-Aldrich, anti-pannexin-1 (H00024145-M07) from Abnova, anti- LXRβ (PP-K8917-00) from Perseus Proteomics, anti-NLRP3 (AG-20B-0014) and anti-caspase-1 (AG-20B-0048) from Adipogen. We also used rabbit pAbs anti-ASC (AL177) from Enzo life sciences, anti-cleaved caspase-3 (9661), anti-cleaved caspase-7 (9491), anti-cleaved caspase-8 (9496) and anti-cleaved caspase-9 (9501) from Cell Signaling Technology. Secondary Abs HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse and swine anti-rabbit immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch) were also used.

Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). One hundred to 300 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase, Random Primers and RNAseOUT inhibitor (Invitrogen). cDNA were quantified by real time PCR using Power SYBR® Green Real-time PCR kit (Life Technologies) on a Fast7500 detection system (Applied biosystems). Relative mRNA levels were determined using the ΔΔCt method. Values were expressed relative to cyclophilin A, gapdh and b-actin levels. The sequences of the oligonucleotides used are described in Table S1.

Immunofluorescence (IF) and in situ Proximity Ligation Assay (PLA)

Cells (150 000) were seeded in 12 well-dishes containing a cover glass (631-0150, VWR)which was pretreated for 10 minutes with Poly-L-Lysin (P4707, Sigma Aldrich). The following day cells were treated or not with LXR agonists for the indicated times. Cells were washed, fixed with 4% PFA at 4°C for 10 minutes and permeabilized using a PBS, 0.5% BSA, 0.1% Saponin (47036, Sigma Aldrich) buffer for 20 minutes at RT. Samples were incubated 2 hours at RT with primary antibodies.

For IF experiments, cells were washed two times, and incubated with secondary Alexa488 or Alexa568 coupled anti-mouse or anti-rabbit for 30 minutes at RT. For PLA experiments, after washing primary antibodies, cells were then incubated with the appropriate probes (Sigma Aldrich) during one hour at 37°C and washed two times. Probes were then ligated for 30 minutes at 37°C, washed two times in Buffer A and amplified using the manufacturer's polymerase for 100 minutes at 37°C in the dark.

For both experiments, cover glasses were mounted on a drop of Mounting Medium containing Dapi (Duo82040, Sigma Aldrich) for 15 minutes in the dark on a microscopy slide (045796, Dutscher). Slides were imaged using a CDD equipped upright microscope (Zeiss) and 63x, 1.4NA objective.

The following antibodies were used for IF and PLA: mouse anti-pannexin 1 (1/250, H00024145-M07, Abnova), rabbit anti LXRβ (1/250, ab106473, Abcam), anti-rabbit PLUS probe (1/5, Duo92002, Sigma-Aldrich), anti-mouse MINUS probe (1/5, Duo92004, Sigma-Aldrich), goat anti-mouse Alexa488 (1/1000, A11029, Invitrogen), goat anti-rabbit Alexa568 (1/1000, A11036, Invitrogen), donkey anti-mouse Alexa568 (1/1000, A10037, Invitrogen). Cholera toxin (C-34775, Molecular Probes) was used to stain membranes specifically.

Plasmid constructs

The human LXRβ construct was obtained by inserting the human LXRβ (1386 bp) coding sequence in the multicloning site of the p3X-FLAG plasmid (Sigma-Aldrich). The sequences of the oligonucleotides used are described in Supplementary Table 1.

Stable and transient transfections

Human 293T cells were transiently transfected for 24 hours with expression plasmids using the JetPRIME reagent (PolyPlus transfection), according to manufacturer's instructions. Briefly, 50 000 cells were seeded in 24-well plates one day before transfection. The next day 0.5µg of plasmid was mixed with 1µL of JetPRIME reagent in 50µL of JetPRIME buffer. After a 10 minutes incubation at room temperature, the mix was added to the cells and medium was removed and replaced 4 hours later.

The next day cells were used for T0901317 treatment and further experiments. For stable transfections, neomycin (11811-064, Gibco) was used at 200 µg/mL to select transduced cells. HCT116 cells were transfected with the INTERFERin™ transfection reagent (Polyplus transfection) according to manufacturer's instructions. Briefly, 50 000 cells were seeded in 24-well plates one day before transfection. Silencer® Select siRNAs specific for the target gene or Negative siRNA control (Life Technologies) diluted in serum-free medium were incubated with INTERFERin™ for 10 minutes at room temperature and added to the cells to a final concentration of 1 nM. Twenty four hours after transfection, the cells were treated before further experiments. The following siRNA were used: lxrα (s19568), lxrβ (s14685), nlrp3 (s41556), asc (s26509), p2x7 (s9959), pannexin-1 (s24427), vdac1 (s14769), vdac2 (s14771) or control (AM4611). Cells were transduced with MISSION Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich) to silence human caspase-1 (HCT116) or murine lxrβ, caspase-1, nlrp3 (CT26) or with negative control particles according to the manufacturer's instructions. Briefly, 16 000 cells were plated in 96 well plates and the next day, lentiviral particles (Multiplicity of Infection tested between 0.5 to 5) were added in the presence 8µg/mL of hexadimethrine bromide (Sigma-Aldrich) for 20 hours. Then, the medium was removed and replaced with fresh medium containing 5 (HCT116) or 10µg/mL (CT26) of puromycin (Sigma-Aldrich) every 3 days until resistant colonies were obtained.

Surface Plasmon Resonance analysis

The design and fabrication of homemade chips compatible with surface plasmon resonance was performed as previously published with the help of the MIMENTO technological platform (Besançon, France) [30]. Biacore experiments were performed with the Biacore 2000 apparatus (GE Healthcare) at 25°C with a flow rate of 2 to 30 µl/min. Human LXRβ and rat serum albumin (both at 10 µg/ml) were immobilized on chemically activated self-assembly monolayers of 11-mercapto-1-undecanol (11-MUOH) and 16-mercapto-1-hexadecanoic acid (16-MHA) (90/10 by mole). Real-time monitoring allowed the control of 8.8 and 8.1 femtomoles per mm2 of immobilized proteins in each experiment. Ten nM of human LXRβ were injected at 20µL/min in PBS 0.05% Tween (pH7.4) buffer according to the Kinject procedure (association time, 3 min; dissociation time, 3 min).

Mice

All animals were bred and maintained according to both the FELASA and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, France). Animals used were between 6 and 22 weeks of age. Female BALB/c mice (aged 6 to 8 weeks) were obtained from Charles River Laboratories. One million cells of either CT26 WT or shCT26 were subcutaneously injected in a volume of 100µL of PBS. Tumors were measured with caliper three times a week. Some mice were treated daily with i.p. injections of T0901317 (30mg/kg or 60mg/kg, dissolved in 50% DMSO and 50% PBS) or vehicle (50% DMSO, 50% PBS). Some mice were treated with daily i.p. injections of probenecid (200mg/kg) dissolved in PBS or vehicle alone.

Statistical analyses

In vitro results are shown as means ± s.d., in vivo results are shown as means ± s.e.m. and comparisons of datasets were performed using unpaired Student's t test (test group compared to control group). For human experiments, paired t test was used to compare samples from the same patients before and after one hour of T0901317 treatment. Differences in survival in the tumor growth experiments were assessed using Log rank (Mantel-Cox) test. We performed statistical calculations with GraphPad Prism 5. All P values were two tailed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank JM Lobaccaro for providing material. This work was supported by Ligue contre le cancer comité Grand-Est and by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021 (Lipstic Labex). FG team is « Equipe labelisée Ligue Nationale Contre le Cancer ». V.D. is the recipient of a « poste d'accueil INSERM ». The authors are supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (F.C., F.V. and S.C.), the Association pour la Recherche Contre le Cancer (ARC) (M.B., G.M.), the Conseil Régional Bourgogne/INSERM (H.B.).

REFERENCES

1- Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2007, 61: 736-759.

2- Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. Carcinogenesis 2009, 30(4): 575-579.

3- Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. Cancer research 2004, 64(21): 7686-7689.

4- Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, Liao S. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. Cancer research 2006, 66(13): 6482-6486.

5- Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. Oncogene 2010, 29(18): 2712-2723.

6- Scoles DR, Xu X, Wang H, Tran H, Taylor-Harding B, Li A, et al. Liver X receptor agonist inhibits proliferation of ovarian carcinoma cells stimulated by oxidized low density lipoprotein. Gynecologic oncology 2010, 116(1): 109-116.

7- Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, et al. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. Cancer discovery 2011, 1(5): 442-456.

8- Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, et al. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. Biochemical pharmacology 2009, 77(2): 186-195.

9- Sasso GL, Bovenga F, Murzilli S, Salvatore L, Di Tullio G, Martelli N, et al. Liver X Receptors Inhibit Proliferation of Human Colorectal Cancer Cells and Growth of Intestinal Tumors in Mice. Gastroenterology 2013.

10- Kepp O, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? European journal of immunology 2010, 40(3): 627-630.

11- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell 2010, 140(6): 821-832.

12- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. Cell death and differentiation 2007, 14(9): 1590-1604.

13- Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. Cancer Res 2012, 72(21): 5441-5447.

14- Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. Nature 2010, 467(7317): 863-867.

15- Chuu CP. Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. Med Hypotheses 2011, 76(5): 697-699.

16- Kokontis JM, Hay N, Liao S. Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. Mol Endocrinol 1998, 12(7): 941-953.

17- Pascual-Garcia M, Valledor AF. Biological roles of liver X receptors in immune cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2012, 60(4): 235-249.

18- Zhu R, Ou Z, Ruan X, Gong J. Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (review). Mol Med Rep 2012, 5(4): 895-900.

19- Spyridon M, Moraes LA, Jones CI, Sage T, Sasikumar P, Bucci G, et al. LXR as a novel antithrombotic target. Blood 2011, 117(21): 5751-5761.

20- Hozoji M, Munehira Y, Ikeda Y, Makishima M, Matsuo M, Kioka N, et al. Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux. J Biol Chem 2008, 283(44): 30057-30063.

21- Hozoji-Inada M, Munehira Y, Nagao K, Kioka N, Ueda K. Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. J Biol Chem 2011, 286(22): 20117-20124.

22- Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. J Exp Med 2010, 207(5): 1045-1056.

23- Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. Immunity 2010, 32(3): 379-391.

24- Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KS, McIntire CR, LeBlanc PM, et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. Immunity 2010, 32(3): 367-378.

25- Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 2012, 28: 137-161.

26- Wang Q, Imamura R, Motani K, Kushiyama H, Nagata S, Suda T. Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. International immunology 2013, 25(6): 363-372.

27- Rebe C, Raveneau M, Chevriaux A, Lakomy D, Sberna AL, Costa A, et al. Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. Circulation research 2009, 105(4): 393-401.

28- Coll RC, O'Neill LA. The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. PloS one 2011, 6(12): e29539.

29- Rebe C, Cathelin S, Launay S, Filomenko R, Prevotat L, L'Ollivier C, et al. Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. Blood 2007, 109(4): 1442-1450.

30- Boireau W, Rouleau A, Lucchi G, Ducoroy P. Revisited BIA-MS combination: entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. Biosens Bioelectron 2009, 24(5): 1121-1127.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: LXR agonists induce human colon cancer cell death by an LXRβ-dependent mechanism. (A-B) Dose-effect of a 24 hour T0901317 treatment at indicated concentrations in different human colon cancer cell lines analyzed by (A) crystal violet coloration (cell viability) or (B) Annexin V/7-AAD staining and flow cytometry analysis. (C-D) Dose-effect of a 24 hour T0901317 treatment at indicated concentrations in HCT116 cells on (C) the percentage of positive cells for chromatin condensation and fragmentation (Hoechst staining – black bars) or trypan blue staining (gray bars) and (D) LDH release. (E) Percentage of Annexin V/7-AAD positive HCT116 cells after a 24 hour treatment of T0901317 (20µM), GW3965 (30µM) or 25 hydroxycholesterol (25-OH chol - 50µM). (F) Effect of LXR siRNA on percentage of Annexin V/7-AAD positive HCT116 cells after 24 hours of treatment with 20µM of T0901317. Inset: siRNA knock-down efficiency evaluated by QPCR and normalized to a set of housekeeping genes. Data are the mean of at least three independent experiments ± s.d.. Statistics compare T0901317 treated LXR siRNA with T0901317 treated control siRNA: *, $p < 0.05$, n.s, not significant using two tailed t test.

Figure 2: LXR agonists induce human colon cancer cell death by a caspase-1-dependent mechanism. (A) Western blot analysis of cleaved caspase-1, -3, -7, 8 and -9 in HCT116 cells treated with 20µM of T0901317 at indicated times. ATP (5mM - 1 hour for caspase-1) or TRAIL (200ng/mL – 6 hours for other caspases) were used as

positive controls (C+). β-Actin was used as a loading control. Numbers indicate molecular masses in kilodaltons. (B) Measurement of caspase-1 or caspase-3/7 activation in HCT116 cells treated with 20µM of T0901317 at indicated times by FLICA-1 or FLICA-3/7 staining and flow cytometry analysis. ATP (5mM - 1 hour) or Staurosporine (2µM – 18 hours) were used as positive controls (C+). (C) Measurement of caspase-1 activation after a one hour treatment using LXR agonists (as in Figure 1E), using FLICA-1 staining (upper panel) and western blotting (lower panel). β-Actin was used as a loading control. Numbers indicate molecular masses in kilodaltons. (D) Effects of LXRβ siRNA on caspase-1 activation (FLICA-1) in HCT116 cells treated for one hour with 20µM of T0901317. (E) Effects of caspase-1 shRNA on the percentage of Annexin V/7-AAD positive HCT116 cells after 24 hours of treatment with 20µM of T0901317. Data are the mean of at least three independent experiments ± s.d.. Statistics compare T0901317 treated controls with other treated conditions: **, $p < 0.005$, ***, $p < 0,001$, using two tailed t- test.

Figure 3: LXR agonists induce NLPR3 inflammasome mediated caspase-1 activation and cell death by a P2X7-dependent mechanism. (A) Western blot analysis of NLRP3, procaspase-1 and ASC expression in HCT116 cells treated or not for 1 hour with 20µM of T0901317. β-Actin was used as a loading control. Numbers indicate molecular masses in kilodaltons. (B) Western blot analysis of ASC crosslinked pellets in HCT116 treated with 20µM of T0901317 at indicated times. Numbers indicate molecular masses in kilodaltons. (C-E) After siRNA transfection or inhibitor pretreatments, HCT116 were treated with 20µM of T0901317 for 24 hours and stained with 7-AAD (cell death) or treated for one hour with 20µM T0901317 and stained with FLICA-1 (caspase-1 activity). (C) Effects of siRNA targeting the inflammasome components ASC and NLRP3 on 7-AAD (upper panel) or FLICA-1 (lower panel) positive HCT116 cells after T0901317 treatments. Inset: siRNA knock-down efficiency evaluated by QPCR and normalized to a set of housekeeping genes. (D) Effects of NLRP3 inflammasome inhibitors NAC (10mM), Apocynin (100µM), Bafilomycin A1 (10nM), Cathepsin B inhibitor (CA074Me, 33µM) and oxidized ATP (300µM) on 7-AAD (upper panel) or FLICA-1 (lower panel) positive HCT116 cells. (E) Effects of siRNA targeting P2X7 on 7-AAD (upper panel) or FLICA-1 (lower panel)

positive HCT116 cells. Inset: siRNA knock-down efficiency as in (C). Data are the mean of at least three independent experiments ± s.d.. Statistics compare T0901317 treated conditions with T0901317 treated controls: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$, ***, $p < 0{,}001$, n.s, not significant using two tailed t test.

Figure 4: LXR agonists induce ATP release through pannexin 1. (A-B) ATP quantification in HCT116 cell supernatant after a 20µM T0901317 treatment at indicated times (A) or after T0901317 (20µM) or GW3965 (30µM) or 25 hydroxycholesterol (25 OH-chol - 50µM) treatments for 10 minutes (B). (C-D) ATP quantification in HCT116 cells supernatants after carbenoxolone (CBX – 100µM) or probenecid (Prob – 500µM) pretreatments (C) or siRNA targeting LXRβ or pannexin 1 (panx1) transfection (D) and subsequent T0901317 treatment at 20µM for 10 minutes. Inset: siRNA knock-down efficiency evaluated by QPCR and normalized to a set of housekeeping genes. (E-F) Effects of carbenoxolone (CBX – 100µM) or probenecid (Prob – 500µM) on 7-AAD positive HCT116 cells after 24 hours of treatment with 20µM T0901317 (E) or FLICA-1 positive HCT116 cells after one hour of treatment with 20µM T0901317 (F). (G-H) Effects of pannexin 1 siRNA on 7-AAD positive HCT116 cells after a 20µM T0901317 treatment of 24 hours (G) or FLICA-1 positive HCT116 cells after a 20µM T0901317 treatment of one hour (H). For ATP release, data are representative of at least three independent experiments ± s.d.. For other experiments, data are the mean of three independent experiments ± s.d.. Statistics compare T0901317 treated conditions with T0901317 treated controls: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$, ***, $p < 0{,}001$, using two tailed t test.

Figure 5: LXR agonists induce LXRβ and pannexin 1 interaction. (A) HCT116 immunofluorescent staining for LXRβ alone (red, upper panel) or with cholera toxin (Chol T, green, lower panel). (B) Surface plasmon resonance analysis of the binding of LXRβ to the C-terminal part of pannexin 1 protein chip (blue curve) and with RSA control chip (pink curve). (C) Immunoprecipitation using LXRβ antibody on HCT116 cells treated or not during the indicated times with 20µM T0901317 and followed by

western blot analysis using anti-LXRβ and anti-pannexin 1 antibodies. Beads (B) are negative controls without antibody for IP. Numbers indicate molecular masses in kilodaltons. (D-E) Proximity Ligation Assay (PLA) performed on HCT116 treated or not during 10 minutes with 20µM T0901317 with cholera toxin staining. (D) 3D-representation of one cell (E) Quantification of PLA dots localized in cholera toxin embossments. (A-D) Data are representative of one out of at least three independent experiments. (E) Data are the mean of three independent experiments ± s.d. with ***, p <0,001 using two tailed t test.

Figure 6: LXR agonists induce murine colon cancer cell death by an LXRβ/pannexin1/NLRP3/Caspase-1-dependent mechanism. (A) Effects of LXRβ, Nlrp3 or caspase-1 shRNA on the percentage of 7-AAD positive CT26 cells after 24 hours of treatment with 20µM of T0901317. (B) Effects of LXRβ, Nlrp3 or caspase-1 shRNA on the percentage of FLICA-1 positive CT26 cells after one hour of treatment with 20µM of T0901317. (C) ATP quantification in CT26 cell supernatants after a 20µM T0901317 treatment at indicated times. (D-E) Effects of carbenoxolone (CBX – 100µM) or probenecid (Prob – 500µM) on 7-AAD positive CT26 cells after a 20µM T0901317 treatment of 24 hours (D) or FLICA-1 positive CT26 cells after a 20µM T0901317 treatment of one hour (E). Data are the mean of at least three independent experiments ± s.d. except for ATP release with one representative of three independent experiments. Statistics compare T0901317 treated conditions with T0901317 treated controls: *, p < 0.05, **, p <0.005, ***, p <0,001, using two tailed t test.

Figure 7: LXR ligands mediate a decrease in mice tumor growth through an LXRβ/pannexin 1/NLRP3/caspase-1 dependent manner. (A-B) Effects of daily i.p. injections of 30 or 60mg/kg T0901317 on tumor growth of CT26 tumor bearing Balb/c mice (A) and FLICA-1 positive cells in the tumor at the end of the experiment (20 days) (B). (C) Effects of daily i.p. injections of 30 mg/kg T0901317 with or without 200mg/kg probenecid on tumor growth of CT26 tumor bearing Balb/c mice. (D) Effects of daily i.p. injections of 30 mg/kg T0901317 on overall survival of Balb/c mice

s.c. injected with CT26 transfected either with control shRNA (shRNA Co) or shRNA targeting LXRβ, Nlrp3 or caspase-1. Data are representative of one out of three (A-B) or one out of two (C-D) independent experiments and are the mean ± s.e.m.. Statistics compare T0901317 treated mice with untreated mice: *, $p < 0.05$, n.s, not significant, using two tailed t test. (D) Statistics compare T0901317 treated mice with untreated mice using log rank (Mantel-Cox) survival test (n.s, not significant).

Figure 8: Proposed model for LXR ligand mediated colon cancer cell death. 1) LXR ligands bind LXRβ leading to 2) its association with pannexin 1. 3) Then pannexin 1 is opened and allows ATP release. 4) Extracellular ATP binds P2X7 receptor, leading to 5) Nlrp3 inflammasome assembly (with Asc) and 6) caspase-1 activation. 7) Activated caspase-1 in turn induces colon cancer pyroptosis.

Figure 1

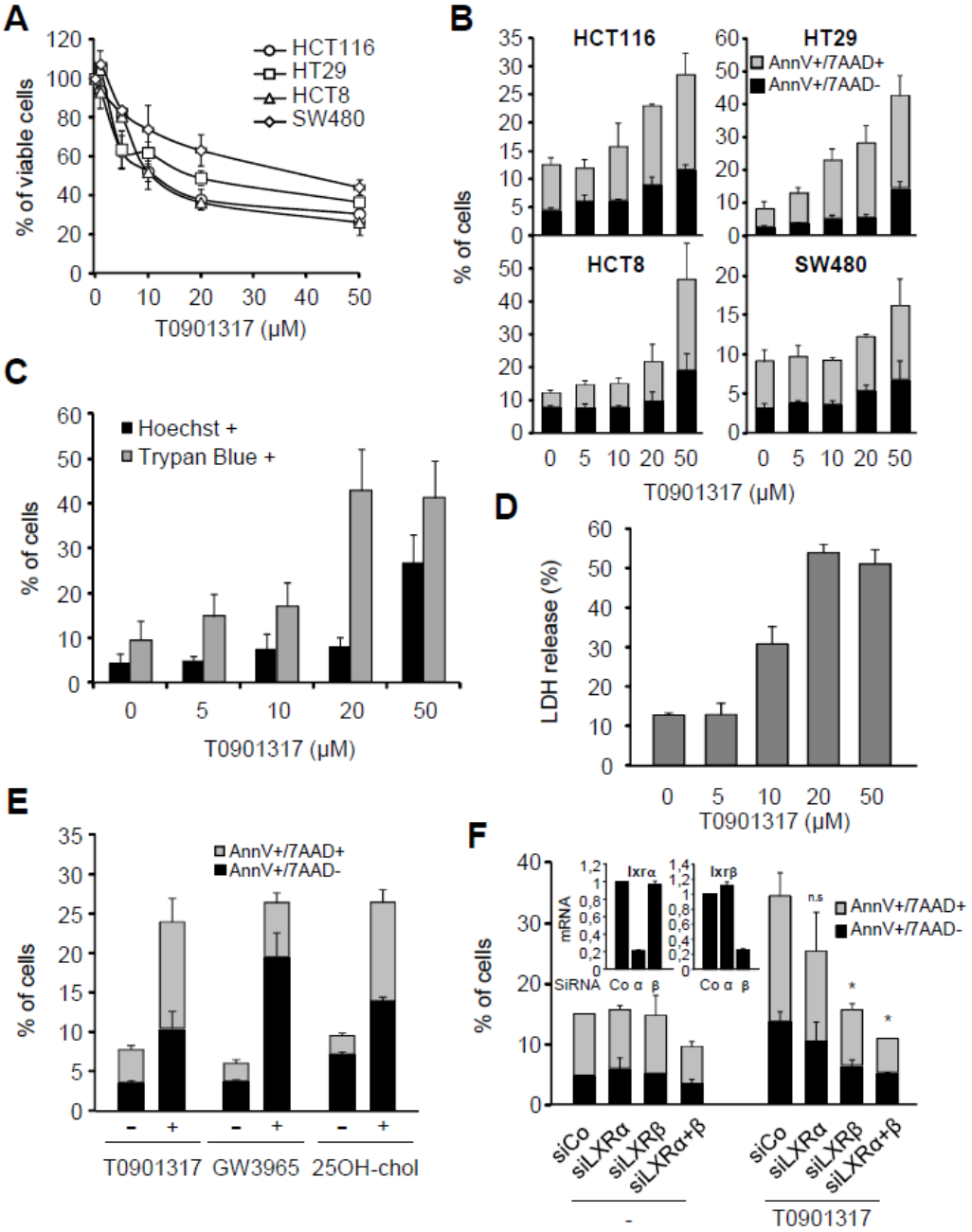

A
% of viable cells
HCT116
HT29
HCT8
SW480
T0901317 (µM)
B
HCT116
HT29
HCT8
SW480
AnnV+/7AAD+
AnnV+/7AAD-
% of cells
T0901317 (µM)
C
Hoechst +
Trypan Blue +
% of cells
T0901317 (µM)
D
LDH release (%)
T0901317 (µM)
E
AnnV+/7AAD+
AnnV+/7AAD-
% of cells
T0901317
GW3965
25OH-chol
F
% of cells
AnnV+/7AAD+
AnnV+/7AAD-
n.s
mRNA
lxrα
lxrβ
SiRNA
Co α β
siCo
siLXRα
siLXRβ
siLXRα+β
T0901317

Figure 2

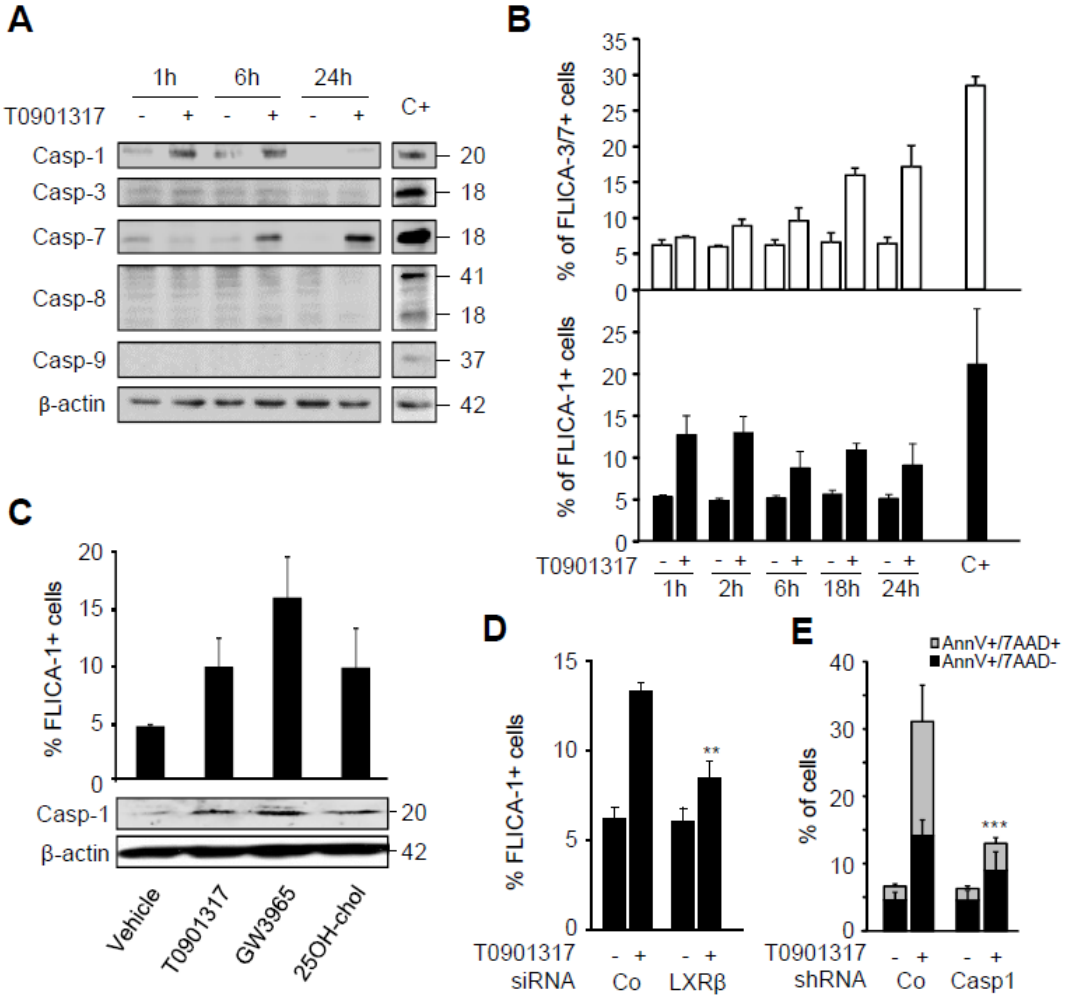

A
1h
6h
24h
T0901317
- + - + - +
C+
Casp-1
Casp-3
Casp-7
Casp-8
Casp-9
β-actin
20
18
18
41
18
37
42
B
% of FLICA-3/7+ cells
% of FLICA-1+ cells
T0901317
1h
2h
6h
18h
24h
C+
C
% FLICA-1+ cells
Casp-1
β-actin
20
42
Vehicle
T0901317
GW3965
25OH-chol
D
% FLICA-1+ cells
T0901317
siRNA
Co
LXRβ
**
E
AnnV+/7AAD+
AnnV+/7AAD-
% of cells
T0901317
shRNA
Co
Casp1
***

Figure 3

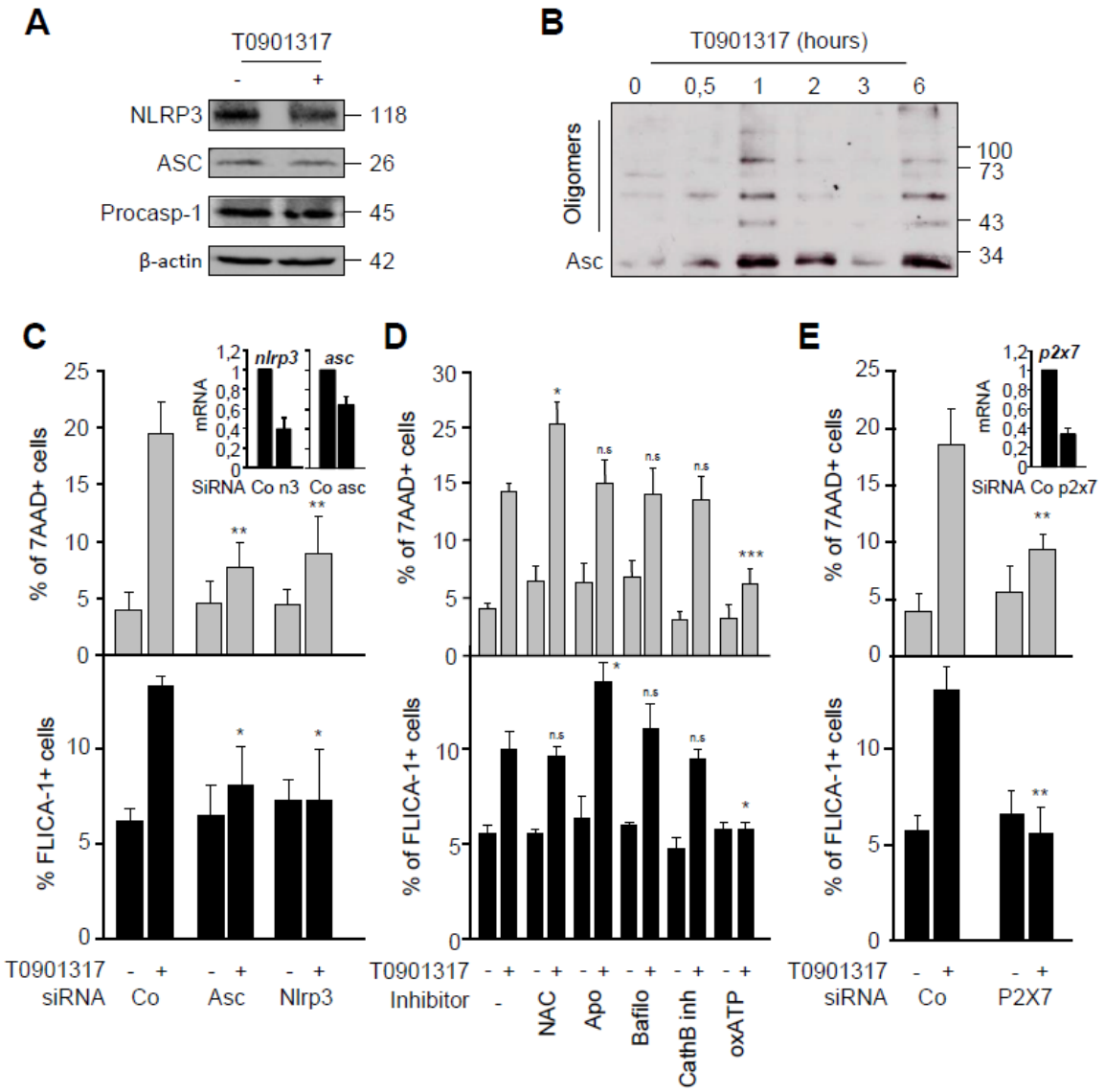

A
T0901317
-
+
NLRP3
ASC
Procasp-1
β-actin
118
26
45
42
B
T0901317 (hours)
0
0,5
1
2
3
6
Oligomers
Asc
100
73
43
34
C
% of 7AAD+ cells
% FLICA-1+ cells
mRNA
nlrp3
asc
SiRNA Co n3
Co asc
T0901317
siRNA
Co
Asc
Nlrp3
D
% of 7AAD+ cells
% of FLICA-1+ cells
n.s
T0901317
Inhibitor
-
NAC
Apo
Bafilo
CathB inh
oxATP
E
% of 7AAD+ cells
% of FLICA-1+ cells
mRNA
p2x7
SiRNA Co p2x7
T0901317
siRNA
Co
P2X7

Figure 4

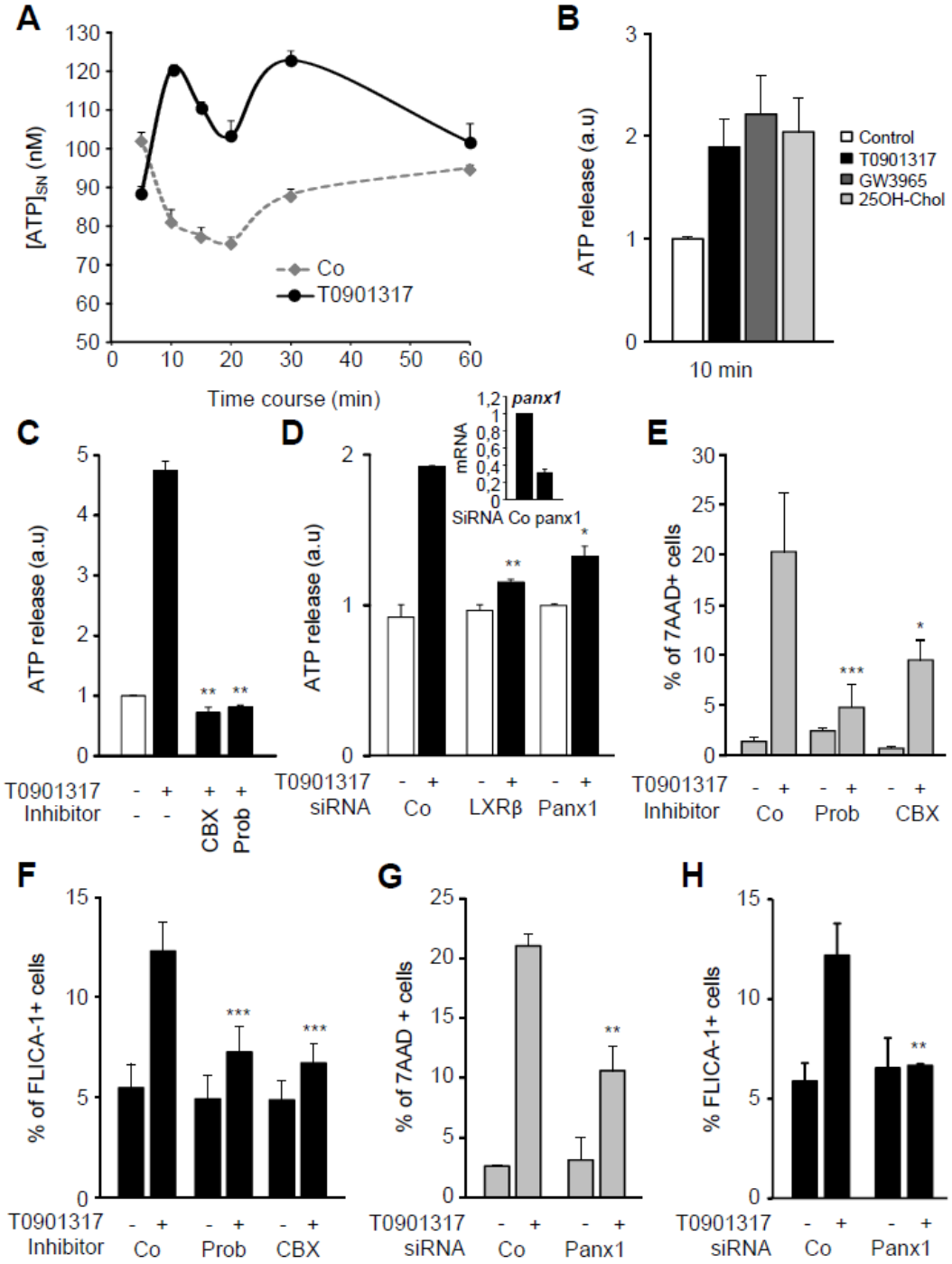

A
[ATP]SN (nM)
Time course (min)
Co
T0901317
B
ATP release (a.u)
10 min
Control
T0901317
GW3965
25OH-Chol
C
ATP release (a.u)
T0901317
Inhibitor
CBX
Prob
D
ATP release (a.u)
panx1
mRNA
SiRNA Co panx1
T0901317
siRNA
Co
LXRβ
Panx1
E
% of 7AAD+ cells
T0901317
Inhibitor
Co
Prob
CBX
F
% of FLICA-1+ cells
T0901317
Inhibitor
Co
Prob
CBX
G
% of 7AAD + cells
T0901317
siRNA
Co
Panx1
H
% FLICA-1+ cells
T0901317
siRNA
Co
Panx1

Figure 5

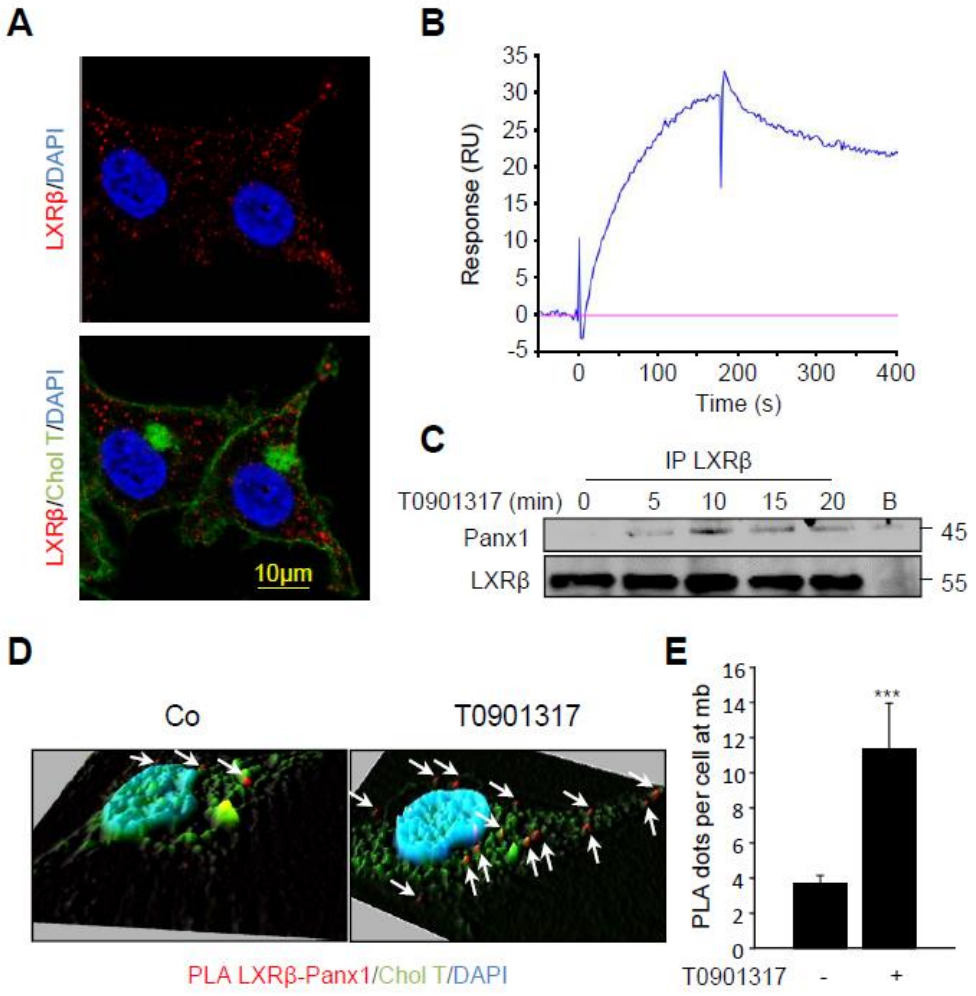

A
LXRβ/DAPI
LXRβ/Chol T/DAPI
10µm
B
Response (RU)
Time (s)
C
IP LXRβ
T0901317 (min) 0 5 10 15 20 B
Panx1
LXRβ
45
55
D
Co
T0901317
PLA LXRβ-Panx1/Chol T/DAPI
E
PLA dots per cell at mb
***
T0901317 - +

Figure 6

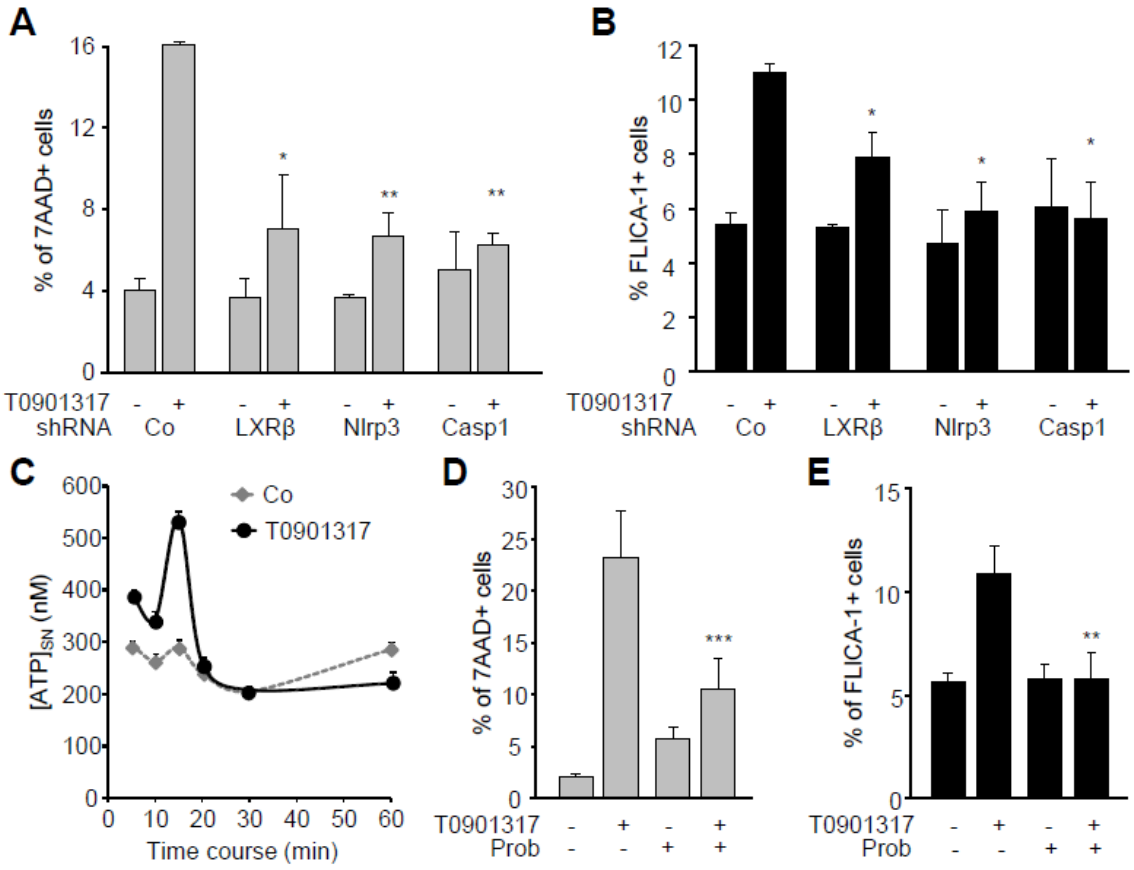

A
% of 7AAD+ cells
16
12
8
4
0
*
**
**
T0901317 - + - + - + - +
shRNA Co LXRβ Nlrp3 Casp1
B
% FLICA-1+ cells
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
T0901317 - + - + - + - +
shRNA Co LXRβ Nlrp3 Casp1
C
[ATP]SN (nM)
600
500
400
300
200
100
0
Co
T0901317
0 10 20 30 40 50 60
Time course (min)
D
% of 7AAD+ cells
30
25
20
15
10
5
0
***
T0901317 - + - +
Prob - - + +
E
% of FLICA-1+ cells
15
10
5
0
**
T0901317 - + - +
Prob - - + +

Figure 7

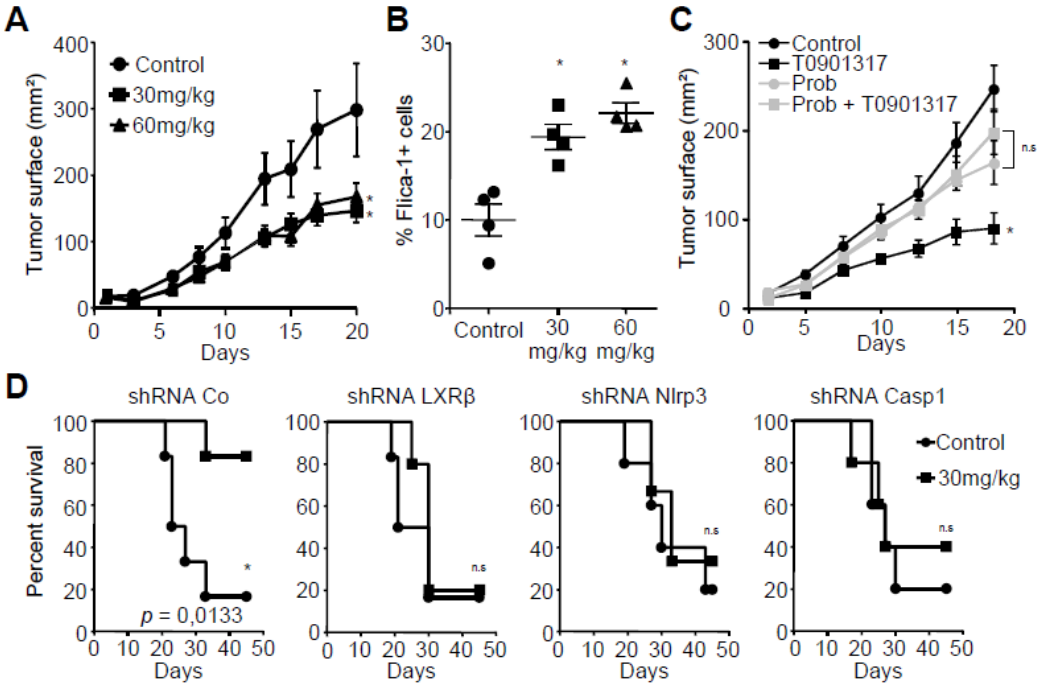
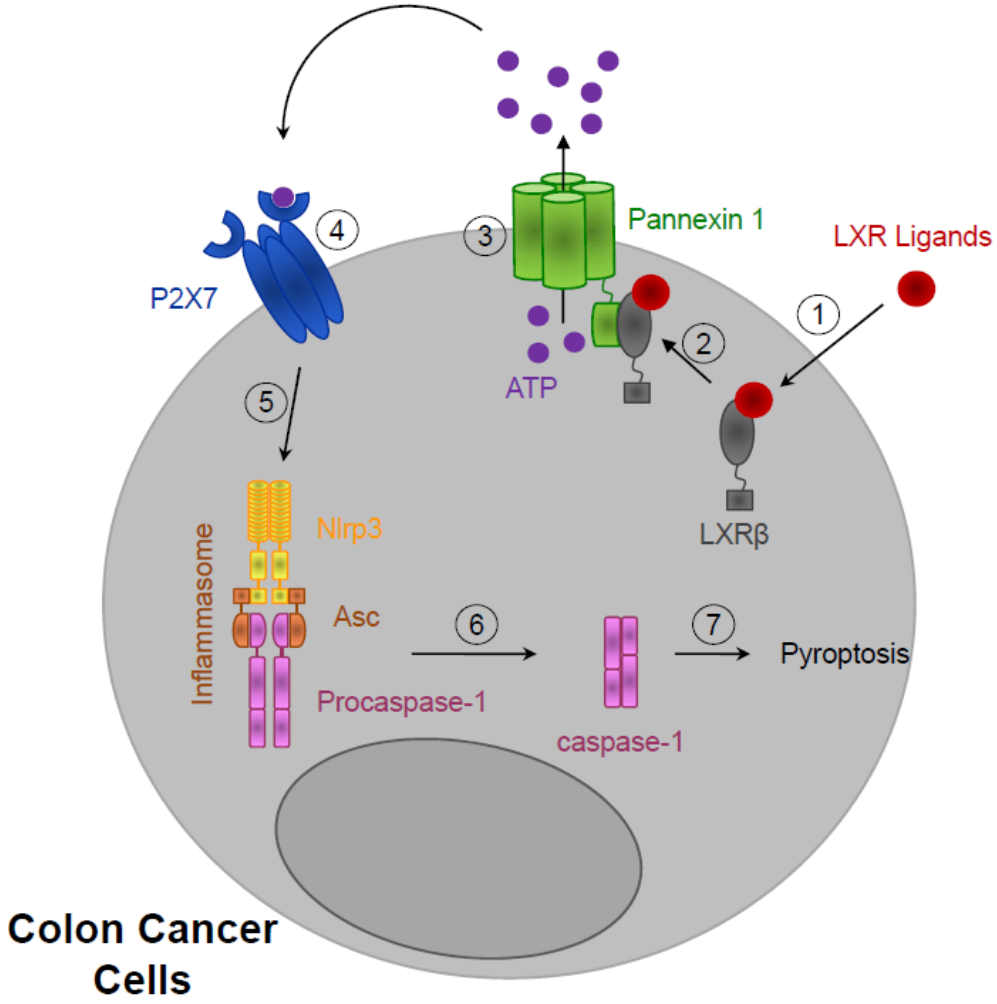
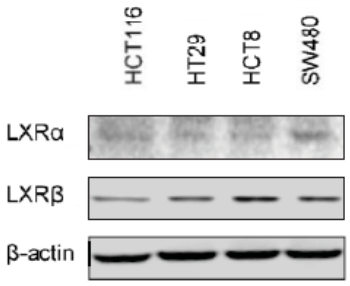

A
Tumor surface (mm²)
Control
30mg/kg
60mg/kg
Days
B
% Flica-1+ cells
Control
30 mg/kg
60 mg/kg
C
Tumor surface (mm²)
Control
T0901317
Prob
Prob + T0901317
n.s
Days
D
shRNA Co
shRNA LXRβ
shRNA Nlrp3
shRNA Casp1
Percent survival
Control
30mg/kg
p = 0,0133
n.s
Days

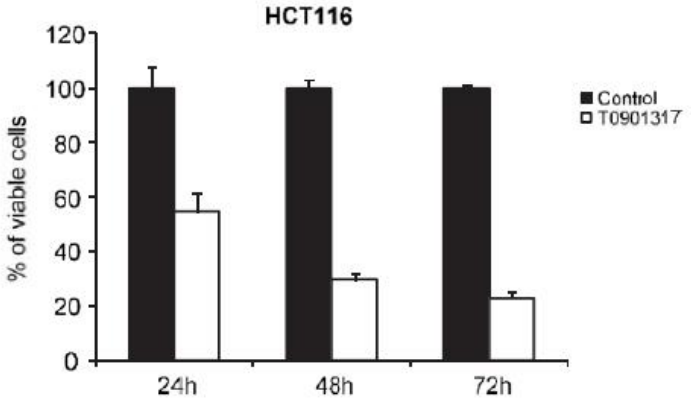
Figure 8


Pannexin 1
LXR Ligands
P2X7
ATP
LXRβ
Nlrp3
Inflammasome
Asc
Procaspase-1
caspase-1
Pyroptosis
1
2
3
4
5
6
7
Colon Cancer Cells

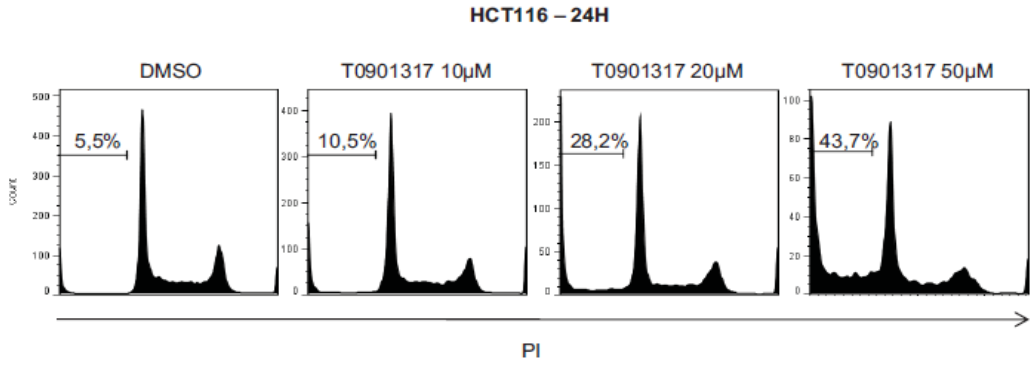
Supplementary data



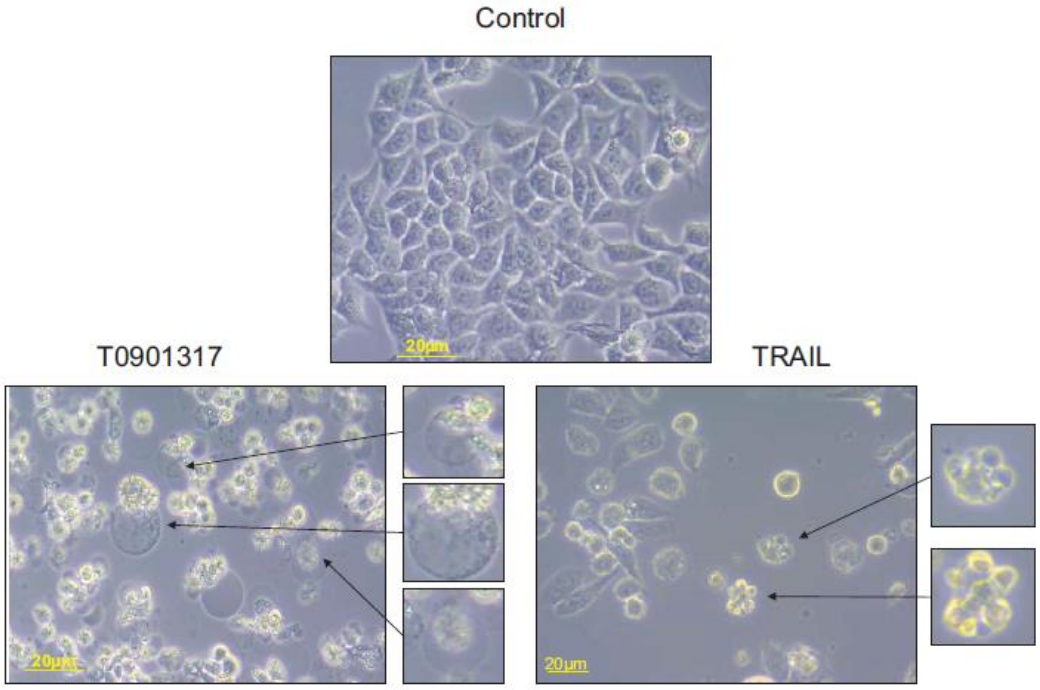
Supplementary Figure 1: LXR expression in colon cancer cells. LXRα and β protein expression in HCT116, HT29, HCT8 and SW480 colon cancer cells analyzed by western blotting. β-actin was used as loading control. One representative of two independent experiments.



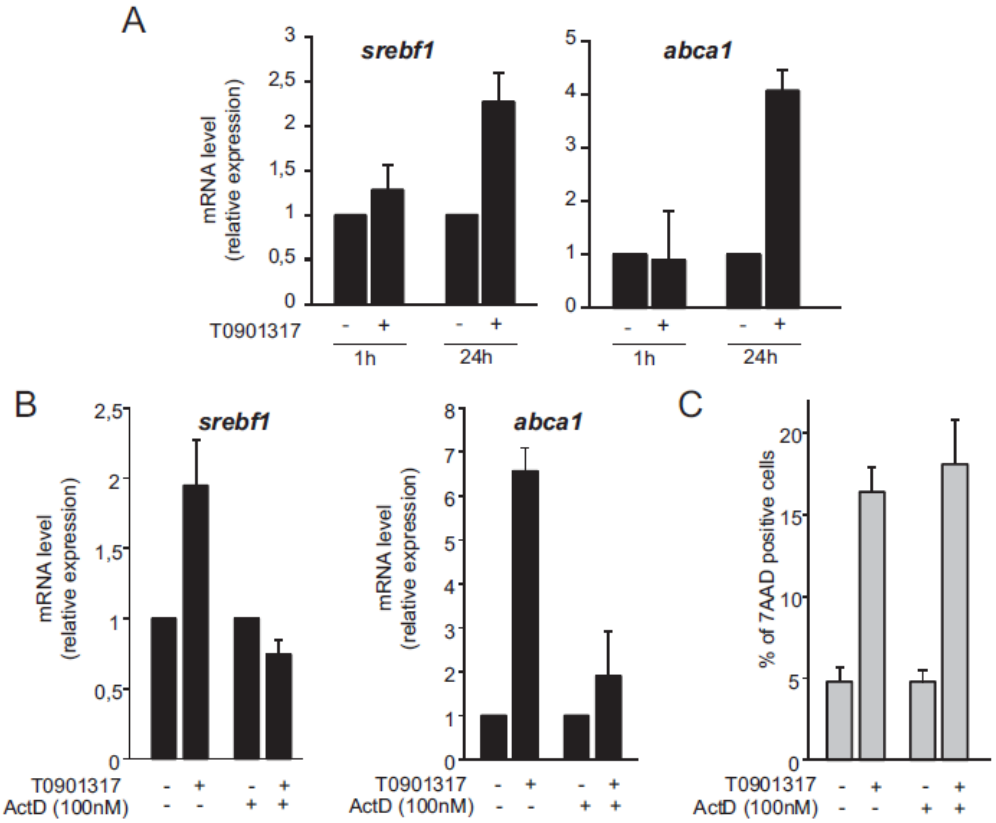
Supplementary Figure 2: Time-dependent effect of T0901317 on cell viability. Determination of HCT116 cell viability after exposure with 20µM of T0901317 at indicated times analyzed by crystal violet coloration. Data are the mean of two independent experiments ± s.d..



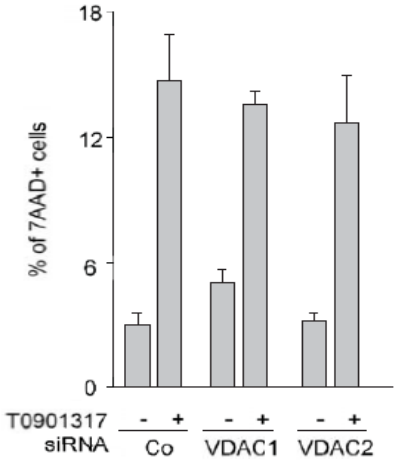
Supplementary Figure 3: LXR ligand induces colon cancer cell death. Percentage of SubG1 positive HCT116 cells treated for 24 hours with indicated concentrations of T0901317. Data are representative of two independent experiments.



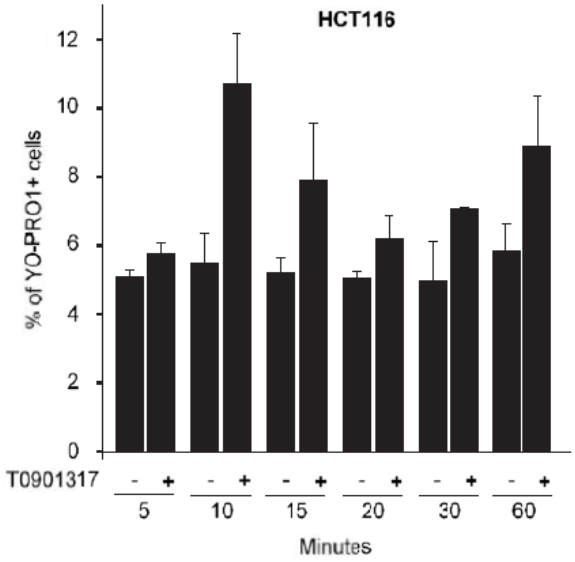
Supplementary Figure 4: HCT116 cells arbor pyroptotic features under LXR ligand treatment. Cellular morphology of untreated HCT116 cells (control) or after a 20µM T0901317 or a 200 ng/mL TRAIL treatment (apoptosis control) for 24 hours as assessed with a Zeiss PrimoVert microscope outfitted by Axiocam ERC5s camera and using AxioVision software.



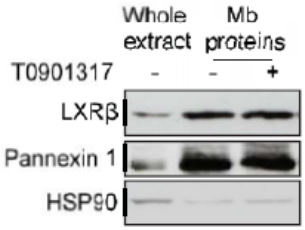
Supplementary Figure 5: Actinomycin D effects on LXR ligand-mediated mRNA expression and cell death. (A) HCT116 cells were treated at indicated times. Then srebf1 and abca1 mRNA expression was analyze by QPCR and normalized with a set of housekeeping genes. (B and C) HCT116 cells were pre-treated with 100nM of actinomycin D for one hour and then treated for 24 hours with 20µM T0901317. (B) srebf1 and abca1 mRNA expression was analysed as in A. (C) 7-AAD staining. Each bar represents mean ± s.d. of 3 independent points. The sequences of the oligonucleotides used are described in Table S1.



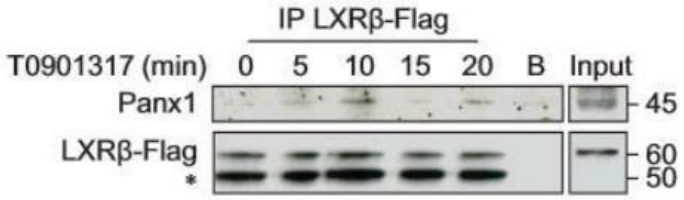
Supplementary Figure 6: Effects of VDACs on T0901317 mediated cell death. After transient transfection with VDAC1 or VDAC2 siRNA, HCT116 were treated with 20µM of T0901317 for 24 hours and stained with 7-AAD (cell death). Data are the mean of two independent experiments ± s.d..



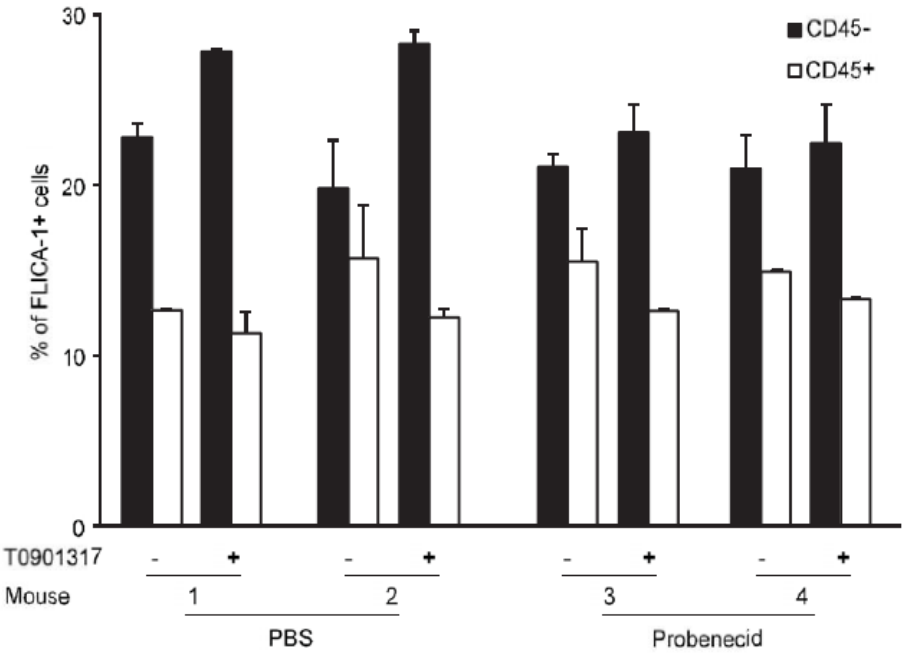
Supplementary Figure 7: Effects of T0901317 on pannexin 1 activity. Quantification of the percentage of YO-PRO-1 positive HCT116 cells after a 20µM T0901317 treatment at indicated times. Each bar represents mean ± s.d. of 3 independent points.



Supplementary Figure 8: LXRβ expression in plasma membrane fraction. Western blot analysis of LXRβ, and pannexin 1 in whole cell extract and membrane protein fraction in HCT116 cells treated or not with 20µM T0901317 for 10 minutes. HSP90 was used as a negative control for membrane purity. One representative of two independent experiments.



Supplementary Figure 9: LXRβ/pannexin 1 interaction. Immunoprecipitation using Flag-M2 antibody on LXRβ-Flag transfected HEK/293T cells treated or not during the indicated times with 20µM T0901317 and followed by western blot analysis using anti-Flag-M2 and anti-pannexin 1 antibodies. Beads (B) are negative controls without antibody for IP. Numbers indicate molecular masses in kilodaltons. *: immunoglobulins.



Supplementary Figure 10: Effects of ex-vivo T0901317 treatment on caspase-1 activation within cancer cells from murine tumors. Balb/c mice s.c. injected with CT26 cells i.p. were treated with Probenecid (Prob) or not (PBS) during 20 days before tumor collection. Representation of FLICA-1 positive cells in $CD45^{+}$ (infiltrating hematopoietic cells) and $CD45^{-}$ (tumor cells) within tumors treated *ex-vivo* with 20µM of T0901317 for one hour. Each bar represent one measure realized in triplicate ± s.e.m..

	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
QPCR		
abca1	gcactgaggaagatgctgaaa	agttcctggaaggtcttgttcac
asc	aagccaggcctgcactttat	caggctggtgtgaaactgaa
b-actin	gatcattgctcctcctgagc	tgcgcaagttaggttttgtc
caspase-1	tgggactctcagcagatcaa	ctgccgacttttgtttccat
cyclophilin A	gcatacgggtcctggcatcttgtcc	atggtgatcttcttgctggtcttgc
gapdh	gagtcaacggatttggtcgt	gacaagcttcccgttctcag
lxrα	gaagaaactgaagcggcaaga	actcgaagccggtcagaaaa
lxrβ	tgcctggtttcctgcagct	agatgttgatggcgatgagca
nlrp3	aaagagatgagccgaagtgg	tgcactggaatctgcttctc
pannexin 1	ctgtggacaagatggtcacg	cagtgggaggtttccagact
p2x7	gccacaactacaccacgaga	gaaccaacggtctaggttgc
Srebf1	gacatcgaagacatgcttcagct	aggcttcaagagaggagctcaat
Cloning		
lxrβ	tatgaattcttccaccctaggaagaggaa	tatgaattccaccatgtcctctcctacc

Supplementary Table 1: Primers used in the study.

Supplentary Material and methods

SubG1 determination

Cells were washed in ice-cold PBS 1X, resuspended in 500 µl of ice-cold PBS 1X, and diluted by dropwise addition of 1.5 ml of 100% ethanol. Samples were stored at 4°C for at least 1 h. Ethanol-fixed cells were resuspended in PBS 1X with 100 µg/ml ribonuclease A (Sigma-Aldrich) and 10 µg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich). Cells were incubated for 1 h at 37°C. Propidium iodide-stained nuclei were then analyzed using a Becton Dickinson LSR II cytometer. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined using FlowJo software.

YO-PRO-1 assay

Cells were incubated in RPMI 1640, 0,5% BSA, 25mM Hepes and 1µM YO-PRO (Life technologies, Y3603) during 30 minutes. Cells were then treated during indicated times with 20µM T0901317, washed two times in PBS and analyzed by flow cytometry.

Membrane fraction isolation

Membrane associated proteins were isolated with the cell surface protein isolation kit (Thermo scientific, 89881) according to manufacturer's instructions. Briefly 15 x 10^6 cells were labelled with a cell-impermeable, cleavable biotinylation reagent (Sulfo-NHS-SS-Biotin) to tag exposed primary amines of proteins on the surface of intact cells. Treated cells were then harvested, lysed and the labeled surface proteins were affinity-purified using Thermo Scientific NeutrAvidin Agarose Resin. After elution proteins were analyzed by western blot. Intracellular protein contamination was checked with an anti-HSP90β antibody (Stressgen) as a cytoplasmic control.

Immunoprecipitation

Cells (10×10^6) were lysed in 1 mL lysis buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol and complete protease inhibitor mixture [CPIM], Roche, Indianapolis, IN) for 30 minutes on ice. After centrifugation at 14 000g at 4°C for 30 minutes, supernatants were precleared during 2 hours at 4°C in the presence of 30 µL of mixed Sepharose 6B (6B100 - Sigma Aldrich) and protein G (17-0618-01 - Amersham). After centrifugation at 1000g for 3 minutes the supernatant was incubated with anti-Flag M2 antibody (F3165 Sigma-Aldrich) antibody (1 µg/mL) at 4°C for 20 hours and during the last hour with 40 µL of mixed Sepharose. The precipitates were washed 4 times in lysis buffer and analyzed by immunoblotting.

Conclusions et perspectives de l'article 1:

Nous avons pu mettre en évidence que dans les cellules cancéreuses coliques, les ligands de LXR pouvaient provoquer, après fixation sur LXRβ, l'interaction de celui-ci avec la pannexine-1 pour entrainer le relargage rapide et transitoire d'ATP dans le milieu extra-cellulaire. Ceci conduit à l'activation de l'inflammasome via P2X7 puis à l'activation de la caspase-1 et à la mort par pyroptose des cellules de manière non transcriptionnelle. Cette cascade moléculaire a pu également être démontrée *in vivo* chez des souris Balb/c porteuses de tumeurs coliques murines CT26.

Notre étude précise une localisation cytoplasmique et péri-membranaire de LXRβ, notamment dans la lignée HCT116. Cette localisation assez peu décrite par ailleurs, conditionne les effets de mort pyroptotique puisqu'elle permet l'interaction de LXRβ et de la pannexine-1 sous l'action du ligand T0901317.

Afin d'approfondir notre étude, nous sommes actuellement en train de chercher à préciser la localisation de LXRβ dans d'autres lignées cellulaires coliques, normale (NCM460) ou tumorales et également chez des patients atteints de tumeurs coliques. Ce projet fait l'objet d'un article en cours de préparation.

2. Article 2 : La localisation subcellulaire de LXRβ conditionne les phénomènes de mort induite par les agonistes LXR dans le cancer colique humain

Article en cours d'investigation et d'écriture

a. Introduction

Les ligands de LXRs ont été démontrés pour avoir un rôle anticancéreux dans de nombreux modèles tumoraux notamment dans des modèles coliques (Vedin, 2013 ; LoSasso, 2013). Récemment, j'ai pu mettre en évidence que ces agonistes sont capables d'induire très rapidement un relargage d'ATP après interaction de LXRβ avec la pannexine-1. Ceci a pour conséquence d'activer la voie purinergique de manière auto ou paracrine et d'entrainer la formation de l'inflammasome, le clivage de la caspase-1 et une mort atypique pyroptotique des cellules tumorales coliques (Derangère, 2014). Ces phénomènes ont lieu en partie grâce au fait que LXRβ est localisé au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique des cellules. Ce deuxième projet s'attache donc à étudier la localisation de LXRβ dans plusieurs modèles coliques humains tumoraux et normaux ainsi que chez des patients souffrant de cancer coliques.

b. Matériels et Méthodes

Cultures cellulaires

Toutes les cellules ont été cultivées en incubateur à 37°C avec 5% de CO2 en atmosphère humide. Les cellules cancéreuses coliques HCT116 et SW480 proviennent de l'ATCC et sont cultivées dans du RPMI1640 complété avec 10% de FBS et 1% de PSA. Les cellules de muqueuse colique normale NCM460 proviennent d'Incell et sont cultivées dans du milieu M3 : Base (Incell) complété avec 10% de FBS et 1% de PSA.

Marquage AnnexineV/7AAD

Les cellules ont été ensemencées en plaque 24 puits la veille du traitement à 50000 cellules par puits. 24 heures après le traitement, les cellules ont été récupérées par action de la trypsine et les marquages AnnexineV/7AAD ont été réalisés en suivant les recommandations du fournisseur (BD).

Immunofluorescence

Une lamelle en verre est déposée au fond de chaque puits d'une plaque 12 puits et traitée avec de la poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) pendant 10min. Après un rinçage des lamelles avec de l'éthanol 70% puis deux rinçages successifs avec du PBS 1X, 100000 cellules sont ensemencées dans chaque puits. Le jour suivant, les cellules sont lavées et fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% à 4°C pendant 10 minutes, avant d'être perméabilisées en utilisant un tampon PBS 1X, 3% BSA et 0,1% saponine pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire anti-LXRβ (Abcam produit chez le lapin) à 4°C pendant la nuit, puis lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X. L'anticorps secondaire anti-lapin couplé Alexa568 (Life Technologies) est ensuite incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Après trois lavages successifs de 5 minutes dans du PBS 1X, les échantillons ont été montés sur des lames en présence de milieu de montage contenant du DAPI (Prolong Gold Antifade, Molecular Probes). L'acquisition des images a été réalisée avec le microscope Zeiss Imager M2.

Extraction cytoplasmes - noyaux

10 millions de cellules sont resuspendues dans un tampon hypotonique (Hepes 20mM [pH 7,5], KCl 10mM, $MgCl_2$ 1.5mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, saccharose 250mM, inhibiteurs de protéases) et incubées pendant 30 min sur la glace. Les cellules sont lysées mécaniquement grâce à une aiguille 26 Gauges. L'intégrité des cellules est vérifiée au microscope par coloration au bleu Trypan. Les noyaux sont culotés par centrifugation pendant 10min à 1 000g à 4°C. Le surnageant est délicatement récupéré et centrifugé à 10 000g pendant 20 min à 4°C afin de culoter les mitochondries. Le surnageant obtenu correspond aux extraits cytoplasmiques.

Tests d'activité de la caspase-1

Pour les lignées cellulaires, les cellules sont implantées dans des flasques de 25cm² la veille du traitement à 2 millions de cellules par puits. Avant le traitement, les cellules sont trypsinisées puis mises en suspension à 1 million par mL dans du RPMI1640 complet.

Pour les pièces de colectomies, les cellules sont dissociées par action de la collagénase et d'une DNAse (Sigma Aldrich) pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. Les cellules sont ensuite passées sur un tamis de 70µm (BD), comptées et remises en suspension à 1 millions par mL.

Dans les deux cas, les cellules sont ensuite incubées avec le peptide FLICA YVAD-fmk (AbdSerotec) de manière concomitante avec le T0901317 à 20µM pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite culotées et lavées deux fois avec de l'Apoptosis Buffer (AbdSerotec) puis analysées par cytométrie en flux.

Test de relargage de l'ATP

Les cellules sont mises en suspension dans un milieu composé de RPMI 1640, 1% BSA, 10mM Hepes (Gibco) et traitées pendant 10 minutes avec le T0901317 à 20µM. Les cellules sont culotées et le surnageant est collecté dans un nouveau tube. La mesure de l'ATP contenu dans le milieu extracellulaire est réalisée grâce à l'activité luciferase (Promega, G7570) et lue avec un luminomètre (Perkin Elmer).

Immunohistochimie

Les tissus coliques normaux et tumoraux ont été prélevés puis fixés en formol et inclus en paraffine. Le marquage a été réalisé en utilisant l'anticorps monoclonal anti-LXRβ (ab24361, Abcam) au 1/20, le système ultraVIEW DAB (Ventana) et l'automate Benchmark XT (Ventana). De manière succincte, le démasquage antigénique a été obtenu par chauffage des lames pendant 90 minutes à 95°C dans un tampon EDTA 1mM à pH 7,8. Les lames ont ensuite été exposées à l'anticorps primaire pendant 30 minutes à 37°C. Un contremarquage à l'hématoxyline a été réalisé avant de monter les lames dans de l'Aquamount (Dako). Les lames ont été scannées au grossissement X40 avec un Nanozoomer 2.0-HT (Hamamatsu) et le logiciel NDPScan (Hamamatsu)

c. Résultats

La sensibilité des cellules tumorales coliques humaines aux ligands de LXRs est associée à la localisation subcellulaire de LXRβ

Nous avons pu démontrer précédemment que la localisation membranaire de LXRβ permettait la mort cellulaire des cellules tumorales coliques humaines *in vitro*. Nous avions observé que les cellules SW480 étaient plus résistantes aux effets cytotoxiques du T0901317 après 24 heures de traitement (Fig 1A). Nous avons ainsi réalisé des marquages par immunofluorescence sur ces deux types cellulaires (Fig 1B). Nous retrouvons la présence de LXRβ dans le cytoplasme des cellules HCT116 mais pas dans le modèle SW480 où la localisation de LXRβ est nucléo-cytoplasmique. Ces résultats sont confirmés par des expériences de purification des fractions nucléaires et cytosoliques par Western Blot (Fig 1C). Nos résultats montrent donc que la localisation cytoplasmique de LXRβ est prépondérante dans les effets de mort induits par les agonistes de LXR dans les lignées coliques humaines.

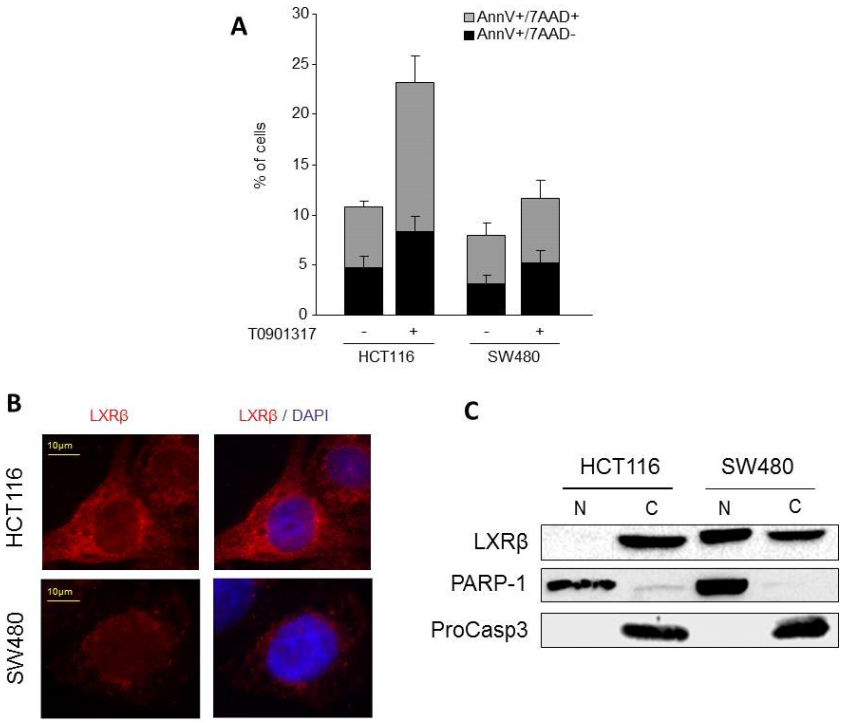


Figure 1 : Comparaison des cellules coliques humaines HCT116 et SW480 (A) Pourcentage de cellules Annexine V+/7AAD- et AnnexineV+/7AAD+ après 24 heures de traitement par 20µM de T0901317. (B) Images représentatives de la localisation de LXRβ par immunofluorescence. (C) Détection de LXRβ dans les fractions nucléaires (N) ou cytoplasmiques (C) par Western Blot. Un anticorps anti-PARP-1 a été utilisé pour vérifier la pureté des fractions nucléaires et un anticorps anti Procaspase-3 pour la pureté des fractions cytosoliques.

Les ligands de LXR ciblent les cellules tumorales in vitro

Afin de déterminer la sélectivité des ligands LXRs sur les cellules tumorales et de pouvoir envisager les ligands de LXRs comme une potentielle thérapeutique ciblée en cancérologie colique, nous avons choisi d'utiliser le modèle NCM460, une lignée de muqueuse colique humaine saine. Tout d'abord nous n'avons ni détecté de mort après 24 heures (Fig 2A) ni d'activation de la caspase-1 après 1 heure dans les cellules NCM460 traités par le T0901317, comparé aux cellules cancéreuses HCT116 (Fig 2B). Nous n'avons pas non plus retrouvé de relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire des cellules NCM460 après 10 minutes d'exposition au T0901317 (Fig 2C), indiquant ainsi que l'induction de la mort cellulaire dans ces cellules est bloquée au niveau du complexe LXRβ/pannexine-1. Il n'existe pas de différence d'expression de pannexine-1 ou de LXRβ entre les cellules NCM460 et HCT116 (Fig 2D). Une nouvelle fois, la faible toxicité des ligands de LXR semble être expliquée par la différence de localisation de LXRβ, avec une forte localisation nucléaire dans les cellules NCM460 (Fig 2E et 2F) comparé aux cellules HCT116.

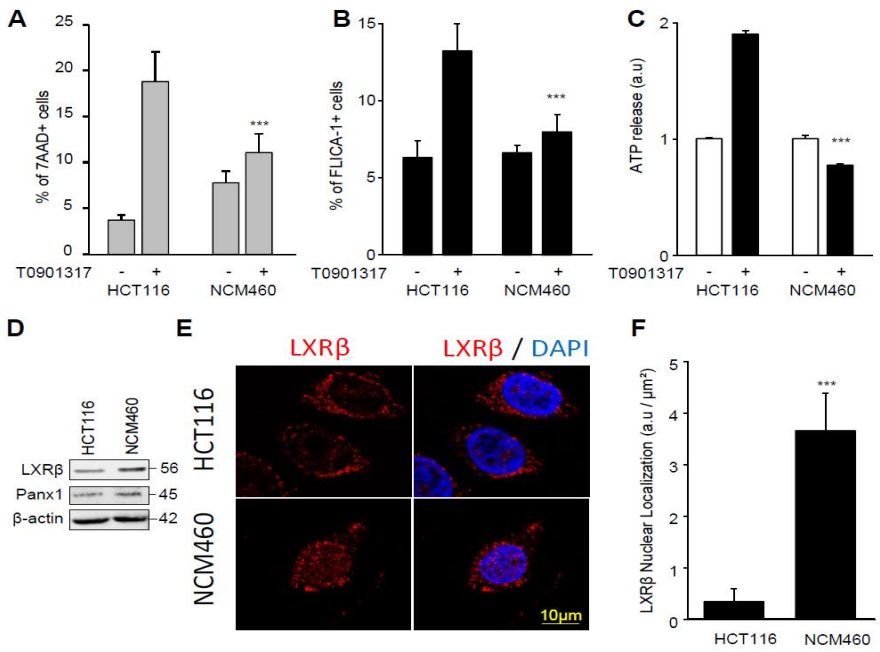


Figure 2 : Comparaison des cellules coliques tumorales humaines HCT116 et des cellules coliques normales NCM460 (A) Pourcentage de cellules AnnexineV+/7AAD+ après 24 heures de traitement par 20µM de T0901317. (B) Pourcentage de cellules FLICA-1 positives après 1 heure de traitement par 20µM de T0901317. (C) ATP relargué dans le milieu extracellulaire après 10 minutes de traitement par le T0901317. (D) Analyse de l'expression de LXRβ et de la pannexine-1 par Western Blot. (E) Images représentatives de la localisation de LXRβ par immunofluorescence et (F) sa quantification.

La localisation de LXRβ varie au cours des processus tumoraux chez des patients atteints de cancers colorectaux

Les résultats *in vitro* décrits précédemment ont pu être validés chez des patients atteints de cancer colique. Nous avons d'abord réalisé des marquages immunohistochimiques de LXRβ sur le tissu tumoral et le tissu sain adjacent de la muqueuse épithéliale colique.LXRβ est majoritairement localisé au niveau du noyau des cellules épithéliales saines et nous avons pu mettre en évidence une perte de cette localisation nucléaire dans le tissu tumoral (Fig 3A). Ensuite, des pièces de colectomies (tissu tumoral et tissu sain) ont été dissociées puis soumises à un traitement d'une heure par le T0901317 *in vitro*. Nos résultats montrent que l'agoniste LXRs active la caspase-1 uniquement dans les cellules issues du tissu tumoral (Fig 3B). L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que les cellules

tumorales présentent une localisation différente de LXRβ comparées aux cellules épithéliales saines et que cela pourrait conditionner la réponse aux agonistes de LXR.

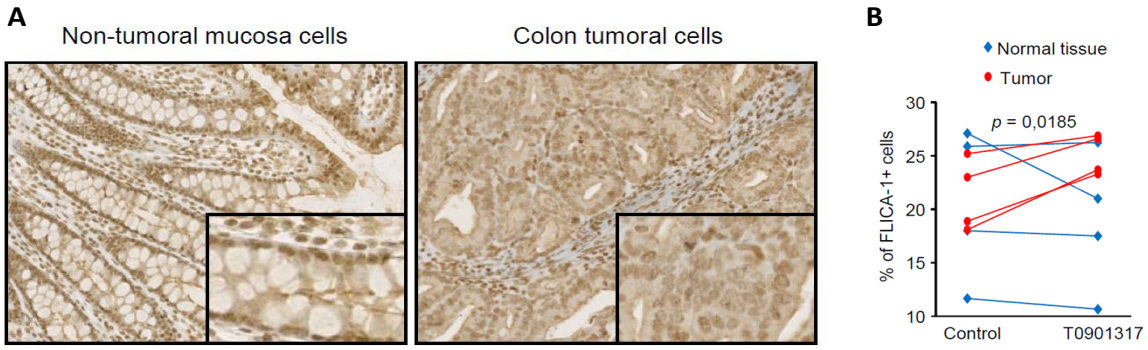


Figure 3 : (A) Images représentatives de la localisation de LXRβ par immunohistochimie dans le tissu sain (à gauche) et le tissu tumoral (à droite) chez des patients atteints de cancers coliques. Images représentatives des expériences réalisées sur 5 prélèvements de patients (B) Pourcentage de cellules FLICA-1 positives après 1 heure de traitement *ex-vivo* par 20µM de T0901317.

d. Perspectives

Ce deuxième projet démontre que la localisation de l'isoforme LXRβ est prépondérante dans les effets de mort induits par les agonistes LXR. Cependant ces résultats devront être confirmés dans d'autres lignées de cancers coliques comme HT29, HCT8, Lovo, RKO, SW48 ou SW620. Nous devrons également augmenter le nombre de patients dans notre étude, que ce soit concernant les expériences d'immunomarquages de LXRβ, mais également pour les expériences d'activation de la caspase-1 sur les pièces de colectomies. Il sera intéressant de pouvoir corréler ces résultats avec des données cliniques de chaque patient comme le stade de la maladie au diagnostic, la réponse à la chimiothérapie ou la survie globale du patient. Le récepteur LXRβ pourrait dans ce cas apparaître comme un marqueur prédictif de l'évolution de la maladie. Ce deuxième travail confirme également l'intérêt potentiel que peuvent apporter les ligands de LXR en cancérologie en ciblant les cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines adjacentes.

Nous tacherons de comprendre pourquoi et comment LXRβ peut avoir une localisation différentielle dans les cellulaires tumorales ou dans les cellules saines (lignées cellulaires et prélèvements de patients). Ceci nous permettra d'approfondir nos connaissances sur le rôle du récepteur LXRβ et sur l'effet de ses ligands dans les cellules tumorales coliques.

A ce jour, nous disposons de trois hypothèses qui permettent de donner des éléments de réponses à ces questions :

En premier lieu, une isoforme mutée de LXRβ pourrait apparaitre au cours de la carcinogénèse. Si la mutation intervenait dans la région codant pour le signal d'adressage au noyau, cela pourrait expliquer la localisation cytolplasmique et péri-membranaire dans les modèles cellulaires sensibles aux ligands de LXR et la perte de localisation nucléaire chez les patients atteints de cancers colorectaux.

Deuxièmement, l'aspect quantitatif et qualitatif des oxystérols présents au sein de la cellule tumorale devront être évalués. Une diminution du taux d'oxystérols, ligands naturels de LXR, pourrait expliquer une faible localisation nucléaire du récepteur. De plus, l'activité métabolique étant fréquemment altérée dans les processus tumoraux, un « switch » d'utilisation des oxystérols vers des voies métaboliques parallèles limitant leur fixation sur leur récepteurs LXRs devra être envisagé.

Enfin, l'idée de la présence d'un partenaire séquestrant LXRβ hors du noyau peut également être évoquée. Le partenaire privilégié des LXRs est son hétérodimère RXR avec lequel il s'associe et se fixe sur l'ADN pour exercer ses effets génomiques. Dans les cellules cancéreuses, t-RXRα, une forme tronquée de RXRα (au niveau de la partie N-terminale) a déjà été décrite. L'apparition de t-RXRα est due à une forte activité des calpaïnes de type II responsables du clivage de RXRα au niveau du domaine d'activation AF-1 (*Activation Fonction 1*). Cette forme est localisée préférentiellement dans le cytoplasme des cellules cancéreuses et est responsable de la prolifération cellulaire (Zhou et al., 2010). t-RXRα possède toujours la possibilité de s'hétérodimériser avec LXR puisque la région fixant le ligand et LXR est présente dans cette frome tronquée. Nous portons actuellement donc une grande attention à l'étude de cette forme tronquée qui pourrait permettre

d’expliquer en partie la localisation atypique de LXRβ dans les cellules tumorales coliques humaines.

II. HYPOTONIE ET DERIVES DU PLATINE ACTIVANT LA CASPASE-1, UNE MODELISATION *IN VITRO* DE LA CHIMIOTHERAPIE INTRAPERITONEALE

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Pablo Ortega et les membres du service de chirurgie digestive et de gastroentérologie du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon.

1. Introduction

La prise en charge de la carcinose péritonéale secondaire aux tumeurs coliques consiste en une résection chirurgicale complète puis d'un bain de chimiothérapie local. Or, si cette technique est efficace et permet une augmentation de la survie des patients elle n'est pas standardisée. D'un point de vue pharmacologique, les chirurgiens ont ainsi le choix de la drogue et de sa dose et du temps d'exposition dans une solution de glucose 5% (G5%), de la température et de la pression du bain de chimiothérapie. De plus, si l'administration locale de drogues de chimiothérapie permet une toxicité moins élevée, les procédures normothermiques ou hyperthermiques présentent une augmentation du risque de fièvre et de diarrhées post-opératoires importantes (Huang et al., 2012).

Parmi les procédures employées, l'une repose sur l'administration d'oxaliplatine (150mg/m²) dans du G5% pendant 30 minutes à 42°C à pression normale en procédure ouverte. Cependant la solution de G5% est légèrement hypotonique (281mosm/L) et l'hypotonie est connue pour induire le clivage de la caspase-1 (Compan et al., 2012) et la sécrétion de cytokines proinflammatoires qui pourraient expliquer les réactions pyrétiques aseptiques des patients recevant une chimiothérapie intrapéritonéale. D'un autre point de vue, l'activation de la caspase-1 peut également initier la mort cellulaire des cellules cancéreuses révélant un rôle ambivalent de cette caspase dans un contexte de chimiothérapie intrapéritonéale.

Nous avons donc d'abord cherché à modéliser *in vitro* cette procédure de chimiothérapie intrapéritonéale oxaliplatine/G5%, classiquement utilisée mais aussi en modifiant les paramètres d'osmolarité en utilisant du G2,5% (plus hypotonique) et du milieu isotonique afin de détecter l'activation de la caspase-1 et de comprendre

son rôle dans ce modèle. Une approche expérimentale animale a également été réalisée sur un modèle de souris athymiques porteuses de tumeurs HCT116 partiellement réséquées. Dans ce modèle, la croissance tumorale est ralentie par les effets combinés de l'oxaliplatine et de l'hypotonie induite par le G2,5%.

2. Matériels et méthodes

a. Culture cellulaire

Le modèle de carcinome humain HCT116 a été utilisé et cultivé comme décrit plus précédemment.

b. Réactifs et traitements

Les cellules ont été implantées à 50000 cellules par puits en plaque 24 puits. Le lendemain, le milieu a été enlevé et les cellules ont été traitées pendant 30 minutes à 42°C dans un bain marie dans du milieu isotonique RPMI (Lonza), du G5% (281mosm/L) ou du G2,5% (142 mosm/L) (BBraun) contenant ou non de l'oxaliplatine (TEVA) à la concentration de 150mg/L, dose basée sur les travaux antérieurs menés par l'équipe de chirurgie digestive du CHU de Dijon (Facy et al., 2014). Après le traitement, le milieu a été enlevé, les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS, puis en fonction des expériences, soit remises en culture ou analysées.

c. Tests de viabilité

Après traitement et lavage, les cellules ont été remises en culture dans du milieu RPMI avec sérum pendant 24, 48 ou 72 heures et marquées au crystal violet comme décrit précédemment.

d. Dosage intracellulaire du platine

Les cellules ont été implantées en flasques de 25cm² à 2 millions de cellules par flasque. Le lendemain les cellules ont été traitées par l'oxaliplatine dans les différentes conditions d'osmolarité, puis trypsinées et culotées. La teneur en platine des culots cellulaires a ensuite été analysée par spectrométrie d'absorption atomique comme décrit précédemment par la plateforme Welience (Polycarpe et al., 2004).

e. Marquage Annexine V / 7AAD

Après traitement et lavage, les cellules ont été remises en culture dans du milieu RPMI avec sérum pendant 24 heures puis trypsinées et marquées à l'Annexine V et au 7AAD comme décrit précédemment.

f. Tests d'activité de la caspase-1

Après le traitement et lavage, les cellules ont été trypsinées et marquées par le peptide FLICA Y-VAD comme décrit précédemment.

g. Expérimentation animale

Les souris « nude » Nmri agées de 6 semaines (Janvier) ont été injectées avec 5 millions de cellules HCT116 en sous cutané dans le flanc droit. Après 1 mois de croissance tumorale, les nodules ont atteints une taille suffisante (entre 80 et 100mm²) pour être réséqués partiellement sous anesthésie contrôlée par isoflurane et injectés *in situ* avec une solution contenant du platine isotonique, du G2,5% seul ou du platine dans une solution de G2,5%. Un groupe subissant uniquement la chirurgie a également été utilisé. Après l'injection intratumorale, le site d'incision a été suturé et la croissance tumorale a été mesurée 3 fois par semaine.

h. Récupération et précipitation des surnageants

Après traitement des cellules, le surnageant a été récupéré et centrifugé pendant 4 minutes à 400g pour éliminer d'eventuels débris cellulaires. Le surnageant est ensuite avec 500µl de méthanol et 150µl de chloroforme, vortexé et recentrigé à température ambiantependant 10 minutes à 14000g. Trois phases sont obtenues, la phase aqueuse est éliminée et l'interphase contenant les protéines est récupérée et additionnée de 800µl de méthanol et est de nouveau soumise à une centrifugation de 10 minutes à 14000g. Les protéines sont alors culotées, le surnageant est éliminé et le culot protéique est seché et repris dans un volume de 25 à 50µl de Laemli 2X et soumis à un une séparation SDS-PAGE 15% comme décrit précédemment. Les anticorps utilisés sont les suivant : rat anti-IL1β (R&D system, 166926), rabbit anti-IL18 (Abcam, 137664). Les anticorps secondaires couplés HRP utilisés sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

3. Résultats

L'incorporation intracellulaire de l'oxaliplatine est facilitée par l'hypotonie

D'abord, de manière attendue, l'hypotonie permet l'augmentation du volume des cellules de carcinome colique HCT116 (Figure 1A). De plus, nous avons étudié l'incorporation de la drogue au sein de ces cellules par dosage du platine par spectrométrie dans les différentes conditions. Ainsi, nous avons pu observer qu'avec une diminution de l'osmolarité du milieu, l'incorporation du platine était multipliée par 4 avec le G2,5% (Figure 1B) confirmant les résultats obtenus par d'autres équipes dans d'autres modèles (Smith and Brock, 1989).

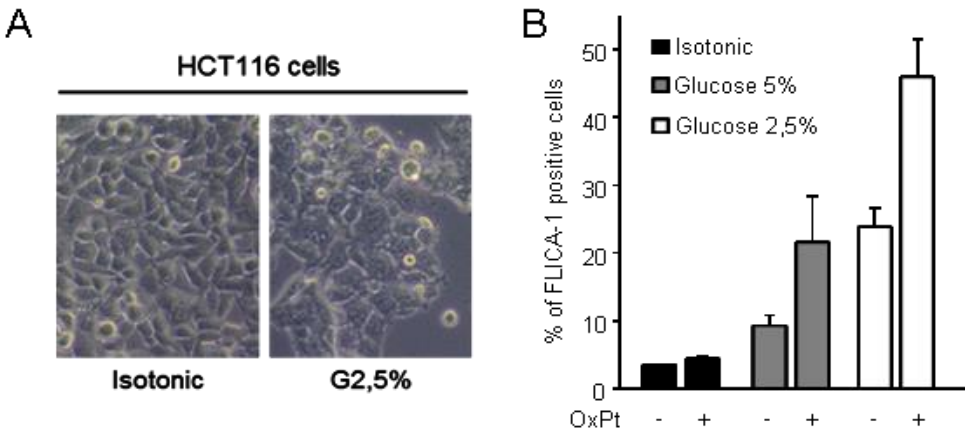


Figure 1 : (A) Les cellules HCT116 ont été exposées 30 minutes à une solution de G2.5% et la morphologie cellulaire a été observée par microscopie. (B) Les cellules HCT116 ont été traitées (+) ou non (-) pendant 30 minutes avec 150 mg/L d'oxaliplatine dilué soit dans un milieu isotonique (optimem) soit dans des solutions de glucose G5% ou G2.5%. L'incorporation de platine a été mesurée par spectrométrie d'absorption atomique.

L'hypotonie augmente la toxicité de l'oxaliplatine vis-à-vis des cellules tumorales coliques

Nous avons ensuite testé l'activité de l'oxaliplatine à la concentration de 150mg/L à 42°C sur la viabilité des cellules de carcinome colorectal HCT116. Après le bain de 30 minutes de chimiothérapie dans les différents milieux ceux-ci sont remplacés par du milieu frais (RPMI+SVF) et la viabilité cellulaire a été mesurée par coloration des

cellules par le crystal violet après 24, 48 et 72 heures. Dans le milieu isotonique, on observe un effet temps de l'oxaliplatine avec 75, 55 et 40% de cellules vivantes après 24, 48 et 72 heures de traitement respectivement. L'exposition des cellules HCT116 au platine dans le milieu légèrement hypotonique G5% (pour rappel 280mosm/L), permet de sensibiliser légèrement les cellules après 48 et 72 heures de traitement avec une viabilité résiduelle de 38 et 30%. Enfin le bain de chimiothérapie dans le milieu hypotonique G2,5% (142mosm/L) permet quant à lui une nette amélioration de l'efficacité de l'oxaliplatine puisque la viabilité diminue à 55% à 24 heures et 20% à 72 heures. Nous avons vérifié que l'exposition aux milieux hypotoniques en l'absence d'oxaliplatine n'agit pas sur la viabilité cellulaire (Figure 2A).

Nous avons par la suite réalisés des expériences de mesure de la mort cellulaire par cytométrie en flux afin de définir la mort induite par l'association d'oxaliplatine avec l'hypotonie, 48 heures après la modélisation de CHIP. La mort induite par l'oxaliplatine en conditions isotoniques est faible, environ 10% d'apoptose. Dans les conditions hypotoniques du G5%, la mort est nettement augmentée avec 50% d'apoptose. En revanche, lorsque l'hypotonie est plus sévère avec le G2,5%, le pourcentage de mort induite est assez semblable au G5%, mais cette fois, nous avons observé l'apparition d'une mort cellulaire de type nécrose (environ 20% de cellules 7AAD positives ayant la membrane cytoplasmique perméabilisée) (Figure 2B). L'hypotonie marquée semble donc permettre un « *switch* » de la mort cellulaire induite par l'oxaliplatine.

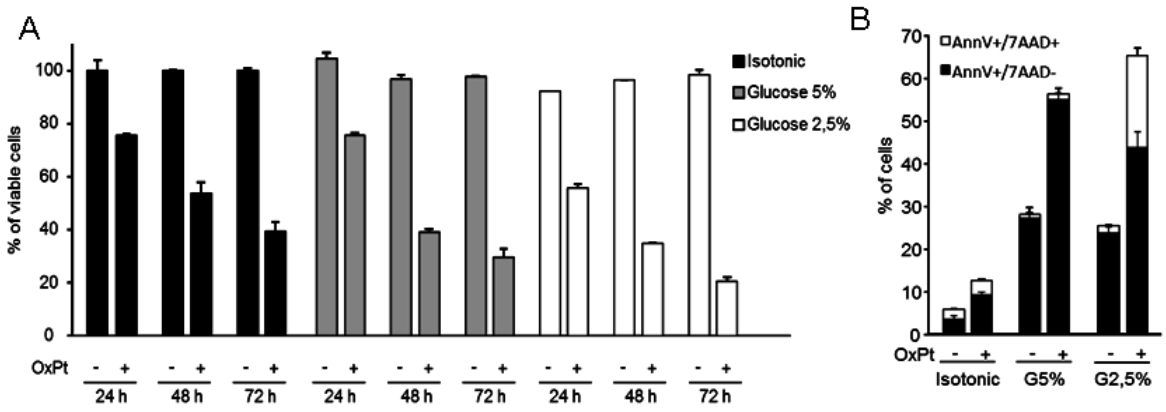


Figure 2 : Les cellules HCT116 ont été traitées (+) ou non (-) pendant 30 minutes à 42°C avec 150 mg/L d'oxaliplatine dilué soit dans un milieu isotonique (optimem) soit dans des solutions de glucose G5% ou G2.5%. (A) La viabilité cellulaire a été évaluée par coloration des cellules avec le crystal violet après 24, 48 et 72 heures de remise en culture. (B) Les cellules ont été marquées par l'annexine V et le 7-AAD et analysées par cytométrie en flux 48 heures après remise en culture.

La caspase-1 est activée après la modélisation de CHIP hypotonique

Il a été décrit que l'hypotonie pouvait déclencher l'activation de la caspase-1 (Compan et al., 2012). Les dérivés du platine sont classiquement connus pour induire des dommages à l'ADN de types adduits et provoquer l'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque via le relargage de cytochrome c et activation de Bax et de la caspase-3 (Wang and Lippard, 2005) mais aussi par la production de ROS (Lim et al., 2010). Or l'accumulation de ROS peut également être un signal déclencheur de la caspase-1. C'est pourquoi nous avons cherché à savoir si le traitement par oxaliplatine en conditions hypotoniques pouvait activer la caspase-1. Ainsi, après le bain de chimiothérapie, en milieu isotonique nous n'avons pas observé d'activation de la caspase-1. En revanche, lorsque l'oxaliplatine est incubé en milieu hypotonique les cellules coliques voient leur caspase-1 activée, avec 20% de cellules positives pour le G5% et 45% de cellules positives pour le G2,5% par la méthode FLICA (Figure 3A). De plus, l'activation de la caspase-1 est confirmée dans notre modèle puisqu'après la CHIP, les formes clivées de l'IL1β et l'IL18, cibles de la caspase-1, sont détectées dans le milieu extracellulaire des cellules HCT116 (Figure 3B). L'activation de la caspase-1, le clivage de l'IL1β, la cible majoritaire de cette caspase et les caractéristiques nécrotiques observées après marquage des cellules avec l'Annexine V / 7AAD (Figure 2B) nous incitent à penser que la combinaison oxaliplatine/G2.5% induit une mort cellulaire atypique, la pyroptose.

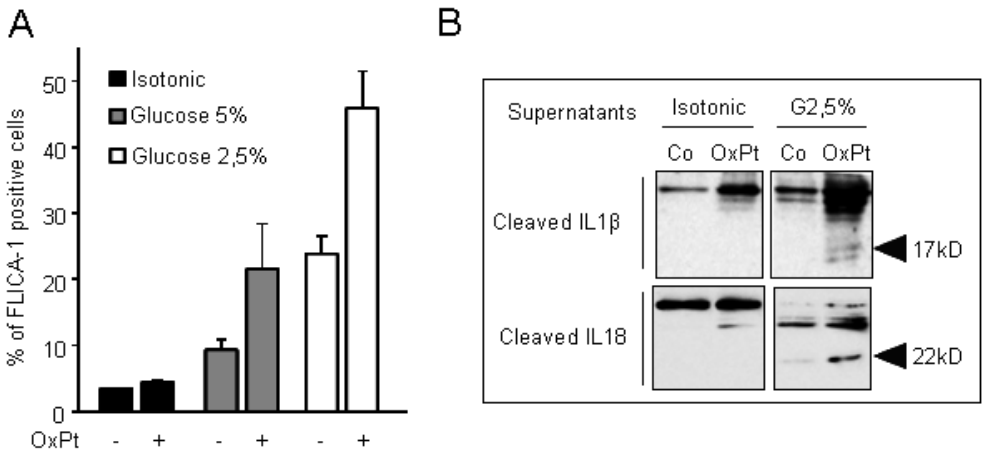


Figure 3 : Les cellules HCT116 ont été traitées (+ ou OxPt) ou non (- ou Co) pendant 30 minutes à 42°C avec 150 mg/L d'oxaliplatine dilué soit dans un milieu isotonique (optimem) soit dans des solutions de glucose G5% ou G2.5%. (A) Détection de la caspase-1 active après 30 minutes de CHIP par la technique FLICA et analyse par cytométrie en flux. (B) Détection de l'IL1β et l'IL18 clivées dans le milieu extracellulaire des cellules par western blot.

La CHIP hypotonique permet le ralentissement de la croissance tumorale in vivo

Pour connaître la relevance *in vivo* de nos résultats, nous avons testé sur un modèle murin athymique « nude », porteur de tumeur HCT116, l'effet d'une chimiothérapie *in situ* en milieu fortement hypotonique. Ainsi, après injection sous cutanée des cellules tumorales, nous avons laissé croitre les nodules tumoraux jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille comprise entre 80 et 100 mm². Les animaux ont alors subi une résection chirurgicale de leur nodule en laissant une partie macroscopiquement visible (résection dite de type R2). Une injection intratumorale d'oxaliplatine en milieu isotonique ou G2,5% a ensuite été effectuée dans la partie restante, puis nous avons suivi la croissance des tumeurs trois fois par semaine. Nous avons pu observer que l'injection *in situ* de platine en milieu hypotonique ralentit la croissance tumorale comparée au platine en milieu isotonique et ceci de manière plus prononcée durant les 15 premiers jours après la procédure de chirurgie. Le G2,5% seul n'a pas d'effet sur la croissance tumorale après chirurgie (Figure 4). Même si ce modèle ne simule pas parfaitement une chimiothérapie intrapéritonéale, il démontre tout de même que l'injection *in situ* d'oxaliplatine hypotonique permet un ralentissement de la croissance tumorale.

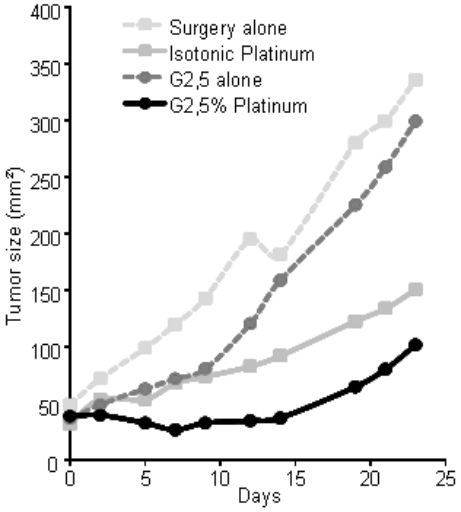


Figure 4 : Des souris athymiques ont été injectées en sous-cutané avec des cellules HCT116. Après la prise tumorale sous cutanée, les tumeurs ont été partiellement réséquées (J0). Un groupe de souris n'a subi que la résection chirurgicale partielle. Les autres groupes ont été soumis à l'injection *in situ* de solutions contenant les solvants (PBS ou G2,5%) additionnés ou non d'oxaliplatine à 150mg/L. La surface tumorale a été mesurée régulièrement pendant 24 jours.

4. Discussion et conclusions

Nos résultats de modélisation *in vitro* de chimiothérapie intrapéritonéale à 42°C montrent que lorsque l'oxaliplatine est instillé dans un milieu fortement hypotonique comme du G2,5%, la toxicité envers les cellules HCT116 est largement augmentée. Cette observation est corrélée avec une meilleure incorporation du platine dans les cellules confirmant les travaux d'autres équipes (Smith and Brock, 1989). Cette augmentation de la pénétration de platine peut être expliquée par la turgescence des cellules coliques en conditions d'hypotonie permettant ainsi une diffusion passive facilitée de la drogue. Cependant, les sels de platine peuvent également être transportés activement au travers de la membrane grâce à des récepteurs comme *Copper Transporter 1* (Ctr1) et la famille des *Organic Cation Transporters* (OCTs). L'hyperthermie provoque la multimerisation de Ctr1 et l'accumulation de platine dans des modèles de cancer du sein et vésicaux (Landon et al., 2013). Cette hypothèse devra être prochainement vérifiée dans notre modèle de CHIP *in vitro*.

Les sels de platine peuvent provoquer la production de ROS (Laurent et al., 2005) et induire la mort cellulaire par apoptose. Cependant, la production accrue de ROS peut également provoquer la formation de l'inflammasome et l'activation de la caspase-1

(Tschopp and Schroder, 2010). Nos expériences démontrent qu'en milieu hypotonique la mort cellulaire est augmentée. Elle est majoritairement de type apoptose en hypotonie modérée alors qu'en hypotonie sévère, nous avons observé un « *switch* » vers une mort de type nécrotique. Des expériences visant à étudier la production de ROS dans notre modèle devront être envisagées afin de déterminer s'il existe un seuil de production de ROS qui pourrait, lorsqu'il est franchi, orienter les cellules vers une mort dépendante de la caspase-1. De plus, les mouvements d'eau lors d'hypotonie très sévère de 90mosm/L sont connus pour activer la formation spontanée de l'inflammasome de type NLRP3 (Compan et al., 2012). Avec le G2,5%, nous n'atteignons pas de telles valeurs d'osmolarité mais l'activation de la caspase-1 est tout de même retrouvée en l'absence d'oxaliplatine (pour mémoire, 5% pour l'oxaliplatine isotonique, 25% dans le G2,5% seul contre 50% dans le groupe G2,5% oxaliplatine). Afin de confirmer l'importance de la caspase-1 nous utiliserons des cellules HCT116 dont l'expression de la caspase-1 a été diminuée par stratégie de shRNA. Nous pourrions ainsi démontrer que l'activation de la caspase-1 par le biais des sels de platine et de l'hypotonie est responsable de la mort cellulaire. Les cellules subissant cette mort cellulaire « pyroptotique » vont pouvoir à leur tour libérer de l'ATP, agissant comme un DAMP et amplifier le signal de mort cellulaire.

Dans un modèle murin athymique porteur de tumeur, nous avons pu observer les bénéfices de l'injection *in situ* d'une solution hypotonique de platine. Ce modèle est critiquable puisqu'il consiste en une injection d'une solution à température ambiante dans un nodule tumoral et non d'une infusion à 42°C dans la cavité péritonéale. Cette étude animale expérimentale sera complétée en augmentant le nombre de souris dans chaque groupe. La modélisation de carcinose péritonéale par injection IP de cellules HCT116 sera également envisagée. Son évolution pourra être suivie à l'aide de l'imagerie médicale chez le petit animal (PET Scan, bioluminescence) maitrisée par les plateformes d'imagerie. Cette modélisation aura aussi l'intérêt de mieux refléter cliniquement la pathologie comparée à une xénogreffe sous-cutanée.

En conclusion, cette étude, encore à ses prémisses, montre que l'hypotonie provoquée par le G2,5% associée aux sels de platine permet d'améliorer la toxicité de ces derniers dans un modèle *in vitro* de chimiothérapie. Cette amélioration peut être expliquée par une accumulation de platine dans les cellules provoquée par la

turgescence des cellules induite par l'hyperthermie et l'hypotonie. Ceci semble entrainer, via une possible production de ROS, l'activation d'une mort de type pyroptotique dépendante de la caspase-1. Ceci a pour conséquence la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1β et l'IL18. L'IL1β est notamment responsable de syndromes fébriles qui pourraient augmenter les effets secondaires liés à la CHIP. L'utilisation en parallèle d'un bloqueur de l'IL1β comme l'anakinra (KINERET®) peut cependant être envisagée et permettrait de contrecarrer en partie les effets systémiques propyretiques de cette cytokine. L'IL18 est également décrite pour avoir un effet immunomodulateur en favorisant le recrutement de cellules lymphocytaires cytotoxiques et une réponse immunitaire antitumorale efficace (Figure 6). Cette hypothèse pourra être confirmée ou invalidée avec un modèle de carcinose péritonéale chez des souris immunocompétentes, deux modèles murins seront alors envisageables : soit le modèle d'adénocarcinome colique MC38 chez la souris C57BL/6, soit le carcinome colique CT26 chez la souris Balb/c. Enfin, nos travaux devront être également étendus à des modèles tumoraux métastatiques ovariens humains et murins, encore plus aptes à développer cliniquement des phénomènes de carcinose péritonéale.

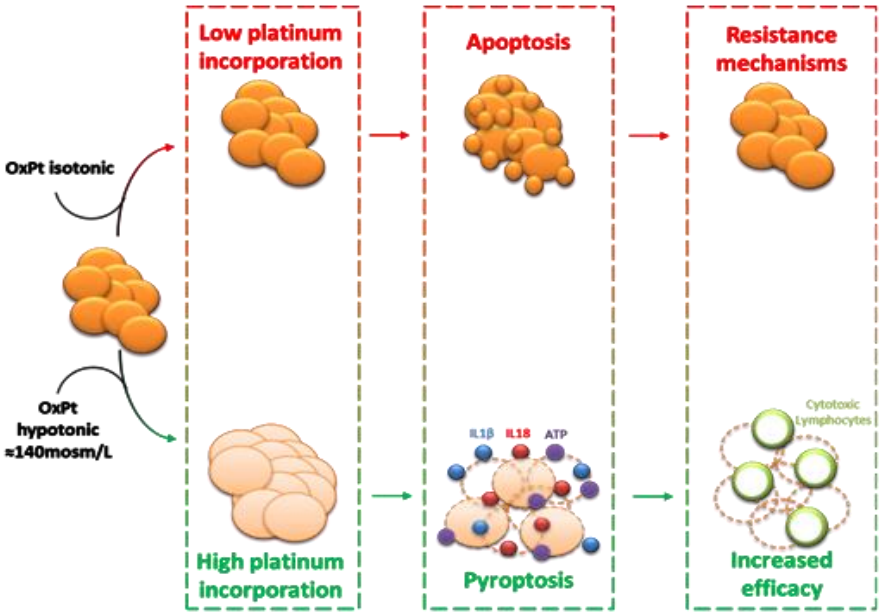


Figure 5 : En solution isotonique ou faiblement hypotonique, l'oxaliplatine conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses coliques qui peuvent développer des mécanismes de résistances à la drogue ou à la mort cellulaire (panel du haut). L'efficacité des sels de platine, comme l'oxaliplatine en hypotonie (panel du bas) est expliquée par la pénétration intracellulaire favorisée du platine, provoquant une possible accumulation de ROS, restant à être évaluée et déclenchant la pyroptose. La mort cellulaire est accompagnée d'un relargage de cytokines proinflammatoires et de DAMPs qui pourraient être à l'origine d'une exacerbation des effets secondaires de la CHIP mais aussi favoriseraient le recrutement de cellules immunitaires antitumorales compétentes, comme les lymphocytes T CD8+ et une meilleure efficacité de la chimiothérapie locorégionale.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les travaux menés durant ma thèse ont permis d'étudier l'effet de l'activation de la caspase-1 sur la mort cellulaire des cellules coliques humaines et murines, soit sous l'action des agonistes du récepteur LXR, soit dans un modèle de modélisation de chimiothérapie intrapéritonéale.

Dans la première étude, nous montrons que le traitement des cellules cancéreuses coliques humaines par les agonistes du récepteur LXR entraine l'interaction entre LXRβ et la pannexine 1, un pore transmembranaire, menant à l'ouverture de celui-ci et au relargage d'ATP dans le compartiment extracellulaire. En retour, l'ATP va agir de manière auto et/ou paracrine sur le récepteur membranaire purinergique P2X7 entrainant la construction de l'inflammasome de type NLRP3, le clivage de la caspase-1 et la mort par pyroptose des cellules cancéreuses coliques *in vitro*. Cette cascade moléculaire a pu être validée *in vivo* dans un modèle de souris Balb/c porteuses de tumeurs CT26. En complément à cette étude, nous montrons que la localisation cytoplasmique de LXRβ semble être prédominante quant à l'induction de la pyroptose des cellules coliques. Nous avons de plus observé que la localisation de LXRβ évoluait en fonction des processus de carcinogénèse, avec une répartition nucléaire dans les cellules épithéliales saines contre une répartition cytoplasmique dans les cellules tumorales. Ces résultats, soulignent l'intérêt de l'utilisation des agonistes de LXR comme thérapeutique ciblée dans le futur, en activant la pyroptose dans le tissu tumoral, tout en épargnant le tissu sain adjacent. Des études supplémentaires devront cependant être réalisées pour comprendre comment la localisation de LXRβ varie au cours de la carcinogénèse.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la caspase-1, pouvait être activée dans un modèle de chimiothérapie intrapéritonéale. En associant l'oxaliplatine et un milieu hypotonique, le glucose 2,5%, nous avons observés une augmentation de l'incorporation du platine au sein des cellules coliques, une cytotoxicité accrue, un « switch » de la mort cellulaire de l'apoptose vers la nécrose, une activation de la caspase-1 et un relargage d'IL1β et d'IL18. L'injection intra-tumorale de platine en milieu hypotonique chez des souris athymiques porteuses de tumeurs HCT116 a permis de mettre en évidence un ralentissement de la prise tumorale après résection de type R2. Des travaux complémentaires devront être menés afin de comprendre précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce modèle. Ces résultats encore préliminaires sont prometteurs et constituent un espoir dans la prise en charge de la carcinose péritonéale d'origine colique. Ces résultats devront être confirmés et devront également être évalués dans des lignées cancéreuses ovariennes, l'envahissement péritonéal étant retrouvé plus fréquemment en cancérologie ovarienne.

Quels peuvent être les conséquences de l'activation d'une telle mort cellulaire chez l'Homme ? La définition de la pyroptose repose essentiellement sur l'activation de la caspase-1 entrainant le clivage, la maturation et la sécrétion de l'IL1β et de l'IL18, des cytokines pro-inflammatoires ainsi que la libération du contenu cytoplasmique dans l'environnement cellulaire. L'inflammation a été démontrée pour être soit délétère soit favorable dans le processus de tumorigénèse et dans la réponse aux traitements par chimiothérapie et l'intérêt de la pyroptose peut donc sembler ambigu. En effet nous avons montré qu'un traitement par le 5-Fluorouracile ou la gemcitabine, entrainait la production d'IL1β par les cellules myéloïdes suppressives, favorisant l'action de lymphocytes Th17 et la croissance tumorale. D'autre part, l'IL1β et l'IL18 peuvent provoquer l'activation et l'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8 dans le cadre d'un traitement par l'oxaliplatine.

Le relargage de certains composants intracellulaires peut également avoir des effets bénéfiques ou délétères sur la réponse antitumorale. Parmi ces composants on trouve l'ATP qui peut être dégradé en adénosine notamment par les ectonucléotidases, CD39 et CD73, à la surface de différents types cellulaires du

microenvironnement tumoral. L'adénosine peut avoir des effets variés mais propice au développement du microenvironnement tumoral, en favorisant la croissance de la tumeur, l'angiogénèse et en contrecarrant la réponse immunitaire antitumorale en favorisant la polarisation des Treg au détriment des lymphocytes T CD8.

D'autre part, l'ATP, appartient à la famille des DAMP, des molécules qui vont permettre le recrutement et l'activation de cellules immunitaires anti-tumorales. De plus, l'ATP est un stigmate de la mort immunogène. Cette mort, obtenue par divers produits de chimiothérapie (dont l'oxaliplatine) est également caractérisée par la perte de localisation nucléaire de HMGB1, l'expression membranaire de la calreticuline et possède l'avantage d'éliminer les cellules tumorales tout en restaurant une immunosurveillance efficace.

Il serait donc intéressant d'étudier les relations entre la pyroptose, l'inflammation et la réponse immunitaire dans un contexte de traitement soit par les ligands de LXRs soit lors d'une chimiothérapie intrapéritonéale. Cela nous permettra de déterminer leurs effets bénéfiques et/ou délétères et ainsi, dans un but d'amélioration du traitement, de proposer éventuellement des molécules inhibitrices comme l'Anakinra (bloquant l'IL-1β, déjà commercialisé sous le nom de KINERET®) ou encore un anticorps bloquant dirigé contre CD39.

En conclusion, l'activation de la caspase-1 et le déclenchement de la mort par pyroptose, à ce jour, apparaissent ambivalentes. Des travaux sur la caractérisation de cette mort cellulaire sont donc nécessaires et permettront de mieux définir la pyroptose et de comprendre les retentissements biologiques et cliniques de son activation. La connaissance des profils moléculaires et immunitaires de chaque patient pourra également déterminer si l'administration de chimiothérapie entrainant la pyroptose sera bénéfique et ainsi améliorera considérablement la prise en charge des cancers colorectaux.

BIBLIOGRAPHIE

Adamczak, S. E., de Rivero Vaccari, J. P., Dale, G., Brand, F. J., 3rd, Nonner, D., Bullock, M. R., Dahl, G. P., Dietrich, W. D., and Keane, R. W. (2014). Pyroptotic neuronal cell death mediated by the AIM2 inflammasome. J Cereb Blood Flow Metab *34*, 621-629.

Alfonso-Loeches, S., Urena-Peralta, J. R., Morillo-Bargues, M. J., Oliver-De La Cruz, J., and Guerri, C. (2014). Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. Front Cell Neurosci *8*, 216.

Alkhamesi, N. A., Ziprin, P., Pfistermuller, K., Peck, D. H., and Darzi, A. W. (2005). ICAM-1 mediated peritoneal carcinomatosis, a target for therapeutic intervention. Clin Exp Metastasis *22*, 449-459.

Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M., Weiss, W. A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R. S., Lotze, M. T., and White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. Clin Cancer Res *17*, 654-666.

Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001). Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. J Cell Biol *152*, 633-643.

Asquith, D. L., Miller, A. M., Reilly, J., Kerr, S., Welsh, P., Sattar, N., and McInnes, I. B. (2011). Simultaneous activation of the liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta) drives murine collagen-induced arthritis disease pathology. Ann Rheum Dis *70*, 2225-2228.

Aye, I. L., Waddell, B. J., Mark, P. J., and Keelan, J. A. (2012). Oxysterols exert proinflammatory effects in placental trophoblasts via TLR4-dependent, cholesterol-sensitive activation of NF-kappaB. Mol Hum Reprod *18*, 341-353.

Bachet, J. B., Rougier, P., de Gramont, A., and Andre, T. (2010). [Rectal cancer and adjuvant chemotherapy: which conclusions?]. Bull Cancer *97*, 107-122.

Baehrecke, E. H. (2002). How death shapes life during development. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 779-787.

Barnhart, B. C., Alappat, E. C., and Peter, M. E. (2003). The CD95 type I/type II model. Semin Immunol *15*, 185-193.

Benson, A. B., 3rd, Schrag, D., Somerfield, M. R., Cohen, A. M., Figueredo, A. T., Flynn, P. J., Krzyzanowska, M. K., Maroun, J., McAllister, P., Van Cutsem, E.*, et al.* (2004). American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. J Clin Oncol *22*, 3408-3419.

Bialik, S., and Kimchi, A. (2006). The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. Annu Rev Biochem *75*, 189-210.

Biasi, F., Mascia, C., Astegiano, M., Chiarpotto, E., Nano, M., Vizio, B., Leonarduzzi, G., and Poli, G. (2009). Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation

products on human colonic epithelial cells: a potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. Free Radic Biol Med *47*, 1731-1741.

Bigini, P., Steffensen, K. R., Ferrario, A., Diomede, L., Ferrara, G., Barbera, S., Salzano, S., Fumagalli, E., Ghezzi, P., Mennini, T., and Gustafsson, J. A. (2010). Neuropathologic and biochemical changes during disease progression in liver X receptor beta-/- mice, a model of adult neuron disease. J Neuropathol Exp Neurol *69*, 593-605.

Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Poirier, O., Bickel, C., Smieja, M., Hafner, G., Meyer, J., Cambien, F., and Tiret, L. (2003). Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. Circulation *107*, 1579-1585.

Boergesen, M., Pedersen, T. A., Gross, B., van Heeringen, S. J., Hagenbeek, D., Bindesboll, C., Caron, S., Lalloyer, F., Steffensen, K. R., Nebb, H. I.*, et al.* (2012). Genome-wide profiling of liver X receptor, retinoid X receptor, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mouse liver reveals extensive sharing of binding sites. Mol Cell Biol *32*, 852-867.

Bondar, V. M., and McConkey, D. J. (2002). Anoikis is regulated by BCL-2-independent pathways in human prostate carcinoma cells. Prostate *51*, 42-49.

Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T.*, et al.* (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. Mol Cell Biol *25*, 1025-1040.

Brennan, M. A., and Cookson, B. T. (2000). Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. Mol Microbiol *38*, 31-40.

Burleson, K. M., Casey, R. C., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Oegema, T. R., Jr., and Skubitz, A. P. (2004). Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. Gynecol Oncol *93*, 170-181.

Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., Pequignot, M. O., Casares, N., Valent, A., Mouhamad, S.*, et al.* (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. EMBO J *25*, 2584-2595.

Ceelen, W. P., and Bracke, M. E. (2009). Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. Lancet Oncol *10*, 72-79.

Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature *406*, 855-862.

Chao, E. Y., Caravella, J. A., Watson, M. A., Campobasso, N., Ghisletti, S., Billin, A. N., Galardi, C., Wang, P., Laffitte, B. A., Iannone, M. A.*, et al.* (2008). Structure-guided design of N-phenyl tertiary amines as transrepression-selective liver X receptor modulators with anti-inflammatory activity. J Med Chem *51*, 5758-5765.

Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Nealon, J. R., Kim, W. S., McCann, H., Wenk, M. R., Halliday, G. M., and Garner, B. (2011). Lipid

pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. PLoS One *6*, e17299.

Chuu, C. P., Chen, R. Y., Hiipakka, R. A., Kokontis, J. M., Warner, K. V., Xiang, J., and Liao, S. (2007). The liver X receptor agonist T0901317 acts as androgen receptor antagonist in human prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun *357*, 341-346.

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.

Compan, V., Baroja-Mazo, A., Lopez-Castejon, G., Gomez, A. I., Martinez, C. M., Angosto, D., Montero, M. T., Herranz, A. S., Bazan, E., Reimers, D.*, et al.* (2012). Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. Immunity *37*, 487-500.

De Boussac, H., Alioui, A., Viennois, E., Dufour, J., Trousson, A., Vega, A., Guy, L., Volle, D. H., Lobaccaro, J. M., and Baron, S. (2013). Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions. Expert Opin Ther Targets *17*, 1029-1038.

Denton, D., Shravage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., and Kumar, S. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila. Curr Biol *19*, 1741-1746.

Derangere, V., Chevriaux, A., Courtaut, F., Bruchard, M., Berger, H., Chalmin, F., Causse, S. Z., Limagne, E., Vegran, F., Ladoire, S.*, et al.* (2014). Liver X receptor beta activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. Cell Death Differ.

Di Virgilio, F. (2013). The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. Pharmacol Rev *65*, 872-905.

Ducreux, M., Malka, D., Mendiboure, J., Etienne, P. L., Texereau, P., Auby, D., Rougier, P., Gasmi, M., Castaing, M., Abbas, M.*, et al.* (2011). Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncology *12*, 1032-1044.

Dufour, M., Dormond-Meuwly, A., Pythoud, C., Demartines, N., and Dormond, O. (2013). Reactivation of AKT signaling following treatment of cancer cells with PI3K inhibitors attenuates their antitumor effects. Biochem Biophys Res Commun *438*, 32-37.

Dugas, B., Charbonnier, S., Baarine, M., Ragot, K., Delmas, D., Menetrier, F., Lherminier, J., Malvitte, L., Khalfaoui, T., Bron, A.*, et al.* (2010). Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. Eur J Nutr *49*, 435-446.

Edwards, P. A., Kast, H. R., and Anisfeld, A. M. (2002). BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. J Lipid Res *43*, 2-12.

Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., and Martin, S. J. (2011). Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. Mol Cell *42*, 23-35.

Elrod, H. A., and Sun, S. Y. (2008). PPARgamma and Apoptosis in Cancer. PPAR Res *2008*, 704165.

Eom, Y. W., Kim, M. A., Park, S. S., Goo, M. J., Kwon, H. J., Sohn, S., Kim, W. H., Yoon, G., and Choi, K. S. (2005). Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. Oncogene *24*, 4765-4777.

Facy, O., Combier, C., Poussier, M., Magnin, G., Ladoire, S., Ghiringhelli, F., Chauffert, B., Rat, P., and Ortega-Deballon, P. (2014). High pressure does not counterbalance the advantages of open techniques over closed techniques during heated intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin. Surgery.

Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J. W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., and Alnemri, E. S. (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. Cell Death Differ *14*, 1590-1604.

Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta *1757*, 1371-1387.

Fontaine, C., Rigamonti, E., Nohara, A., Gervois, P., Teissier, E., Fruchart, J. C., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. Circ Res *101*, 40-49.

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.

Gabbi, C., Kim, H. J., Barros, R., Korach-Andre, M., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2010). Estrogen-dependent gallbladder carcinogenesis in LXRbeta-/- female mice. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 14763-14768.

Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. Cell Death Differ *14*, 1237-1243.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S.*, et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ *19*, 107-120.

Gamba, P., Leonarduzzi, G., Tamagno, E., Guglielmotto, M., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Biasi, F., Mauro, A., Vina, J., and Poli, G. (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. Aging Cell *10*, 403-417.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E.*, et al.* (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat Med *15*, 1170-1178.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Harris, A. L., Polychronidis, A., Gatter, K. C., and Sivridis, E. (2010). Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. J Clin Pathol *63*, 867-872.

Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. Cell Death Differ *12 Suppl 2*, 1473-1477.

Gong, H., Guo, P., Zhai, Y., Zhou, J., Uppal, H., Jarzynka, M. J., Song, W. C., Cheng, S. Y., and 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.

Gonzalez-Polo, R. A., Boya, P., Pauleau, A. L., Jalil, A., Larochette, N., Souquere, S., Eskelinen, E. L., Pierron, G., Saftig, P., and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J Cell Sci *118*, 3091-3102.

Goodwin, B., Watson, M. A., Kim, H., Miao, J., Kemper, J. K., and Kliewer, S. A. (2003). Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. Mol Endocrinol *17*, 386-394.

Goussetis, D. J., Altman, J. K., Glaser, H., McNeer, J. L., Tallman, M. S., and Platanias, L. C. (2010). Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide. J Biol Chem *285*, 29989-29997.

Gray, R., Barnwell, J., McConkey, C., Hills, R. K., Williams, N. S., and Kerr, D. J. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. Lancet *370*, 2020-2029.

Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V.*, et al.* (2010). The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. Mol Cell *40*, 863-876.

Guo, D., Reinitz, F., Youssef, M., Hong, C., Nathanson, D., Akhavan, D., Kuga, D., Amzajerdi, A. N., Soto, H., Zhu, S.*, et al.* (2011). An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. Cancer Discov *1*, 442-456.

Haller, D. G., Tabernero, J., Maroun, J., de Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., and Schmoll, H. J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. J Clin Oncol *29*, 1465-1471.

Heine, G., Dahten, A., Hilt, K., Ernst, D., Milovanovic, M., Hartmann, B., and Worm, M. (2009). Liver X receptors control IgE expression in B cells. J Immunol *182*, 5276-5282.

Hochster, H. S., Hart, L. L., Ramanathan, R. K., Childs, B. H., Hainsworth, J. D., Cohn, A. L., Wong, L., Fehrenbacher, L., Abubakr, Y., Saif, M. W.*, et al.* (2008). Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Results of the TREE study. Journal of Clinical Oncology *26*, 3523-3529.

Hong, C., and Tontonoz, P. (2014). Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. Nat Rev Drug Discov *13*, 433-444.

Hu, B., Unwalla, R. J., Goljer, I., Jetter, J. W., Quinet, E. M., Berrodin, T. J., Basso, M. D., Feingold, I. B., Nilsson, A. G., Wilhelmsson, A.*, et al.* (2010). Identification of phenylsulfone-substituted quinoxaline (WYE-672) as a tissue selective liver X-receptor (LXR) agonist. J Med Chem *53*, 3296-3304.

Huang, C. (2014). Natural modulators of liver X receptors. J Integr Med *12*, 76-85.

Huang, J. Y., Xu, Y. Y., Sun, Z., Zhu, Z., Song, Y. X., Guo, P. T., You, Y., and Xu, H. M. (2012). Comparison different methods of intraoperative and intraperitoneal chemotherapy for patients with gastric cancer: a meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev *13*, 4379-4385.

Huo, H. Z., Zhou, Z. Y., Wang, B., Qin, J., Liu, W. Y., and Gu, Y. (2014). Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014. Biochem Biophys Res Commun *443*, 406-412.

Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J. A., and Steffensen, K. R. (2012). Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. Trends Pharmacol Sci *33*, 394-404.

Jakobsson, T., Vedin, L. L., Hassan, T., Venteclef, N., Greco, D., D'Amato, M., Treuter, E., Gustafsson, J. A., and Steffensen, K. R. (2014). The oxysterol receptor LXRbeta protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. Mucosal Immunol.

Jan, Y., Matter, M., Pai, J. T., Chen, Y. L., Pilch, J., Komatsu, M., Ong, E., Fukuda, M., and Ruoslahti, E. (2004). A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. Cell *116*, 751-762.

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.

Jen, J., Kim, H., Piantadosi, S., Liu, Z. F., Levitt, R. C., Sistonen, P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Hamilton, S. R. (1994). Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med *331*, 213-221.

Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med *9*, 213-219.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L.*, et al.* (2001). Essential role of the

mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature *410*, 549-554.

Katz, A., Udata, C., Ott, E., Hickey, L., Burczynski, M. E., Burghart, P., Vesterqvist, O., and Meng, X. (2009). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. J Clin Pharmacol *49*, 643-649.

Kawamura, T., Endo, Y., Yonemura, Y., Nojima, N., Fujita, H., Fujimura, T., Obata, T., Yamaguchi, T., and Sasaki, T. (2001). Significance of integrin alpha2/beta1 in peritoneal dissemination of a human gastric cancer xenograft model. Int J Oncol *18*, 809-815.

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.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer *26*, 239-257.

Kersse, K., Bertrand, M. J., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2011). NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. Cytokine Growth Factor Rev *22*, 257-276.

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

Korotchkina, L. G., Leontieva, O. V., Bukreeva, E. I., Demidenko, Z. N., Gudkov, A. V., and Blagosklonny, M. V. (2010). The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. Aging (Albany NY) *2*, 344-352.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R.*, et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ *16*, 3-11.

Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D., Van Damme, P., Vanden Berghe, T., Vanoverberghe, I., Vandekerckhove, J., Vandenabeele, P., Gevaert, K., and Nunez, G. (2008). Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. Mol Cell Proteomics *7*, 2350-2363.

Landis, M. S., Patel, H. V., and Capone, J. P. (2002). Oxysterol activators of liver X receptor and 9-cis-retinoic acid promote sequential steps in the synthesis and secretion of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. J Biol Chem *277*, 4713-4721.

Landon, C. D., Benjamin, S. E., Ashcraft, K. A., and Dewhirst, M. W. (2013). A role for the copper transporter Ctr1 in the synergistic interaction between hyperthermia and cisplatin treatment. Int J Hyperthermia *29*, 528-538.

Laurent, A., Nicco, C., Chereau, C., Goulvestre, C., Alexandre, J., Alves, A., Levy, E., Goldwasser, F., Panis, Y., Soubrane, O.*, et al.* (2005). Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. Cancer Res *65*, 948-956.

Lee, G. S., Subramanian, N., Kim, A. I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D. B., Germain, R. N., Kastner, D. L., and Chae, J. J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. Nature *492*, 123-127.

Lee, W. H., Murphree, A. L., and Benedict, W. F. (1984). Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. Nature *309*, 458-460.

Lemaire, S., Lizard, G., Monier, S., Miguet, C., Gueldry, S., Volot, F., Gambert, P., and Neel, D. (1998). Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. FEBS Lett *440*, 434-439.

Lenz, H. J. (2007). Prognostic/Predictive molecular markers in colorectal cancer. Gastrointest Cancer Res *1*, S29-32.

Leonarduzzi, G., Gamba, P., Sottero, B., Kadl, A., Robbesyn, F., Calogero, R. A., Biasi, F., Chiarpotto, E., Leitinger, N., Sevanian, A., and Poli, G. (2005). Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. Free Radic Biol Med *39*, 1152-1161.

Leonarduzzi, G., Gargiulo, S., Gamba, P., Perrelli, M. G., Castellano, I., Sapino, A., Sottero, B., and Poli, G. (2010). Molecular signaling operated by a diet-compatible mixture of oxysterols in up-regulating CD36 receptor in CD68 positive cells. Mol Nutr Food Res *54 Suppl 1*, S31-41.

Li, N., Rivera-Bermudez, M. A., Zhang, M., Tejada, J., Glasson, S. S., Collins-Racie, L. A., Lavallie, E. R., Wang, Y., Chang, K. C., Nagpal, S.*, et al.* (2010). LXR modulation blocks prostaglandin E2 production and matrix degradation in cartilage and alleviates pain in a rat osteoarthritis model. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 3734-3739.

Lievre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J. F., Cote, J. F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M.*, et al.* (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res *66*, 3992-3995.

Lim, S. C., Choi, J. E., Kang, H. S., and Han, S. I. (2010). Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53-caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. Int J Cancer *126*, 1582-1595.

Lo Sasso, G., Bovenga, F., Murzilli, S., Salvatore, L., Di Tullio, G., Martelli, N., D'Orazio, A., Rainaldi, S., Vacca, M., Mangia, A.*, et al.* (2013). Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. Gastroenterology *144*, 1497-1507, 1507 e1491-1413.

Lu, Z., Wang, J., Wientjes, M. G., and Au, J. L. (2010). Intraperitoneal therapy for peritoneal cancer. Future Oncol *6*, 1625-1641.

Luo, B., Li, B., Wang, W., Liu, X., Xia, Y., Zhang, C., Zhang, M., Zhang, Y., and An, F. (2014). NLRP3 Gene Silencing Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy in a Type 2 Diabetes Rat Model. PLoS One *9*, e104771.

Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 741-752.

Malerod, L., Juvet, L. K., Hanssen-Bauer, A., Eskild, W., and Berg, T. (2002). Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. Biochem Biophys Res Commun *299*, 916-923.

Mascia, C., Maina, M., Chiarpotto, E., Leonarduzzi, G., Poli, G., and Biasi, F. (2010). Proinflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on CaCo-2 human enterocyte-like cells: effective protection by epigallocatechin-3-gallate. Free Radic Biol Med *49*, 2049-2057.

Masters, S. L. (2013). Specific inflammasomes in complex diseases. Clin Immunol *147*, 223-228.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. Nat Rev Cancer *7*, 961-967.

Mehlen, P., and Bredesen, D. E. (2011). Dependence receptors: from basic research to drug development. Sci Signal *4*, mr2.

Menke, J. G., Macnaul, K. L., Hayes, N. S., Baffic, J., Chao, Y. S., Elbrecht, A., Kelly, L. J., Lam, M. H., Schmidt, A., Sahoo, S.*, et al.* (2002). A novel liver X receptor agonist establishes species differences in the regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7a). Endocrinology *143*, 2548-2558.

Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., and Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. Nat Immunol *7*, 569-575.

Miki, H., Uehara, N., Kimura, A., Sasaki, T., Yuri, T., Yoshizawa, K., and Tsubura, A. (2012). Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. Int J Oncol *40*, 1020-1028.

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.

Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. Nat Cell Biol *12*, 823-830.

Myhre, A. E., Agren, J., Dahle, M. K., Tamburstuen, M. V., Lyngstadaas, S. P., Collins, A. J., Foster, S. J., Thiemermann, C., Aasen, A. O., and Wang, J. E. (2008). Liver X receptor is a key regulator of cytokine release in human monocytes. Shock *29*, 468-474.

N, A. G., Bensinger, S. J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M. N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Diaz, M., Gallardo, G.*, et al.* (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. Immunity *31*, 245-258.

Nguyen-Vu, T., Vedin, L. L., Liu, K., Jonsson, P., Lin, J. Z., Candelaria, N. R., Candelaria, L. P., Addanki, S., Williams, C., Gustafsson, J. A.*, et al.* (2013). Liver X receptor ligands disrupt breast cancer cell proliferation through an E2F-mediated mechanism. Breast Cancer Res *15*, R51.

O'Donnell, M. A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., Green, D. R., and Ting, A. T. (2011). Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. Nat Cell Biol *13*, 1437-1442.

Okuno, M., Kojima, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Tsurumi, H., Muto, Y., Friedman, S. L., and Moriwaki, H. (2004). Retinoids in cancer chemoprevention. Curr Cancer Drug Targets *4*, 285-298.

Otto, S. E. (1995). Advanced concepts in chemotherapy drug delivery: regional therapy. J Intraven Nurs *18*, 170-176.

Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S., and Brugge, J. S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. Cell *131*, 966-979.

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem *282*, 24131-24145.

Park, M. C., Kwon, Y. J., Chung, S. J., Park, Y. B., and Lee, S. K. (2010). Liver X receptor agonist prevents the evolution of collagen-induced arthritis in mice. Rheumatology (Oxford) *49*, 882-890.

Pencheva, N., Buss, C. G., Posada, J., Merghoub, T., and Tavazoie, S. F. (2014). Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation. Cell *156*, 986-1001.

Perregaux, D., Barberia, J., Lanzetti, A. J., Geoghegan, K. F., Carty, T. J., and Gabel, C. A. (1992). IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. J Immunol *149*, 1294-1303.

Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ *14*, 1583-1589.

Plantier, L., Besnard, V., Xu, Y., Ikegami, M., Wert, S. E., Hunt, A. N., Postle, A. D., and Whitsett, J. A. (2012). Activation of sterol-response element-binding proteins (SREBP) in alveolar type II cells enhances lipogenesis causing pulmonary lipotoxicity. J Biol Chem *287*, 10099-10114.

Polycarpe, E., Arnould, L., Schmitt, E., Duvillard, L., Ferrant, E., Isambert, N., Duvillard, C., Beltramo, J. L., Chevet, D., and Chauffert, B. (2004). Low urine osmolarity as a determinant of cisplatin-induced nephrotoxicity. Int J Cancer *111*, 131-137.

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.

Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R. S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol *23*, 609-618.

Quinn, C. M., Kagedal, K., Terman, A., Stroikin, U., Brunk, U. T., Jessup, W., and Garner, B. (2004). Induction of fibroblast apolipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis. Biochem J *378*, 753-761.

Rebe, C., Raveneau, M., Chevriaux, A., Lakomy, D., Sberna, A. L., Costa, A., Bessede, G., Athias, A., Steinmetz, E., Lobaccaro, J. M.*, et al.* (2009). Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. Circ Res *105*, 393-401.

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.

Rigamonti, E., Helin, L., Lestavel, S., Mutka, A. L., Lepore, M., Fontaine, C., Bouhlel, M. A., Bultel, S., Fruchart, J. C., Ikonen, E.*, et al.* (2005). Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. Circ Res *97*, 682-689.

Rodriguez, I. R., and Larrayoz, I. M. (2010). Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. J Lipid Res *51*, 2847-2862.

Rosen, K., Rak, J., Leung, T., Dean, N. M., Kerbel, R. S., and Filmus, J. (2000). Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. J Cell Biol *149*, 447-456.

Sadeghi, B., Arvieux, C., Glehen, O., Beaujard, A. C., Rivoire, M., Baulieux, J., Fontaumard, E., Brachet, A., Caillot, J. L., Faure, J. L.*, et al.* (2000). Peritoneal

carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. Cancer *88*, 358-363.

Sallam, T., Ito, A., Rong, X., Kim, J., van Stijn, C., Chamberlain, B. T., Jung, M. E., Chao, L. C., Jones, M., Gilliland, T.*, et al.* (2014). The macrophage LBP gene is an LXR target that promotes macrophage survival and atherosclerosis. J Lipid Res *55*, 1120-1130.

Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Kawai, K., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Murono, K., Tada, N., Nirei, T.*, et al.* (2012). Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study. Anticancer Drugs *23*, 675-682.

Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A., and Esumi, H. (2007). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. Cancer Res *67*, 9677-9684.

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.

Schuppan, D., and Schattenberg, J. M. (2013). Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. J Gastroenterol Hepatol *28 Suppl 1*, 68-76.

Scoles, D. R., Xu, X., Wang, H., Tran, H., Taylor-Harding, B., Li, A., and Karlan, B. Y. (2010). Liver X receptor agonist inhibits proliferation of ovarian carcinoma cells stimulated by oxidized low density lipoprotein. Gynecol Oncol *116*, 109-116.

Seo, J. B., Moon, H. M., Kim, W. S., Lee, Y. S., Jeong, H. W., Yoo, E. J., Ham, J., Kang, H., Park, M. G., Steffensen, K. R.*, et al.* (2004). Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. Mol Cell Biol *24*, 3430-3444.

Seres, L., Cserepes, J., Elkind, N. B., Torocsik, D., Nagy, L., Sarkadi, B., and Homolya, L. (2008). Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. Biochim Biophys Acta *1778*, 2378-2387.

Shafaati, M., Marutle, A., Pettersson, H., Lovgren-Sandblom, A., Olin, M., Pikuleva, I., Winblad, B., Nordberg, A., and Bjorkhem, I. (2011). Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. J Lipid Res *52*, 1004-1010.

Shen, S., Kepp, O., and Kroemer, G. (2012). The end of autophagic cell death? Autophagy *8*, 1-3.

Shen, S., Kepp, O., Michaud, M., Martins, I., Minoux, H., Metivier, D., Maiuri, M. C., Kroemer, R. T., and Kroemer, G. (2011). Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. Oncogene *30*, 4544-4556.

Shi, Y., Tang, B., Yu, P. W., Hao, Y. X., Lei, X., Luo, H. X., and Zeng, D. Z. (2012). Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells. PLoS One *7*, e51076.

Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. Nat Cell Biol *6*, 1221-1228.

Smith, E., and Brock, A. P. (1989). The effect of reduced osmolarity on platinum drug toxicity. Br J Cancer *59*, 873-875.

Soong, G., Chun, J., Parker, D., and Prince, A. (2012). Staphylococcus aureus activation of caspase 1/calpain signaling mediates invasion through human keratinocytes. J Infect Dis *205*, 1571-1579.

Stupack, D. G. (2013). Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. Cancer Lett *332*, 133-140.

Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., and Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. Cell *148*, 213-227.

Tamura, K., Chen, Y. E., Horiuchi, M., Chen, Q., Daviet, L., Yang, Z., Lopez-Ilasaca, M., Mu, H., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (2000). LXRalpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 8513-8518.

Torocsik, D., Barath, M., Benko, S., Szeles, L., Dezso, B., Poliska, S., Hegyi, Z., Homolya, L., Szatmari, I., Lanyi, A., and Nagy, L. (2010). Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. J Immunol *184*, 5456-5465.

Tran, B., Kopetz, S., Tie, J., Gibbs, P., Jiang, Z. Q., Lieu, C. H., Agarwal, A., Maru, D. M., Sieber, O., and Desai, J. (2011). Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. Cancer *117*, 4623-4632.

Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat Rev Immunol *10*, 210-215.

Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, H., Hayashi, N., Takeda, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Hada, T., Akira, S.*, et al.* (1999). Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. Immunity *11*, 359-367.

Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., Betz, K. S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J. G., and Wang, T. C. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. Cancer Cell *14*, 408-419.

Uno, S., Endo, K., Jeong, Y., Kawana, K., Miyachi, H., Hashimoto, Y., and Makishima, M. (2009). Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. Biochem Pharmacol *77*, 186-195.

Upton, J. W., Kaiser, W. J., and Mocarski, E. S. (2010). Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. Cell Host Microbe *7*, 302-313.

Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Zhivotovsky, B. (2010). The unpredictable caspase-2: what can it do? Trends Cell Biol *20*, 150-159.

Vedin, L. L., Gustafsson, J. A., and Steffensen, K. R. (2012). The oxysterol receptors LXRalpha and LXRbeta suppress proliferation in the colon. Mol Carcinog.

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.

Vejux, A., and Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. Mol Aspects Med *30*, 153-170.

Venteclef, N., Jakobsson, T., Ehrlund, A., Damdimopoulos, A., Mikkonen, L., Ellis, E., Nilsson, L. M., Parini, P., Janne, O. A., Gustafsson, J. A.*, et al.* (2010). GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. Genes Dev *24*, 381-395.

Villablanca, E. J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentinis, B., Bregni, M.*, et al.* (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. Nat Med *16*, 98-105.

Voss, V., Senft, C., Lang, V., Ronellenfitsch, M. W., Steinbach, J. P., Seifert, V., and Kogel, D. (2010). The pan-Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. Mol Cancer Res *8*, 1002-1016.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science *296*, 1635-1636.

Walcher, D., Vasic, D., Heinz, P., Bach, H., Durst, R., Hausauer, A., Hombach, V., and Marx, N. (2010). LXR activation inhibits chemokine-induced CD4-positive lymphocyte migration. Basic Res Cardiol *105*, 487-494.

Wang, D., and Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov *4*, 307-320.

Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R. E., Berge, K. E., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. J Clin Invest *110*, 671-680.

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.

Zhang, W., Jiang, H., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, A., Zhao, Y., Zhu, X., Lin, Z., and Yuan, X. (2014). Liver X receptor activation induces apoptosis of melanoma cell through caspase pathway. Cancer Cell Int *14*, 16.

Zhou, H., Liu, W., Su, Y., Wei, Z., Liu, J., Kolluri, S. K., Wu, H., Cao, Y., Chen, J., Wu, Y.*, et al.* (2010). NSAID sulindac and its analog bind RXRalpha and inhibit RXRalpha-dependent AKT signaling. Cancer Cell *17*, 560-573.

Zuercher, W. J., Buckholz, R. G., Campobasso, N., Collins, J. L., Galardi, C. M., Gampe, R. T., Hyatt, S. M., Merrihew, S. L., Moore, J. T., Oplinger, J. A.*, et al.* (2010). Discovery of tertiary sulfonamides as potent liver X receptor antagonists. J Med Chem *53*, 3412-3416.