



Rôle des récepteurs aux oxystérols LXR_s (Liver X Receptors) dans la dissémination métastatique du cancer de la prostate

Anthony Alioui

► To cite this version:

Anthony Alioui. Rôle des récepteurs aux oxystérols LXR_s (Liver X Receptors) dans la dissémination métastatique du cancer de la prostate. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. <NNT : 2016CLF22780>. <tel-01587657>

HAL Id: tel-01587657

<https://theses.hal.science/tel-01587657v1>

Submitted on 14 Sep 2017

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.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

N° D. U. 2780

UNIVERSITÉ D'Auvergne

ANNEE : 2016

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 709**

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire
(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement par

Anthony ALIOUI

Le 19 décembre 2016

**Rôle des récepteurs aux oxystérols LXRs (*Liver X Receptors*) dans la
dissémination métastatique du cancer de la prostate**

Rapporteurs : Dr. Muriel LE ROMANCER-CHERIFI, UMR 1052 CRCL, Lyon

Pr. Vincenzo RUSSO, Ospedale San Raffaele, Milan

Examineurs : Dr. Véronique COXAM, UMR 1019 UNH Clermont-Ferrand

Pr. Florence CALDEFIE-CHEZET, UMR 1019 UNH Clermont-Ferrand

Pr. Noam ZELCER, Academic Medical Center, Amsterdam.

Directeur de thèse : Dr. Silvère BARON, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Laboratoire UMR GReD CNRS-INSERM-Clermont Université

Rôle des récepteurs aux oxystérols LXR_s (Liver X Receptors) dans la dissémination métastatique du cancer de la prostate.

La prise en charge clinique du cancer de la prostate est complexe. L'identification des éléments et altérations génétiques impliqués dans la progression de la maladie est donc capitale. Les altérations métaboliques représentent des changements clés vis-à-vis de la croissance de la cellule tumorale. Parmi ces modifications, l'augmentation du métabolisme du cholestérol est fréquemment observée au sein de différentes pathologies tumorales, dont le cancer de la prostate. En lien, des études épidémiologiques associent l'enrichissement du cholestérol avec une augmentation de l'incidence, la progression et l'agressivité de la maladie. Les récepteurs nucléaires aux oxystérols LXR_s (Liver X Receptors) constituent des régulateurs majeurs de l'homéostasie du cholestérol, et différents travaux récents mettent en évidence leur potentiel anti-prolifératif et pro-apoptotique dans différentes lignées cellulaires du cancer de la prostate. En association ces travaux de thèse démontrent, dans un modèle murin d'adénocarcinome prostatique PTEN-dépendant, une activation endogène et constitutive des LXR_s en réponse à une augmentation du taux de cholestérol intra-prostatique, principale source des ligands oxystérols. L'invalidation additionnelle des LXR_s dans ce contexte conduit à une augmentation importante de la croissance tumorale et à la dissémination métastatique, notamment expliquée par une dérégulation de la voie du TGF β et de la transition épithélio-mésenchymateuse. L'ensemble de ces résultats place les LXR_s comme des cibles thérapeutiques prometteuses.

Mots clés : Cancer, Prostate, LXR_s, Cholestérol, Métabolisme, PTEN.

LXR_s (Liver X Receptors) involvement during prostate cancer metastatic dissemination.

Clinical management of prostate cancer is complex. The identification of elements and genetic alterations involved in disease progression is therefore crucial. Metabolic alterations represent key modifications during tumor cell growth. Among these modifications, cholesterol metabolism increase is frequently observed in various tumor pathologies, including prostate cancer. Related, epidemiological studies associate cholesterol enrichment with an increase of disease incidence, progression and aggressiveness. LXR_s (Liver X Receptors) belong to the nuclear receptors superfamily and represent major sensors and regulators of cholesterol homeostasis. Recent studies have demonstrated their anti-proliferative and pro-apoptotic potential in various prostate cancer cell lines. In link, this thesis work demonstrate endogenous and constitutive activation of LXR_s in a murine model of PTEN-dependent prostate adenocarcinoma in response to an increase of intra-prostatic cholesterol, the major source of oxysterol ligands. The additional invalidation of LXR_s in this context leads to a significant increase of tumor growth and metastatic dissemination, notably explained by a TGF β pathway deregulation, concomitant with epithelial-mesenchymal transition process increase. All of these results define LXR_s as promising therapeutic targets.

Key words : Cancer, Prostate, LXR_s, Cholesterol, Metabolism, PTEN.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : le Docteur Muriel Le Romance-Chérifi, le Professeur Vincenzo Russo, le Docteur Véronique Coxam, le Professeur Florence Caldefie-Chézet et le Professeur Noam Zelcer d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe « LXR » que j'ai côtoyé tout au long de ces années de thèse : Silvère, Jean-Marc, Laurent, Amalia, David, Cyrille, Aurélie, Allan, Amandine, Lauriane, Betty, Laura, Guy, Hugues, Julie, Salwan, Marine. Leur accueil fût chaleureux et leurs conseils très précieux.

Je tiens tout particulièrement à remercier Silvère pour m'avoir fait confiance pendant ces trois années. Merci de m'avoir habilement inculqué toutes les qualités nécessaires à mener un projet de thèse dans de bonnes conditions, qualités qui continueront de m'aider tout au long de ma carrière. Merci d'avoir toujours su trouver des solutions et m'épauler dans les moments difficiles du projet, mais également pour m'avoir laissé beaucoup d'autonomie et d'initiatives l'instant venu. J'admire ta qualité de réflexion et ta culture scientifique, mais ne prends pas la grosse tête quand même « mon garçon ».

Je remercie Jean-Marc pour m'avoir accueilli dans l'équipe et « sorti du ruisseau ». Dans un certain sens tu as raison, ces trois années passées avec vous, avec toi, m'ont beaucoup enseigné. Tu as toujours été de bon conseil et rassurant. Je pense que tu resteras à mes yeux une personne charismatique, et j'espère que tu profiteras bien de ton échappée italienne (l'école doctorale est maintenant en berne). J'attends toujours la blague de la figue au fait...

Merci à Laurent, le Grand Sage. Comme Jean-Marc, tu as été de très bon conseil. Tes remarques sont toujours diablement pertinentes, ta culture scientifique vaste, et tu sauras éternellement rassurer les étudiants en détresse grâce à ton calme olympien.

Je remercie Julie que je n'ai pas eu la chance de côtoyer assez longtemps, qui s'est très bien occupée de moi dès mon arrivée, et sans qui le projet ne serait pas aussi aboutit à l'heure actuelle.

Je remercie Allan, tu m'as toujours apporté ton aide en temps voulu, enfin quand tu n'étais pas occupé avec un stagiaire quoi. J'espère que la fin de ta thèse se déroulera bien, tu le mérites amplement.

Merci à Laura. Ton intérêt pour le projet, ta présence et tes questions ont su m'apporter un élan de réflexion, de force et de motivation lors de ma dernière année de thèse. J'espère que ton doctorat se déroulera aussi bien que la mien, enfin tout du moins si tu le termines vivante mademoiselle catastrophe. Nous n'avons passé qu'une année ensemble mais je pense que nous avons beaucoup partagé. Ne te décourage pas face aux moments difficiles, ton travail finira par payer, enfin si tu fais pas exploser le labo.

Je remercie Aurélie, qui a su me régaler les papilles pendant ces 3 années. Ta bonne humeur communicative et tes talents de cuisinière ont été deux gros atouts non négligeables au sein de l'équipe.

Betty, tout comme Aurélie, ta bonne humeur a souvent été communicative et j'espère que tout se passe bien pour toi au pays du Jazz et des Poneys.

Cyrille, je pense que tes talents d'auteur ne sont plus à démontrer. Après trois années passées à tes côtés, je suis toujours autant surpris par ton sens de l'imagination et tes boutades recherchées, enfin quand je les comprends !

Je remercie Amandine R, le trait d'union. L'école buissonnière Lyonnaise fût fort sympathique lors de notre balade au zoo.

Merci à toi monsieur le double Docteur Maqdasy. Ta présence au labo le mercredi est à chaque fois une bouffée d'air et un sas de décompression. Et oui, tu en racontes des bêtises... entre deux prescriptions médicales par téléphone.

Merci à Amalia, entre fumeurs nous avons su nous entraider lors de ces trois années, il est temps que j'arrête.

Je remercie David pour ses remarques souvent pertinentes sur la conduite de mon projet de thèse lors de nos réunions d'équipe.

Merci à Guy, principale personne à me faire de la concurrence le week-end au laboratoire. En effet depuis ton retour au sein de notre équipe, j'ai plutôt tendance à réserver les salles de culture cellulaire ou de western blot. Tu es quelqu'un de courageux et tu ne te démoralises jamais, tes questions sont toujours justifiées, et tes conseils ont su faire avancer mon projet, mais tu chantes un peu trop fort Monsieur Ouedraogo !

Je remercie Lauriane. J'espère que ton post-doctorat s'achèvera dans les meilleures conditions, que la perspective de carrière que tu comptes réaliser se déroulera bien. On garde contact au cas où j'aie un comptage cellulaire un de ces jours, je sais que tu me feras ça en deux deux (non ne pleurs pas).

Merci à Olivier, pour m'avoir rassasié de ses délicieuses viennoiseries chaque semaine. Je te souhaite une bonne continuation, et bon courage pour la rédaction de ton manuscrit.

Merci à Manue, qui a su répondre à toutes mes questions lors de ces années passées au sein du bureau des étudiants, je te souhaite un bon post-doc en Antarctique !

Je remercie Nada, qui je l'espère, est également en train de finaliser sa soutenance de thèse en Algérie.

Le laboratoire, ce n'est pas qu'une seule équipe, et c'est pour cette raison que je tiens à remercier les autres personnes que j'ai rencontrées au cours de ces trois années de thèse.

Mon très cher Pierre, qu'aurait été la thèse sans toi... Je n'ai pas assez de superlatifs pour te qualifier. En plus d'être de bon conseil et de posséder une connaissance démesurée, on peut dire que les discussions journalières de notre quatuor de choc ont toujours été riches et désopilantes..., et malveillantes. Je pense que le laboratoire aurait du mal à trouver une personne aussi polyvalente que toi si un jour tu as à partir.

Merci à Antoine et Marie d'avoir répondu de manière très précise à toutes les questions scientifiques que j'ai pu leur poser, et de m'avoir fait découvrir des plats et des aliments toujours plus exotiques à chaque repas.

Je remercie Marie B. Ton excellent travail de thèse, mené de front avec tout le reste, impose le respect.

Je remercie Emilie P, ton caractère bien trempé et ta bonne humeur ont su rythmer la vie du laboratoire.

Merci à Cyril D. Je te souhaite de poursuivre ta thèse comme tu l'as commencé, et je n'ose même pas imaginer la qualité de tes schémas quand tu soutiendras ta thèse (jalousie). C'est bien je suis fier de toi gamin.

Un grand merci à Amandine S, qui a sacrifié beaucoup de temps pour tenter de faire rentrer dans mon cerveau hermétique la passion de la bio-informatique, mais aussi pour avoir participé à la révision de mon papier. Ta motivation, ta pédagogie et ta bonne humeur ont eu raison de moi, la bio-info c'est pas si mal ! En espérant que tu puisses réaliser ta thèse au sein de notre laboratoire.

Merci à Houda, grâce à qui j'ai pu améliorer ma précision en lancer de projectiles de toutes sortes dans le bureau des étudiants.

Merci à Mike, qui a la lourde tâche de subir toutes nos plaintes concernant les commandes. Grâce (ou à cause) de toi, je me suis découvert une aversion pour la Jager Bomb. J'espère que tout ira bien pour toi en cette fin de thèse. Comme je te l'ai toujours dit, si un jour tu veux changer de vocation, investis ton pécule au 4 Rue Eugène Gilbert, 63000, Clermont-Ferrand.

Merci à Stéphanie, grande prêtresse du western blot semi-sec. Je me souviens de cet été 2016 où je te faisais découvrir Pokemon Go. On peut dire que maintenant tu aurais bien plus à m'apprendre.

Je remercie Isa, dit « zaza la magouille » ou encore « zaza l'embrouille », ou bien « zaza la débrouille », et même « zaza les bons tuyaux ». On le comprend bien, tu es un élément essentiel au bon fonctionnement de ce laboratoire, et ta bonne humeur éternelle détend les esprits (Chantal Lauby n'a qu'à bien se tenir).

Merci à la « jeune » Gaëlle, reine de la culture cellulaire de masse.

Je remercie Corinne et lui souhaite un bon épanouissement dans sa nouvelle équipe de recherche. En espérant que son nouveau bureau soit un peu plus calme !

Je remercie Rachel de m'avoir « servie » de garde manger pendant ces trois ans de thèse, et d'avoir impitoyablement corrigé mon manuscrit. Ta gentillesse te perdra !

Un grand merci à Ayhan de m'avoir initié, il y a de cela... beaucoup trop d'années, à la recherche et la vie au sein d'un laboratoire. Je t'en suis et t'en serai éternellement reconnaissant, puisque c'est avec toi que tout a commencé.

Merci à Alison d'avoir été ma fournisseuse de stylos attitrée lorsque j'étais en galère en culture cellulaire. J'espère que la poursuite de ton projet de recherche ira pour le mieux.

Je remercie Alex, pour s'occuper du petit Ayhan. Il faut toujours quelqu'un pour surveiller qu'il ne fasse pas de bêtise ce petit garnement. Je brûlerai un cierge pour toi dès que possible afin de lever la malédiction du western blot.

Merci à Typhanie. Tu as fait parti de notre trio infernal lors de ces trois années de thèse. J'aurais tant de jolies choses à te dire mais je vais rester bref, tu vas devenir toute rouge sinon. J'espère que la fin de ta thèse se déroulera pour le mieux, et la vie en laboratoire sans toi va me manquer. Désolé de tous les surnoms dont je t'ai affublé, mais après tout qui aime bien châtie bien... A très vite ma petite T**ffe.

Je remercie Fabrice de s'être occupé de Marjorie pendant ces années de thèse. Ça va qu'elle s'est jamais plainte, sinon j'aurais fait qu'une bouchée de toi petit minus.

Merci à JC, toujours de bon conseil. Il fait bon avoir un bon vivant au sein de ce laboratoire ! Si un jour j'ai besoin de trouver une bonne table sur Clermont, je sais à qui aller demander.

Je remercie Claude. Ta rapidité d'analyse me trouveras toujours le ***. Merci de répondre, avec un sens aigu de la précision, très aigu ahem, à la moindre de mes questions. J'ai bien essayé de te ressembler en achetant des lunettes mais ça marche pas aussi bien...

Merci à Françoise, qui sait trouver des combinaisons vestimentaires toujours plus originales !

Merci à Lia, qui nous a toujours chaleureusement apporté de l'aide lors de nos déboires aux cytomètre. Je te souhaite une bonne continuation, particulièrement en ce qui concerne ton heureux évènement.

Un grand merci à Christelle et Angélique, qui m'ont épaulé du début de la thèse jusqu'au moment où je rédige ces lignes. Vous m'avez appris énormément de choses et votre rôle au sein de ce laboratoire est plus que central.

Merci à Jean-Paul, mon acolyte de tous les jours, surtout en ce qui concerne l'élaboration de n'importe quelle chose qui fait du bruit quand elle explose. J'espère que même quand je serai parti, tu auras encore peur que je t'attende au détour d'un couloir...

Je n'oublie pas de remercier les bouts en train de Biomove (Margaux, Pierre, Maxime), avec qui j'ai pu partager bon nombre de fous rires au cours de ces trois années. Même s'ils ne travaillent plus directement à nos côtés, je pense à et remercie Aurélien et Rosyne, auprès desquels j'ai passé tout mon cursus universitaire.

Marjorie... comment être concis ? Mes remerciements ne concernent pas uniquement nos trois années de thèse, certainement pas. Tu es à mes côtés depuis 7 ans, toujours prête à m'épauler à chaque instant, à m'écouter, me réconforter. Ta force a su me faire tenir bon tout au long de ces années, même si je n'y ai pas toujours mis du mien. Je ne vais pas écrire tout ce que je pense de toi, je pourrais rédiger une deuxième introduction bibliographique. Continuons gaiement notre petit bout de chemin tous les deux, longue vie à nous, Pétuc.

Je n'oublie pas les membres passés de l'équipe et plus généralement du laboratoire.

Toi non plus H., je ne t'oublie pas.

Un grand merci à mes plus fidèles amis, qui ont été une véritable soupape de sécurité pour moi au cours de ces 3 années. Nos chemins se séparent progressivement mais vous serez toujours là.

Finalement un immense merci à Florence et Pascal, mes parents, pour tout...

Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès ou conférences

Journées de l'Ecole Doctorale 2016 (JED), Clermont-Ferrand, 2 Juin 2016. Liver X Receptors : White Knights fighting against prostate cancer metastasis.

5^{ème} Journée Scientifique des Récepteurs Nucléaires, Clermont-Ferrand, 5 juin 2015. Liver X Receptors activation in prostatic tumors constrains cancer metastasis.

Journée Scientifique du CRNH Auvergne 2013, Clermont-Ferrand, 21 novembre 2013. Rôle protecteur des LXRs dans la croissance tumorale et la dissémination du cancer de la prostate.

Communications affichées

EMBO Nuclear Receptors, Ajaccio, 24-28 Septembre 2015
Alioui A, Dufour J, Pommier A, Trousson A, Leoni V, Wittrant Y, Lobaccaro JMA, Baron S. *Liver X Receptors : « Gatekeepers » against prostate cancer metastasis.*

1^{ère} journée des Oncoriales (Cancéropôle CLARA), Lyon, 7 juillet 2015
Alioui A, Dufour J, Pommier A, Trousson A, Leoni V, Kemeny JL, Wittrant Y, Guy L, Lobaccaro JMA, Baron S. *Liver X Receptors activity and prostatic tumors spreading.*

10^{ème} Journée Scientifique du Cancéropôle CLARA. Lyon, 7-8 avril 2015
Alioui A, Dufour J, Pommier A, Trousson A, Leoni V, Kemeny JL, Wittrant Y, Guy L, Lobaccaro JMA, Baron S. *Liver X Receptors activation in prostatic tumors constrains cancer metastasis.*

23^{ème} Journée Scientifique de l'ARTP. Paris, 19 novembre 2014
Alioui A, Dufour J, Pommier A, Trousson A, Leoni V, Kemeny JL, Guy L, Lobaccaro JMA, Baron S. *Liver X Receptors activation in prostate constrains cancer growth and metastasis progression.*

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles en cours de soumission :

Alioui A, Dufour J, Leoni V, Loregger A, Moeton M, Volle D, Lobaccaro JMA, Zelcer N, Baron S. Liver X Receptors constrain tumor development and metastasis dissemination in PTEN-deficient prostate cancer. Soumis. **(Article 1)**

Alioui A, Dufour J, Bousset L, Volle D, Lobaccaro JMA, Baron S. Liver X Receptors limit prostate metastasis dissemination by interfering with TGF β -EMT axis. Soumis **(Article 2)**

Les articles suivants sont présentés en annexes :

Anthony Alioui, Olivier Celhay, Silvère Baron and Jean-Marc A Lobaccaro. Lipids and prostate cancer adenocarcinoma. Clinical lipidology (2014). Vol. 9, No. 6, Pages 643-655. **Review (Article 3)**

De Boussac H, Alioui A, Viennois E, Dufour J, Trousson A, Vega A, Guy L, Volle DH, Lobaccaro JM, Baron S. Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions. Expert Opin Ther Targets (2013). Sep;17(9):1029-38. **Review (Article 4)**

RÉSUMÉ

Les altérations métaboliques représentent des changements clés vis-à-vis de la croissance de la cellule tumorale. Parmi ces modifications, l'augmentation du métabolisme du cholestérol est fréquemment observée au sein de différentes pathologies tumorales, dont le cancer de la prostate. En lien, des études épidémiologiques associent l'enrichissement du cholestérol avec une augmentation de l'incidence, la progression et l'agressivité de la maladie. Les LXRs constituent des régulateurs majeurs de l'homéostasie du cholestérol, notamment *via* l'activation de son efflux hors de la cellule ou l'inhibition de son captage par cette dernière. On peut alors s'interroger quant à leur implication dans la pathologie. Différentes études menées notamment par notre équipe démontrent les effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques des LXRs sur des lignées tumorales, associés à une fonction dans la régulation de l'initiation du cancer *in vivo*.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle des LXRs dans les phases avancées du cancer à l'aide d'un modèle murin de tumorigenèse prostatique basé sur l'invalidation du suppresseur de tumeur *Pten*, fréquemment altéré dans la pathologie humaine. Le travail s'est focalisé plus particulièrement sur l'événement de dissémination métastatique.

Les résultats montrent une activation constitutive des LXRs suite à la mutation de *Pten*, en raison d'une augmentation de la synthèse *de novo* de cholestérol et un apport massif des ligands des LXRs. Cet événement a été corrélé à une augmentation de la maturation protéique du régulateur principal de la voie du mévalonate SREBP2, et expliqué par la suractivation de la voie PI3K/AKT. L'invalidation des LXRs au sein des souris *Pten*^{-/-} entraîne une augmentation sévère de la dissémination métastatique, indiquant que l'activité des récepteurs permet de contenir le cancer au niveau du site primaire. Les cellules tumorales sont de plus caractérisées par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques du tissu osseux. Ce rôle de « gardien » a été associé à une modulation du processus de transition épithélio-mésenchymateuse *via* la régulation de la voie du TGFβ, signalisation fortement impliquée dans la progression du cancer de la prostate.

Au final, ces résultats mettent en évidence que les LXRs peuvent exercer un rôle de barrière limitant la progression tumorale, notamment par l'intermédiaire de la régulation de processus clés impliqués dans la dissémination métastatique du cancer de la prostate.

Mots clés : Cancer, Prostate, LXRs, Cholestérol, PTEN.

ABSTRACT

Metabolic alterations represent key events with respect to the tumoral cell growth. Among these modifications, cholesterol metabolism increase is frequently observed in various tumor diseases, including prostate cancer. In relation, epidemiological studies associate cholesterol enrichment with incidence, progression and aggressiveness of the disease. Interestingly, LXRs represent major sensors and regulators of cholesterol homeostasis, *via* the activation of its efflux out of the cell and capture inhibition within the latter. We can then ask for their involvement in the pathology. Some studies especially conducted by our team demonstrated anti-proliferative and pro-apoptotic effects on tumor cell lines, associated with an involvement in cancer initiation *in vivo*.

The aim of this thesis was to study the role of LXRs during advanced stages of the disease, using a prostate tumorigenesis mouse model based on *Pten* tumor suppressor gene invalidation, frequently altered in human pathology. The work focused specifically on metastatic dissemination event.

Our study shows a constitutive activation of LXRs following mutation of *Pten*, due to an increase of *de novo* cholesterol synthesis and a massive influx of LXRs ligands. This event was related to an increase in protein maturation of the mevalonate pathway main regulator SREBP2, and explained by an over-activation of PI3K/AKT pathway. Invalidation of LXRs within *Pten*^{-/-} mice leads to a severe increase in metastatic events, indicating that the receptors activity helps to constrain cancer in its primary site. Tumor cells are further characterized by the expression of molecular markers specific of bone tissue. This « gatekeeper » function was associated with the modulation of the epithelial-mesenchymal transition process through TGFβ pathway regulation, strongly implicated in prostate cancer progression.

Finally, these results demonstrate that LXRs may exert a role of barrier limiting tumor progression, particularly through the control of key processes involved in prostate cancer metastasis.

Keywords: Cancer, Prostate, LXRs, Cholesterol, PTEN.

ABRÉVIATIONS

2DG-750	<i>2-DeoxyGlucosone-750</i>
8-oxo-DG	<i>8-oxo-7,8,dihydro-29-deoxyguanosine</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACAT1/2	<i>Acyl-coa acyltransferases</i>
ACC	<i>Acetyl-coa carboxylase</i>
ACETYL-COA	<i>Acetyl-coenzyme A</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
AF1	<i>Activation function 1</i>
AKT (PKB)	<i>Protein kinase B</i>
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
AMACR	<i>α-Methylacyl coenzyme A racemase</i>
APC/C	<i>Anaphase-promoting complex</i>
APE/Ref1	<i>Human apurinic (apyrimidinic) endonuclease/redox-factor 1</i>
APO	<i>Apolipoprotein</i>
AR	<i>Androgen receptor</i>
ARE	<i>Androgen response element</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
BAD	<i>Bcl-associated death</i>
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
BCL2L11	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
CALDESMON	<i>Calmodulin-binding actin-regulatory protein</i>
CAMs	<i>Cell adhesion molecules</i>
CARET	<i>Carotene and retinol efficacy trial</i>
CBP	<i>c-AMP response element binding protein</i>
CCL4	<i>C-C motif chemokine ligand 4</i>
CCR	<i>C-C chimiokine receptor</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
CDH11	<i>Cadherin 11</i>
CEH	<i>Cholesterol ester hydrolase</i>
CENPC	<i>Centromere protein C</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>

CHECK	<i>Checkpoint kinase</i>
CHREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
CIRC	<i>Centre international de recherche sur le cancer</i>
CM	<i>Chylomicron</i>
CMR	<i>Chylomicron-remnant</i>
COP	<i>COat protein</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CPA	<i>Cyproterone acetate</i>
CREB	<i>Cyclic-AMP response element binding protein</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
CRPC	<i>Castration-resistant prostate cancer</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CX3CL1	<i>C-X3-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor type</i>
CYP	<i>Cytochrome P450 family</i>
DAX1 (NROB1)	<i>Orphan nuclear receptor B1</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DES	<i>Diethylstilbestrol</i>
DGAT	<i>Diglyceride acyltransferase</i>
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
DHCR7	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>
DHEA	<i>Dehydroepiandrosterone</i>
DHT	<i>Dihydrotestosterone</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DKK1	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>
DLL1	<i>Delta-like ligand 1</i>
DMP1	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>
DR/IR	<i>Direct repeat/Inverted repeat</i>
DRM	<i>Detergent-resistant membrane domain</i>
DSH	<i>Dishevelled</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E2F	<i>E2 transcription factor</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>EGF receptor</i>

EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
ElaC2	<i>Ela C homolog</i>
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition</i>
ERG	<i>Erythroblast transformation-specific</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ETS	<i>E-twenty-six</i>
ETV	<i>ETS-translocation variant</i>
EZH2	<i>Enhancer of zest homolog 2</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAS (APO-1)	<i>Apoptosis antigen 1</i>
FASL	<i>FAS ligand</i>
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
FBP	<i>Fructose-1,6-biphosphatase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>FGF receptor</i>
FKBP5	<i>FK506 binding protein 5</i>
FOX	<i>Forkhead box protein</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
FZL	<i>Frizzled</i>
G6P	<i>Glucose-6-phosphatase</i>
GAB1/2	<i>Grb2-associated binder 1/2</i>
GLI	<i>Glioma-associated oncogene 1</i>
GLUT4	<i>GLUcose transporter 4</i>
GNRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GRIP1	<i>Glucocorticoid receptor-interacting protein 1</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HDAC	<i>Histone desacetylase</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HES-1	<i>Hairy-enhancer of spli</i>
HGPIN	<i>High grade PIN</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HIFU	<i>High intensity focused ultrasound</i>
HMG-COA	<i>Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase</i>
HMGCR	<i>HMG-CoA reductase</i>

HMGCS	<i>HMG-CoA synthase</i>
HPC1	<i>Hereditary prostate cancer locus 1</i>
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IDOL	<i>Inducible degrader of the LDLR</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>IGF receptor</i>
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
IKK	<i>I kappa B kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
INOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
INSIG	<i>Insulin induced gene</i>
IRS1/2	<i>Insulin receptor substrate 1/2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LCAT	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>LDL receptor</i>
LGPIN	<i>Low grade PIN</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
LHRH	<i>LH releasing hormone</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRP1	<i>LDLR-related protein-1</i>
LXRE	<i>LXR response element</i>
LXRs	<i>Liver X receptors</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MEC	<i>Matrice extracellulaire</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MMTV-Cre	<i>Mouse mammary tumor virus-cre</i>

ABRÉVIATIONS

MPAKT	<i>Murine prostate restricted AKT kinase transgenic mice</i>
MPECs	<i>Mouse prostatic epithelial cells</i>
MSMB	<i>Beta-microseminoprotein</i>
MSR1	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>
MSX2	<i>Msh homeobox 2</i>
MYC	<i>V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
N-COR	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NEDD	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated</i>
NFkB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killers</i>
NKX3.1	<i>NK3 homeobox 1</i>
NL1	<i>Nuclear localization 1</i>
NPC1L1	<i>Niemann-pick C1 like 1</i>
NR1H2/3	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2/3</i>
NSB1	<i>Nijmegen breakage syndrome gene 1</i>
NTD	<i>N-terminal domain</i>
OCN	<i>Osteocalcin</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
OPN (SPP1)	<i>Osteopontin (Secreted Phosphoprotein 1)</i>
OSX	<i>Osterix</i>
P27KIP1	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
PAIs	<i>Plasminogen activator inhibitors</i>
PAP	<i>Prostatic acid phosphatase</i>
PAR-4	<i>Prostate apoptosis response-4</i>
PCA3	<i>Prostate cancer antigen 3</i>
PCK	<i>Phospho-enol-pyruvate-carboxykinase</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>PDGF receptor</i>
PDK1/2	<i>Phosphatidylinositide-dependent kinases 1/2</i>
PECAM1	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule -1</i>
PGC1a	<i>PPAR-gamma co-activator 1a</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>

PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PHLPP	<i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIA	<i>Proliferative inflammatory atrophy</i>
PIN	<i>Prostate intraepithelial neoplasia</i>
PIP2/3	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>
PKA/C	<i>Protein kinase A/C</i>
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i>
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
PTDINS-P	<i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTHRP	<i>Parathyroid hormone related protein</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
RAD51	<i>Radiation sensitive 51</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>RANK ligand</i>
RAP250	<i>Nuclear receptor-activating protein 250</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RB	<i>Retinoblastoma</i>
RCT	<i>Reverse cholesterol transport</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNase L	<i>Ribonuclease L</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RUNX2.3	<i>Runt-related transcription factor 2/3</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
S1P/S2P	<i>Site 1/Site 2 protease</i>
SA- β -Gal	<i>Senescence-associated beta-galactosidase</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SCD	<i>Stearoyl-coa desaturase</i>
SDF1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SF1	<i>Splicing factor 1</i>

SFRP2	<i>Secreted frizzled-related protein 2</i>
SHC	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SHIP1/2	<i>SH2-domain-containing inositol phosphatase</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SKP2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic</i>
SMRT	<i>Silencing mediator for RAR and Tr</i>
SOX	<i>Sry-related HMG box</i>
SQS	<i>Squalene synthase</i>
SRB1	<i>Scavenger receptor class B</i>
SRC1	<i>Nuclear receptor coactivator 1</i>
SRE	<i>Sterol response element</i>
SREBPs	<i>Sterol response element binding proteins</i>
STAT2	<i>Signal transducer and activator of transcription 2</i>
STS	<i>Steroid sulfatase</i>
SULT2A1	<i>Sulfotransferase 2a1</i>
SULT1E1	<i>Sulfotransferase 1e1</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modified</i>
TAK1	<i>TGF-beta-activated kinase-1</i>
TAMs	<i>Tumor associated macrophages</i>
TAN	<i>Tumor associated neutrophils</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TFM	<i>Testicular feminized mouse</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TGF β R	<i>TGFβ receptor</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TLR	<i>Triglyceride rich lipoprotein</i>
TMN	<i>Tumor Nodes Metastasis</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine 2</i>
TRAMP	<i>Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate</i>
TRRAP	<i>Transformation/Transcription domain-associated protein</i>
UGE	<i>Urogenital epithelium</i>

ABRÉVIATIONS

UGM	<i>Urogenital mesenchyme</i>
UGS	<i>Urogenital sinus</i>
UGT1A3	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A3</i>
UPA	<i>Urinary-type plasminogen activator</i>
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VLDLR	<i>VLDL receptor</i>
WAT	<i>White adipose tissue</i>
WNT	<i>Wingless type</i>

SOMMAIRE

<u>SOMMAIRE</u>	1
<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</u>	5
I) LA PROSTATE : PHYSIOLOGIE ET CARCINOGENÈSE	6
1) Physiologie prostatique	6
A) Structure et fonction de la glande prostatique	6
B) Implication des androgènes dans la physiologie de la prostate adulte	7
2) Le cancer de la prostate	8
A) Prédispositions et facteurs de risques	8
(1) Les antécédents familiaux	9
(2) Âge	10
(3) Mode de vie	10
(a) Alimentation	11
(b) Environnement	12
B) Diagnostic et biomarqueurs	13
C) Etapes de la carcinogenèse et classification des tumeurs prostatiques	14
(1) Atrophie inflammatoire proliférative (PIA)	14
(2) Néoplasie intra-épithéliale (PIN)	14
(3) Carcinome et cancer métastatique	15
(4) Classification et évaluation de l'agressivité tumorale	15
(a) Classification TMN	15
(b) Classification de d'Amico	15
(c) Score de Gleason	15
D) Prise en charge du patient et traitements	16
(1) Cancer localisé	16
(2) Cancer avancé	17
E) Mécanismes de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate	19
(1) Processus majeurs régulant la carcinogenèse prostatique	19
(a) Inflammation	19
(b) Stress oxydant	20
(c) Sénescence	20
(d) Réactivation des voies développementales	21
(e) Activité télomérique	21
(2) Altérations génétiques et progression tumorale	22
(a) Altération de AR et fusion TMPRSS2-ERG	22
(b) Surexpression de Myc	23
(c) Diminution de l'expression de NKX3.1	24
(d) Inactivation de PTEN	24
(e) Suractivation de la voie des MAPK	25
(f) Autres altérations associées au cancer de la prostate	25
(i) <i>Rétinoblastome (RB)</i>	25
(ii) <i>P53</i>	26
(iii) <i>Enhancer of zest homolog 2 (EZH2)</i>	26
F) Suppresseur de tumeur PTEN et modèles murins de cancers prostatiques	27
(1) PTEN et inhibition de la voie PI3K/AKT	27
(2) Fonctions indépendantes de la voie PI3K/AKT	29
(3) Modèles de cancers prostatiques basés sur l'invalidation de PTEN	29
(a) Modèle PB-Cre4 x Pten ^{loxp/loxp}	30

(b) Autres modèles d'invalidation conditionnelle de PTEN.....	31
II) DISSÉMINATION MÉTASTATIQUE DU CANCER DE LA PROSTATE.....	32
1) Processus biologiques impliqués dans l'échappement tumoral	32
A) Adhésion cellule-cellule	33
B) Remodelage matriciel	35
C) Migration cellulaire	36
D) Modulation de l'immuno-surveillance	37
E) Intravasation endothéliale et mécanismes pro-angiogéniques	38
F) Colonisation des sites secondaires et mécanismes de chimiotactisme.....	39
2) Transition épithélio-mésenchymateuse et dissémination du cancer prostatique 41	41
A) Généralités.....	41
B) Bases moléculaires de l'EMT	41
C) Rôle de l'EMT dans la dissémination du cancer de la prostate.....	42
D) Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'EMT	43
(1) Voie du TGFβ	44
(2) Autres voies de signalisation	45
(a) Voie du FGF.....	45
(b) Voie de l'IGF1	45
(c) Voie de l'EGF	45
(d) Voie PI3K-AKT/RAS/MAPK	46
3) Métastases prostatiques et tropisme osseux.....	46
A) Physiopathologie des métastases osseuses	46
B) Carcinogenèse prostatique et chémo-attraction osseuse.....	47
C) Régulation de l'homéostasie osseuse par la cellule tumorale prostatique.....	48
(1) Régulation de l'activité ostéoblastique	48
(2) Régulation de l'activité ostéoclastique	49
4) Développement du cancer résistant à la castration (CRPC)	51
A) Résistance à la castration et activité de la signalisation androgénique	51
B) Mécanismes de l'activation constitutive de AR au sein du CRPC.....	52
C) CRPC et potentiel métastatique.....	54
III) RÉGULATION DU CHOLESTÉROL ET CANCER DE LA PROSTATE	56
1) Métabolisme du cholestérol.....	56
A) Cholestérol d'origine alimentaire	56
B) Synthèse <i>de novo</i> du cholestérol.....	57
C) Transport inverse et élimination du cholestérol.....	57
2) Rôles biologiques fondamentaux du cholestérol.....	59
3) Cholestérol et agressivité tumorale.....	59
A) Préambule	59
B) Liens moléculaires entre le cholestérol et le cancer	60
(1) Cholestérol, radeaux lipidiques et cancer	60
(2) Cholestérol et promotion de la voie androgénique	61
(3) Cholestérol et promotion de la voie Hedgehog.....	62
C) Mécanismes d'enrichissement du cholestérol en contexte tumoral.....	63
4) Régulation de l'homéostasie du cholestérol : LXR et SREBP2	65
A) La voie SREBP2.....	65
(1) Généralités : la famille des SREBPs	65
(2) Mécanisme d'action de SREBP2	65
(3) SREBP2 et carcinogenèse prostatique	66

B) Les LXRs	67
(1) Généralités	67
(2) Structure et mécanisme d'action des LXRs	67
(3) Ligands des LXRs	69
(a) Ligands agonistes d'origine naturelle (les oxystérols)	69
(b) Ligands agonistes d'origine synthétique	69
(c) Ligands antagonistes	70
(d) Régulation indépendante du ligand	71
i) <i>Phosphorylation des LXRs</i>	71
ii) <i>Sumoylation des LXRs</i>	71
iii) <i>Désacétylation des LXRs</i>	72
(4) Fonctions physiologiques régulées par les LXRs	72
(a) Le métabolisme du cholestérol	73
i) <i>LXRs et synthèse de novo du cholestérol</i>	73
ii) <i>LXRs et absorption intestinale du cholestérol</i>	73
iii) <i>LXRs et captage du cholestérol</i>	74
iv) <i>LXRs et transport inverse du cholestérol</i>	74
v) <i>LXRs et excrétion du cholestérol hépatique</i>	76
(b) Autres fonctions physiologiques des LXRs	76
i) <i>Métabolisme des acides gras et métabolisme glucidique</i>	76
ii) <i>L'immunité</i>	78
(5) LXRs et progression tumorale	78
(a) LXRs et inhibition du cycle cellulaire	78
(b) LXRs et régulation des gènes métaboliques	80
(c) LXRs, immunité tumorale et micro-environnement	81
(d) LXRs et régulation des signalisations hormonales	83
(e) LXRs, différenciation cellulaire et potentiel invasif tumoral	84
 <u>PROJET DE RECHERCHE</u>	86
 <u>RÉSULTATS</u>	91
ARTICLE 1	92
ARTICLE 2	95
PROJET COMPLÉMENTAIRE : LXRs ET HOMEOSTASIE OSSEUSE	98
 <u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	102
 <u>ANNEXES</u>	119
 <u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	120

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

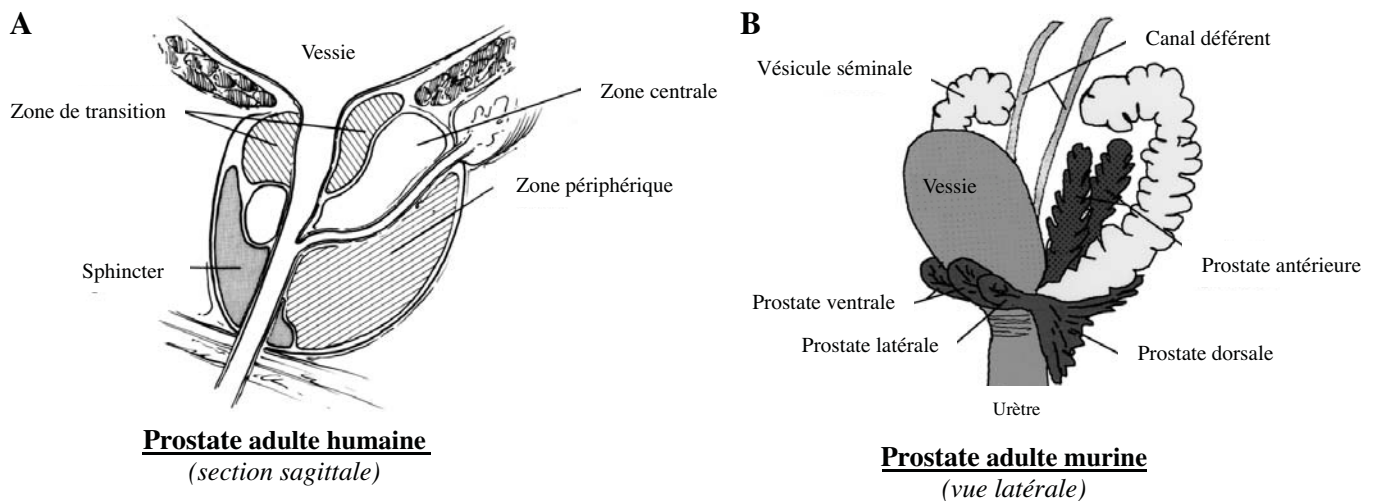


Figure 1 : Anatomie des prostates humaine et murine

La différence principale entre les deux espèces réside dans l'organisation en plusieurs lobes séparés chez la souris. **(A)** Coupe sagittale de prostate humaine. **(B)** Vue latérale de prostate murine. *Modifié d'après Abate-Shen et al., 2000.*

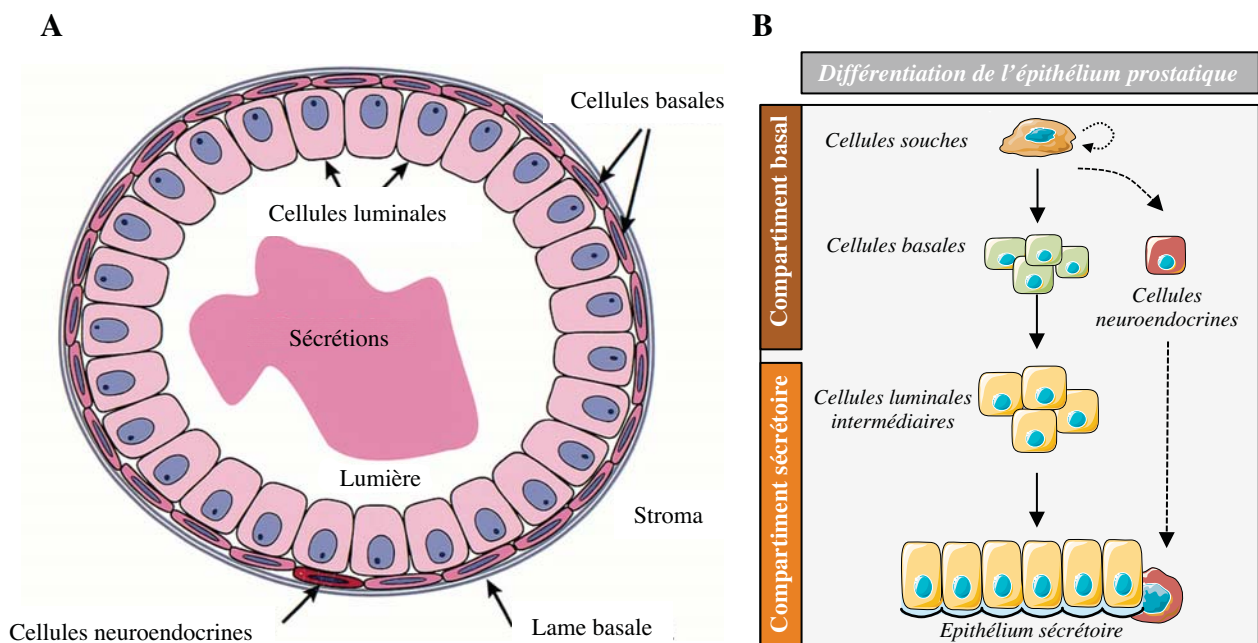


Figure 2 : Histologie et différenciation de l'épithélium prostatique chez la souris

(A) Schéma histologique d'un acinus de la prostate murine. L'organisation est classique d'un tissu glandulaire exocrine : des cellules épithéliales (basales et luminales) qui bordent une lumière et reposent sur une lame basale. Le stroma se situe autour de l'acinus et constitue un tissu de soutien riche en fibroblastes, muscles lisses et vaisseaux sanguins. *Modifié d'après Abate-Shen et al., 2000.* **(B)** Différenciation des cellules épithéliales de la prostate. Les cellules souches sont à l'origine de cellules neuroendocrines et basales. Ces dernières se différencient en cellules intermédiaires ou transitoires luminales, puis luminales sécrétrices. *Réalisé d'après Litvinov et al., 2003.*

D) LA PROSTATE : PHYSIOLOGIE ET CARCINOGENÈSE

1) Physiologie prostatique

A) Structure et fonction de la glande prostatique

La prostate humaine est une glande de l'appareil génital masculin en forme de masse unique encapsulée, entourant l'urètre et située à la base de la vessie. Sa taille augmente avec l'âge pour atteindre le volume d'une noix à la puberté (environ 20 g pour 4 cm de long). Avec les vésicules séminales, la prostate joue un rôle essentiel dans la synthèse et l'émission du liquide spermatique, *via* 30 à 50 glandes tubulo-alvéolaires se déversant dans 15 à 25 canaux excrétoires ouverts sur l'urètre. Sa localisation spécifique au sein du tractus génital lui confère une double fonction urinaire et génitale.

L'organisation anatomique de la prostate a fait l'objet de nombreuses études au cours du siècle dernier. Parmi les différentes descriptions réalisées, le modèle anatomique proposé par McNeal en 1968 est unanimement accepté (Selman, 2011).

Dans la prostate humaine, trois zones sont décrites : la zone centrale, la zone de transition et la zone périphérique. C'est la zone de transition qui constitue la partie glandulaire de la prostate. La zone centrale, située autour de la zone de transition, est d'aspect conique, traversée par les canaux éjaculateurs et composée d'un stroma dense. La zone périphérique est, quant à elle, localisée à la face postérieure de la prostate, proche du rectum, et constitue 80 % du volume de la glande (**Figure 1A**).

Chez les rongeurs tels que le rat et la souris, la prostate comporte quatre lobes anatomiquement distincts situés autour de l'urètre et présents chacun en deux exemplaires : les lobes ventraux, latéraux, dorsaux et antérieurs (**Figure 1B**). Malgré ces différences anatomiques, les prostates humaines et murines sont très proches d'un point de vue histologique et fonctionnel (Abate-Shen and Shen, 2000).

Ainsi, un stroma fibro-musculaire composé de collagène (permettant la contraction de la glande), de vaisseaux sanguins et de nerfs entoure la partie glandulaire de la prostate. Celle-ci est constituée d'un ensemble de lobules exocrines, les acini, dont les sécrétions sont drainées vers l'urètre par de multiples canaux. L'épithélium prostatique humain composant les acini est structuré par trois types cellules : des cellules basales relativement indifférenciées, de rares cellules neuroendocrines et des cellules intermédiaires lumbinales composant la majeure partie de l'organe et assurant la production des sécrétions prostatiques nécessaires à la protection des spermatozoïdes (Litvinov et al., 2003) (**Figure 2A-B**).

Fonctionnellement lors de l'éjaculation, le tissu musculaire entourant la prostate ainsi que la partie fibro-musculaire de la glande se contractent, provoquant l'expulsion du liquide

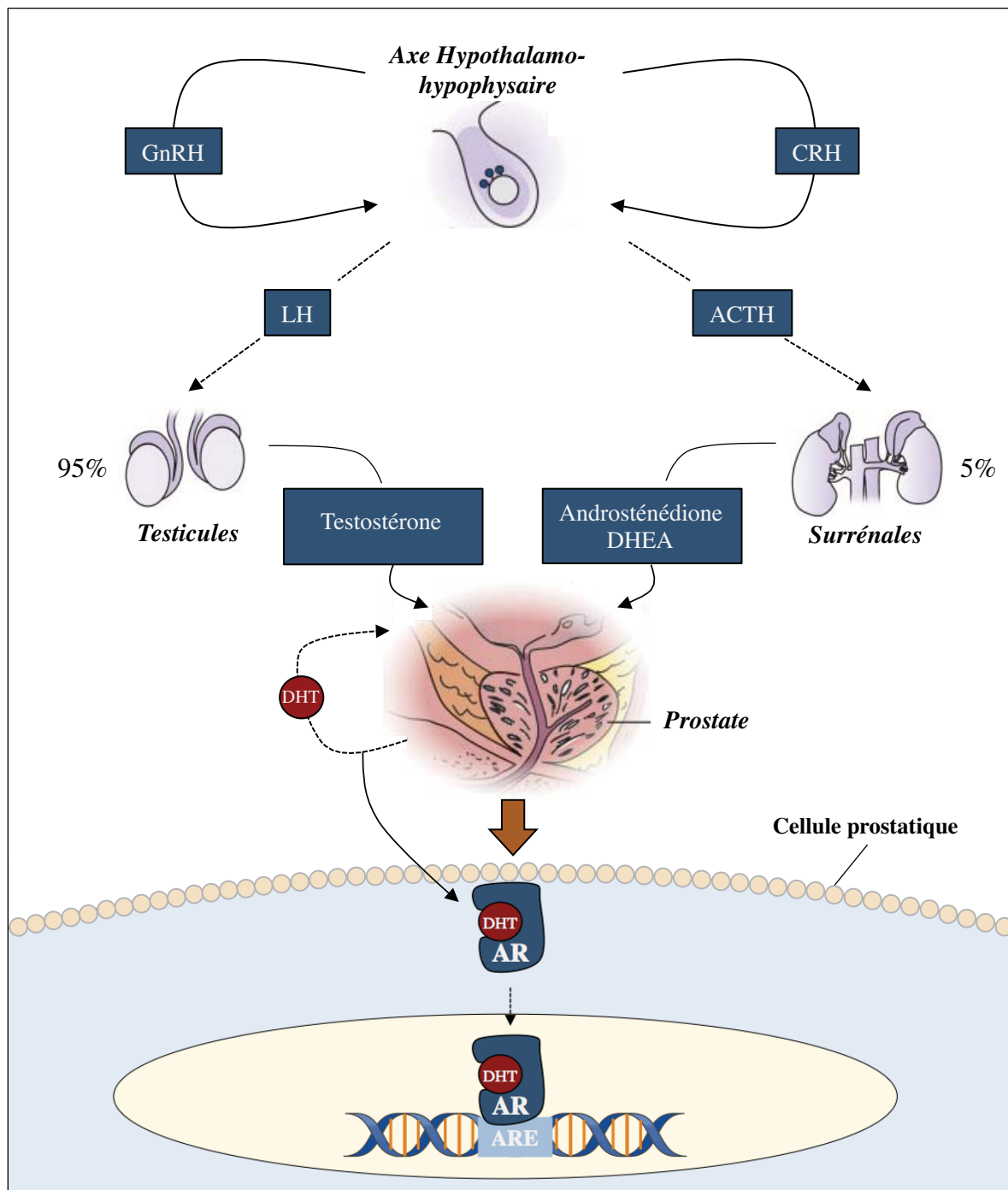


Figure 3 : Production des androgènes chez l'homme

La testostérone représente le principal androgène circulant. Elle est produite de façon quasi-exclusive (plus de 95%) par les cellules de Leydig du testicule. La sécrétion globale de testostérone est de 5 à 7,5 mg/24h chez l'homme adulte normal. La testostérone est finalement convertie en métabolite actif dans la prostate, la DHT (*Dihydrotestosterone*), par la 5 α -réductase. Des androgènes sont également synthétisés en faibles quantités par la surrénale sous la forme d'un précurseur inactif de la DHT, la DHEA. *Modifié d'après Chen et al., 2009.*

prostatique produit par les cellules luminales dans le canal urétral, où il entre en contact avec les spermatozoïdes et le liquide séminal : il constitue environ 30 % du volume du sperme et est composé d'acide citrique (essentiel au métabolisme énergétique de la cellule), de fibrinolysine (enzyme liquéfiant le sperme) et de phosphatases acides. Le fluide prostatique joue un rôle protecteur envers les spermatozoïdes, favorisant leur survie, leur pouvoir fécondant et leur résistance face aux pathogènes.

B) Implication des androgènes dans la physiologie de la prostate adulte

Le récepteur des androgènes est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires et appartient à la sous-famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes. La liaison de AR (*Androgen receptor*) avec ses ligands de type DHT (*Dihydrotestosterone*) et testostérone initie le développement sexuel et la différenciation des voies génitales masculines (Shannon and Cunha, 1983; Timms, 2008). Chez l'adulte, la quasi-totalité de la testostérone circulante est synthétisée par les cellules de Leydig testiculaires. Elle est transportée dans le sang principalement sous forme liée (dont 40% à l'albumine) pour rejoindre les organes cibles. Dans les cellules prostatiques, 90 % de la testostérone est convertie en DHT par la 5 α -réductase. Même si la testostérone est également capable de lier le récepteur des androgènes, l'affinité de la DHT est cinq fois supérieure (Galbraith and Duchesne, 1997). Les testicules ne représentent pas le seul lieu de synthèse des stéroïdes. En effet, la glande surrénale est capable de sécréter de la DHEA (un précurseur inactif de la DHT). Les complexes enzymatiques impliqués dans la transformation de ces précurseurs en formes actives sont présents dans le compartiment stromal prostatique (Galbraith and Duchesne, 1997) (**Figure 3**).

Différentes études illustrent clairement l'implication du récepteur des androgènes dans l'homéostasie et la physiologie de la glande prostatique. Ainsi, la réduction des niveaux intraprostatiques de DHT par castration chez le rat entraîne une perte massive des cellules épithéliales assurant l'activité de sécrétion, suite à une vague d'apoptose (English et al., 1989). Cependant, l'épithélium basal et les cellules stromales restent peu affectés par le protocole. En effet, les cellules épithéliales luminales expriment fortement AR, tandis que la majorité des cellules basales sont négatives pour le récepteur (Prins et al., 1991). Cette information apporte une explication quant à la différence de sensibilité vis-à-vis de la signalisation androgénique. Néanmoins, AR est présent dans le compartiment stromal, même si la castration entraîne une perte de l'expression de ce dernier (Prins et al., 1991; Prins and Birch, 1993). Le stroma prostatique présente en fait la capacité de répondre aux androgènes, même si ces derniers ne sont pas requis pour sa survie. La castration induit également une

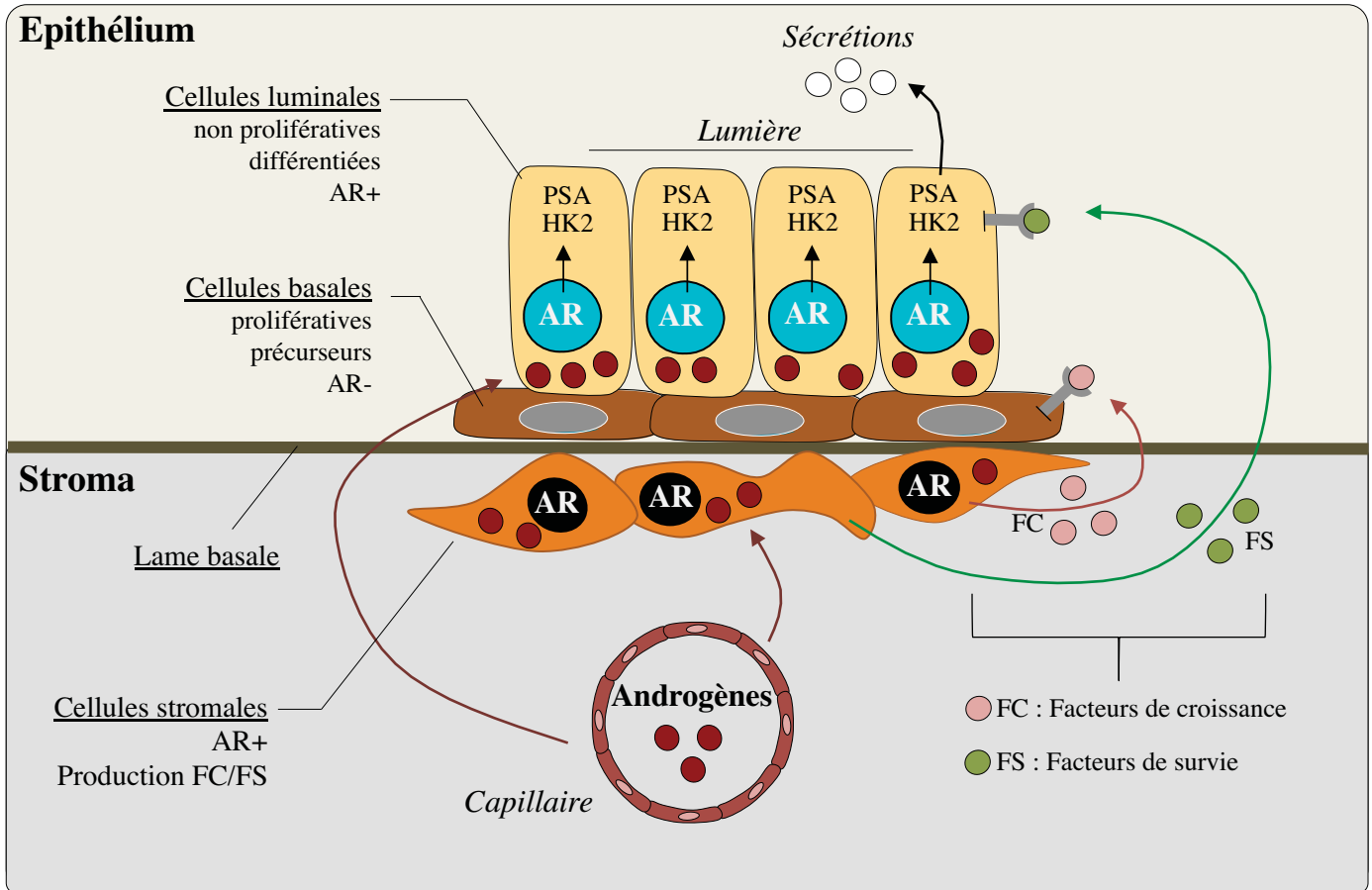


Figure 4 : Action des androgènes sur la survie, la différenciation et l'activité de sécrétion des cellules prostatiques

Dans la prostate, l'action paracrine des androgènes en provenance du testicule régule différents types cellulaires. Dans les cellules stromales (AR+), les androgènes activent l'expression et la sécrétion de facteurs de survie (FS) et de facteurs de croissance (FC) favorisant respectivement le maintien de la population épithéliale luminaire (AR+) et la prolifération et différenciation des cellules épithéliales basales (AR-). De plus, ils permettent aux cellules luminales de garantir leur fonction de sécrétion *via* une action transcriptionnelle directe au sein de ces dernières. *D'après Isaacs et al., 2004.*

dégénérescence des capillaires sanguins et une constriction des vaisseaux, et ceci en amont des événements d'apoptose qui affectent l'épithélium sécrétoire. Cette observation suggère que l'altération de la circulation sanguine pourrait contribuer à l'apoptose épithéliale (Franck-Lissbrant et al., 1998). L'administration de testostérone à des rats castrés entraîne alors une reprise de la croissance du réseau vasculaire, suivie d'une reconstitution de l'épithélium sécrétoire (Franck-Lissbrant et al., 1998).

Dans la prostate normale, l'homéostasie cellulaire est modifiée par différents types de facteurs paracrines réalisant la connexion entre les cellules épithéliales et les cellules stromales. Le compartiment stromal prostatique sécrète, en réponse aux androgènes, des facteurs de croissance de type EGF (*Epidermal Growth Factor*) et FGF (*Fibroblast growth factor*), promouvant la prolifération et la différenciation de cellules souches et intermédiaires, progéniteurs des cellules luminales (Chung, 1995) (**Figure 4**). L'homéostasie de la glande prostatique est donc la résultante d'un équilibre entre prolifération cellulaire et apoptose. Même s'ils ne jouent pas un rôle exclusif dans la prostate, les androgènes, à travers la liaison et l'activation de leur récepteur, assurent un rôle majeur dans cet équilibre, mais garantissent surtout la fonction sécrétoire de l'organe.

2) Le cancer de la prostate

Le risque pour un homme d'avoir un cancer de la prostate diagnostiqué a fortement augmenté au cours du temps, le plaçant en 2^{ème} place des causes de décès par cancer en France (Belot et al., 2008) (**Figure 5**). A l'inverse de l'incidence, l'évolution de la mortalité par cohorte de naissance montre une diminution du risque de décès pour les cohortes les plus jeunes. Ainsi, le risque de décéder d'un cancer de la prostate avant 75 ans est estimé à 1,3% pour un homme né en 1910. Ce risque est de 0,7% pour un homme né en 1940, soit une diminution de près de 50% (*Institut national du cancer*). Le cancer localisé est généralement curable. Cependant, l'invasion au-delà de la capsule prostatique et les métastases sont associées à un mauvais pronostic et une mortalité élevée.

A) Prédispositions et facteurs de risques

L'initiation et la progression de la maladie sont complexes mais différentes études ont pu mettre en avant des composantes liées aux facteurs génétiques héréditaires, à l'âge, à l'environnement et au mode de vie (**Figure 6**).

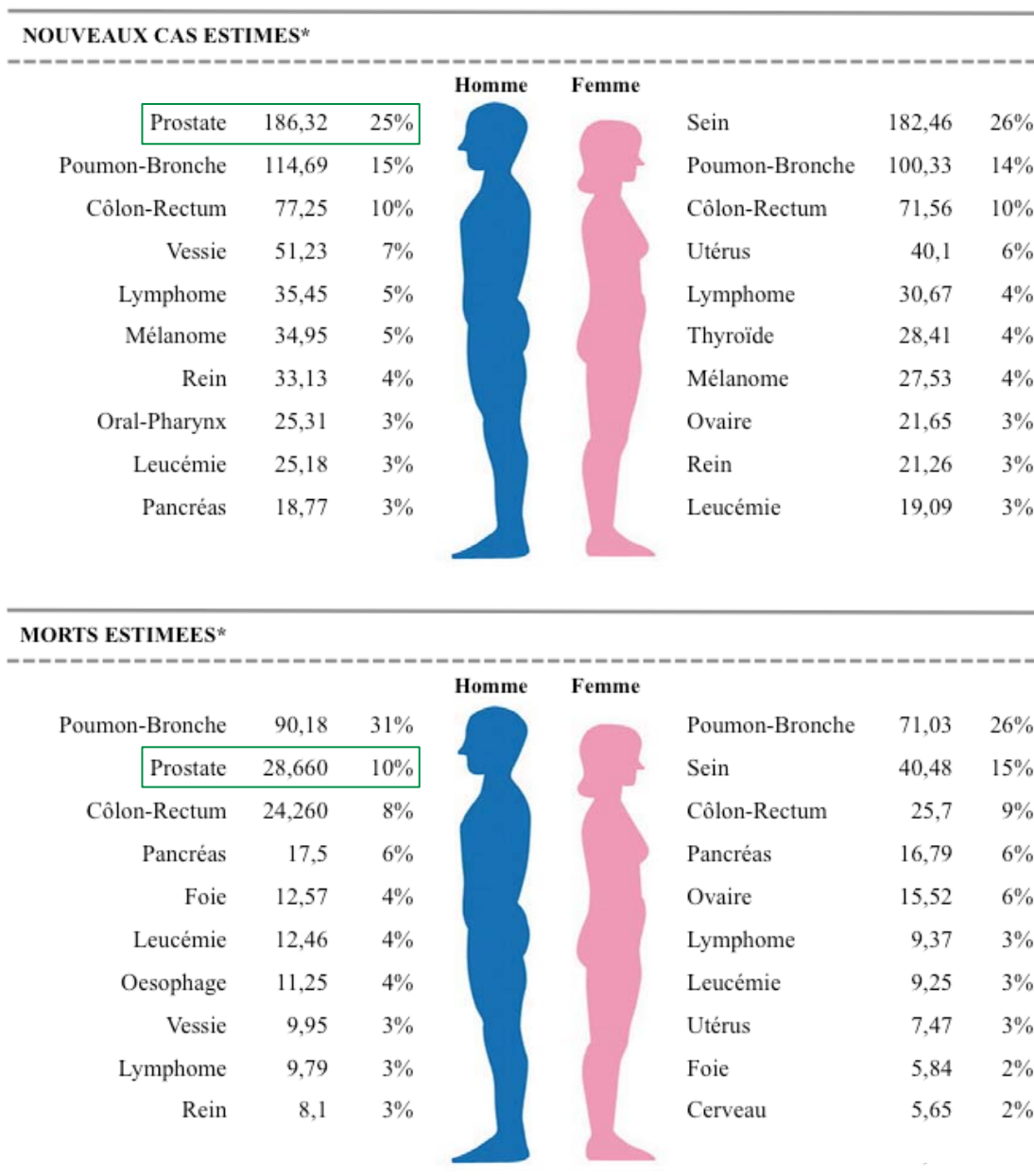


Figure 5 : Données épidémiologiques disponibles pour toutes les formes de cancer

Ce tableau indique que le cancer de la prostate est le plus diagnostiqué et représente la seconde cause de mortalité parmi les cancers chez l'homme. * Les nouveaux cas et les décès sont estimés pour 100 000 individus. *Données issues de Jemal et al., 2008.*

(1) Les antécédents familiaux

Même si le cancer de la prostate est principalement sporadique, sa transmission héréditaire est retrouvée dans 5% des cas. La prédisposition génétique ne représente donc pas un nombre important de cancers, mais plutôt ceux qui surviennent à un jeune âge : 43% des cancers diagnostiqués pour cause génétique le sont à l'âge de 55 ans (Bratt, 2002). La prédisposition génétique à développer un cancer de la prostate a été décrite pour la première fois en 1956, mais ce n'est qu'en 1992 que la preuve a été apportée, lors de la première analyse de ségrégation de la maladie dans différentes cohortes familiales (Pakkanen et al., 2007). Par la suite, des études similaires ont effectivement démontré que les hommes ayant un parent du 1^{er} degré atteint présentaient une augmentation de 2 à 3,5 fois du risque de développer la maladie (Whittemore et al., 1995) ; le risque relatif est même 3 à 5 fois plus élevé si le diagnostic a été réalisé chez le parent du 1^{er} degré avant ses 65 ans (Lesko et al., 1996).

La recherche des gènes de susceptibilité au cancer de la prostate a permis de mettre en évidence des altérations retrouvées très fréquemment dans certaines familles :

- Historiquement, le premier locus identifié correspond à HPC1 (*Hereditary prostate cancer locus-1*) dont l'allèle touché est *RNase L* (*Ribonuclease L*) (Smith et al., 1996; Wiklund et al., 2004), favorisant l'apparition précoce du phénotype tumoral et des métastases (Simard et al., 2003).

- Des polymorphismes du gène *ElaC2* (*Ela C homolog*) codant une hydroxylase et des délétions dans les gènes *RNase L* et *MSR1* (*Macrophage Scavenger Receptor 1*), codant des acteurs impliqués dans la réponse aux infections, sont également associés au risque héréditaire de la maladie (Rennert et al., 2002; Xu et al., 2002).

- Des acteurs régulant le cycle cellulaire tels que CHEK2 (*Checkpoint Kinase 2*) et NSB1 (*Nijmegen breakage syndrome gene 1*) sont également inclus dans les gènes de susceptibilité héritée pour le cancer de la prostate (Cybulski et al., 2004a, 2004b).

- Des mutations germinales de BRCA1 et BRCA2 (*Breast cancer 1/2*), acteurs fortement impliqués dans le cancer du sein, augmentent le risque précoce de développer la maladie (5 % des cas chez les hommes de moins de 55 ans) (Edwards and Eeles, 2004).

- Enfin, plusieurs études ont montré un polymorphisme de gènes codant AR, la 5 α -réductase de type II et la stéroïde hydroxylase CYP3A41B stimulant le métabolisme des androgènes (Kopper and Tímár, 2005) .

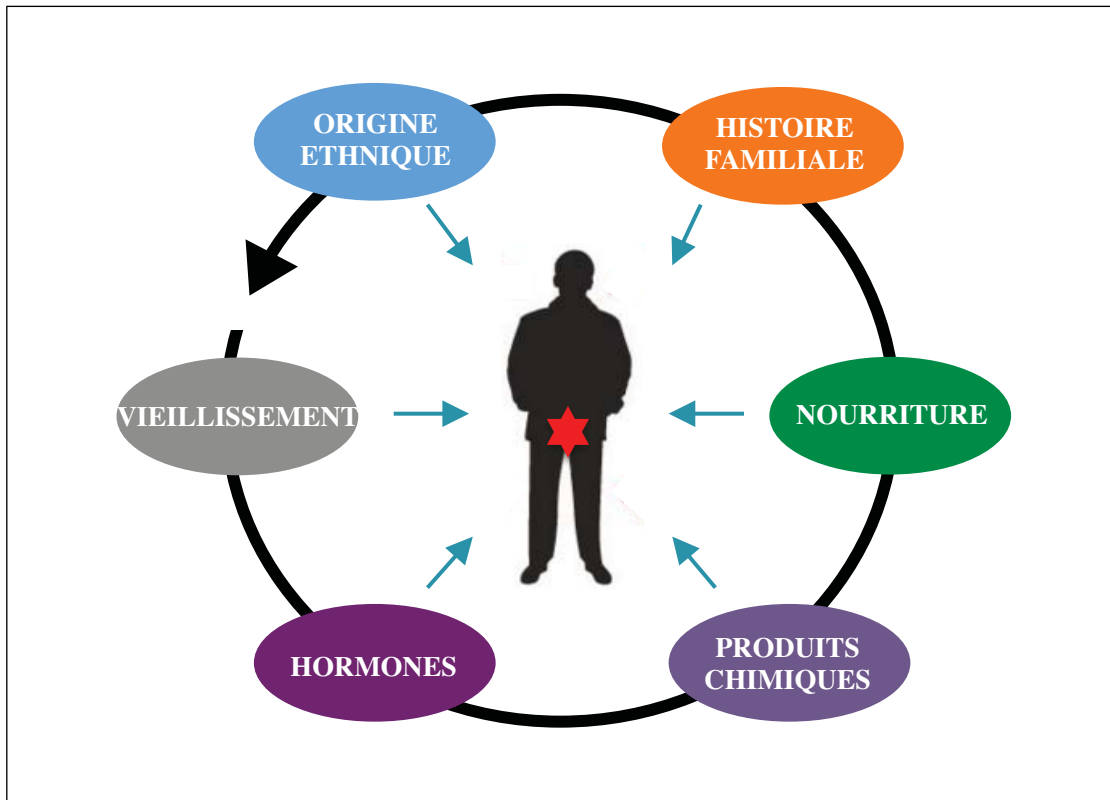


Figure 6 : Facteurs de risque et développement de la carcinogenèse prostatique

Le cancer de la prostate peut être développé chez l'homme jeune mais le risque augmente avec l'âge, avec plus de 70 % des maladies détectées après l'âge de 65 ans. Certaines origines ethniques prédisposent au risque de développer ce cancer, en particulier chez les populations sub-sahariennes. La maladie peut également présenter un caractère héréditaire, puisque le fils d'un homme ayant développé la maladie présente deux fois plus de risque de la développer lui-même. La place croissante de l'alimentation dans l'étiologie du cancer de la prostate est démontrée, notamment l'implication des viandes rouges et des acides gras saturés. Enfin, les hormones et les produits chimiques tels que les perturbateurs chimiques et/ou endocriniens sont associés à l'augmentation de l'incidence de la maladie.

Il est à noter que l'appartenance ethnique peut moduler le risque de développer le cancer de la prostate, avec une augmentation de l'incidence dans les populations de l'Afrique subsaharienne (275,3 pour 100 000) en comparaison de la moyenne mondiale (97,7 pour 100 000) (Haas et al., 2008). Ceci est également valable dans la population Afro-Américaine en comparaison de la population Caucasienne malgré un mode de vie et une alimentation similaires (DeSantis et al., 2016), et est moléculairement corrélé à la présence d'un variant génétique de type microsatellite associé avec le cancer sur le chromosome 8q24 (Robbins et al., 2007). *A contrario*, le risque de cancer est plus faible chez les hommes d'origine asiatique (Chen et al., 2014). Ces données reflètent donc des différences génétiques sans pour autant exclure les différences d'ordre socio-économique qui existent entre les populations telles que l'environnement, les moyens de diagnostic, ainsi que l'âge (**Figure 7**).

(2) Âge

L'un des facteurs de risque les plus importants dans le développement du cancer de la prostate est l'âge. En effet, ce risque augmente significativement après 50 ans chez les hommes sans prédisposition génétique : 0,5 % des cas incidents avant 50 ans contre 1,2 % entre 75 et 79 ans. L'âge moyen de diagnostic se situe autour de 71 ans, avec deux tiers des patients diagnostiqués à partir de 65 ans et plus (Haute Autorité de Santé, 2012). Cependant, des analyses *post-mortem* indiquent qu'une majorité d'hommes de plus de 85 ans développerait un cancer de la prostate (Haas et al., 2008). Parmi les hypothèses expliquant l'importance du vieillissement dans la mise en place de la maladie, il a été suggéré qu'une diminution des taux d'androgènes avec l'âge pourrait entraîner des dérégulations moléculaires au niveau des cellules épithéliales (Algarté-Génin et al., 2004). De plus, une augmentation des cassures de l'ADN causée par le stress oxydant prédisposerait à l'apparition de mutations (Bostwick et al., 2004a).

(3) Mode de vie

Des travaux conduits sur les populations immigrantes indiquent que des facteurs exogènes peuvent être impliqués dans le risque de développer le cancer de la prostate. Ainsi, l'incidence de la maladie pour une même population ethnique est-elle modulée lors des déplacements dans des zones géographiques caractérisées par une alimentation ou un environnement différent (Winter et al., 1999) (**Figure 8**).

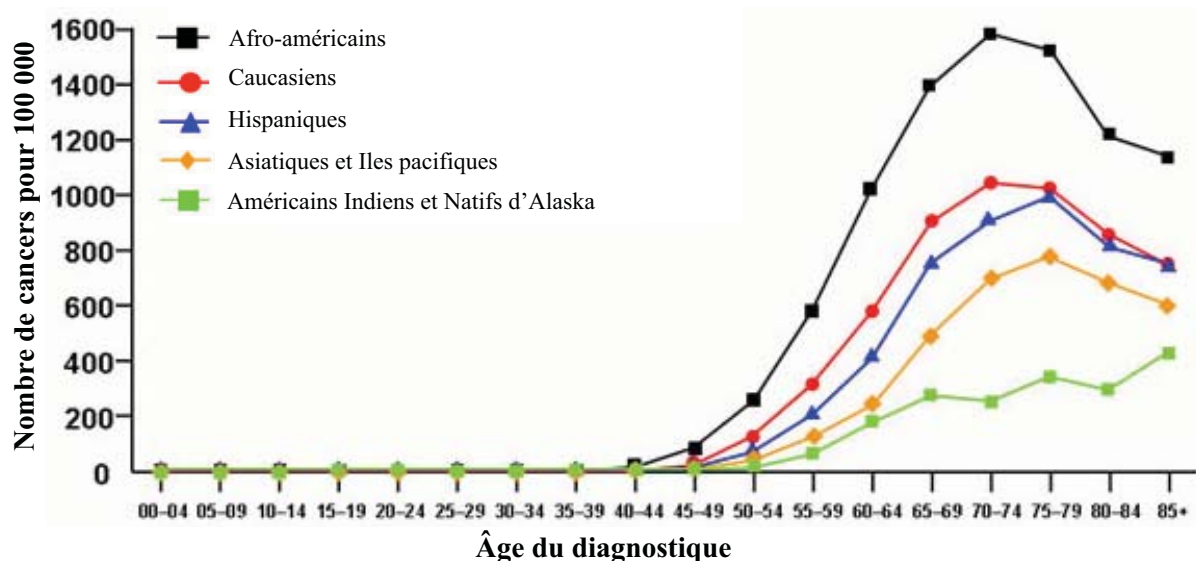


Figure 7 : Risque de cancer de la prostate selon le groupe ethnique aux États-Unis

Les raisons expliquant la forte incidence et la mortalité associée au cancer de la prostate chez les américains d'origine africaine restent encore partiellement inexpliquées. Les facteurs de risque peuvent notamment inclure l'accès aux soins, la socio-économie, l'éducation ou encore le régime alimentaire et les facteurs génétiques. *Extrait de Medscape, 2010.*

Pays	Ville native	Incidence	Immigrants	Incidence
Japon	Hiroshima	10,9	U.S.: San Francisco, Los Angeles, Hawaii	43,1
	Miyagi	9		47,2
	Nagasaki	9,1		64,2
Chine	Qidong	0,5	U.S.: San Francisco, Los Angeles, Hawaii	26
	Shanghai	2,3		20,2
	Tianjin	1,9		62,9
Corée	Kangwha	0,9	U.S.: Los Angeles	10,9
Philippines	Manille	17,6	U.S.: Los Angeles, Hawaii	46,1

Figure 8 : Comparaison de l'incidence du cancer de la prostate entre des américains natifs et immigrants

Les données ont été extraites de l'étude « *Cancer Incidence in Five Continents* » vol. 7, 1997. Elles sont exprimées en ratio moyen standardisé par l'âge et pour 100 000 personnes par an.

(a) Alimentation

Différentes études épidémiologiques indiquent que le régime alimentaire peut modifier l'incidence du cancer de la prostate. En effet, l'alimentation riche en lipides des pays occidentaux (*Western-Diet*) représente un facteur déclencheur. L'incidence du cancer de la prostate est en effet 6 fois plus grande dans ces pays, où les quantités d'acides gras, de cholestérol, de protéines et de vitamines ingérées sont plus importantes (Watanabe et al., 2000).

Bien que les études animales visant à moduler la prise alimentaire en acides gras aient clairement mise en évidence un lien avec le développement et la progression tumorale (Llaverias et al., 2010), les données obtenues chez l'homme sont moins étayées, mais indiquent tout de même une association de la maladie avec certaines espèces d'acides gras. Une étude menée sur 41 514 personnes indique que l'augmentation des taux plasmatiques en acides gras saturés est par exemple corrélée à une augmentation des risques de cancer de la prostate (Bassett et al., 2013). Concernant les données récoltées sur les acides gras insaturés (PUFA, *Polyunsaturated fatty acids*), les résultats sont plus complexes. Parmi les différentes classes d'acides gras insaturés essentiels, on retrouve notamment les oméga-3 et les oméga-6 (selon l'emplacement de leur branchement méthylène), qui n'ont pas le même impact sur la progression de la carcinogenèse prostatique. Les oméga-3, contenus par exemple dans le poisson, sont associés à un ralentissement de la progression tumorale par différents mécanismes (Chavarro et al., 2008). Une étude réalisée sur une cohorte de patients atteints du cancer de la prostate indique une association entre un niveau élevé d'oméga-3 et une diminution de la carcinogenèse associée à un ralentissement de l'angiogenèse et de ses effecteurs, tels que VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), COX-2 (*Cyclooxygenase-2*), ou PGE2 (*Prostaglandin E2*) : cette corrélation est finalement caractérisée par une diminution de la mortalité (Spencer et al., 2009). De plus, un test randomisé de phase II a montré qu'un régime pauvre en lipides supplémenté d'oméga-3 quelques semaines avant une prostatectomie radicale était capable de diminuer la prolifération des cellules tumorales (Aronson et al., 2011). Les oméga-6, principalement dérivés de l'huile de maïs, sont quant à eux corrélés à un cancer de haut grade (Crowe et al., 2008). Le mécanisme suggéré serait alors dépendant de leur conversion en eicosanoïdes, tels que la Prostaglandine E-2, impliqués dans l'inflammation et la croissance cellulaire.

Le cholestérol est retrouvé dans les produits d'origine animale comme les fromages, le jaune d'œuf, les viandes bovine et porcine, mais peut également être synthétisé *de novo*. Le lien entre cholestérol et cancer de la prostate sera abordé plus précisément dans le chapitre III,

mais de plus en plus d'arguments bibliographiques suggèrent son implication dans l'agressivité tumorale.

Deux grandes études cliniques menées récemment, le CARET (*Carotene and Retinol Efficacy Trial*) et le NIH-AARP (*National Institutes of Health-American Association of Retired Persons*), indiquent également qu'un excès en vitamines, notamment la vitamine E, les β -carotènes et le rétinol, est associé à un risque plus élevé de développer un cancer de la prostate (Lawson et al., 2007; Neuhouwer et al., 2009; Hamilton and Parsons, 2016). De plus, des évidences pré-cliniques montrent qu'une supplémentation en acide folique est capable d'accélérer la croissance tumorale prostatique (Wien et al., 2012). A l'inverse, un modèle murin de carcinogenèse prostatique carencé en acide folique développe un phénotype tumoral moins rapidement (Bistulfi et al., 2011).

L'impact d'une consommation importante de protéines sur l'évolution du cancer reste discutable. En effet, malgré la popularité des régimes hyperprotéinés pauvres en carbohydrates, des études récentes menées chez l'homme indiquent qu'un faible niveau de protéines est associé à un risque plus faible de développer un cancer chez des hommes de 65 ans ou moins (Levine et al., 2014). Des études suggèrent qu'un lien moléculaire peut être attribué à l'IGF1 (*Insuline-like growth-factor 1*), dont l'augmentation du taux circulant est associée à un risque accru de développer différentes tumeurs, dont l'adénocarcinome prostatique (Renehan et al., 2004).

Enfin, la consommation de viande rouge a été classée en octobre 2015 par le CIRC comme cancérigène pour l'homme. Les données les plus solides, quoique demeurant limitées, montrent une association entre sa consommation et le cancer colorectal (Aykan, 2015). Le même type d'études souligne également des liens avec le cancer de la prostate (John et al., 2011; Rohrmann et al., 2015).

Ainsi, la nature de la prise alimentaire peut-elle constituer un paramètre critique orientant le développement de la maladie.

(b) Environnement

La mise en cause d'agents environnementaux dans l'augmentation du risque de cancer est de plus en plus illustrée. L'identification des molécules carcinogènes, quant à elle, reste complexe car elle nécessite de tenir compte du produit, de la dose utilisée et du temps d'exposition. Néanmoins, la mise en présence de certains pesticides tels que le bromure de méthyl (alkylant), le dithiothréitol (DTT) ou l'heptachlore, est associée à une augmentation de ce risque (Alavanja et al., 2003). Le même effet délétère est observé pour les perturbateurs

endocriniens ayant des activités oestrogéniques comme le diéthylstilbestrol (DES) (Driscoll and Taylor, 1980). Des expériences réalisées chez des rongeurs exposés au DES montrent le développement d'une dysplasie sévère assimilée à de la néoplasie intra-épithéliale, signant les premières étapes d'un développement tumoral (Prins et al., 2001).

B) Diagnostic et biomarqueurs

Le cancer de la prostate reste asymptomatique jusqu'à des stades avancés où il va notamment se manifester par des troubles urinaires, une hématurie, une impuissance sexuelle et des dysfonctionnements d'organes provoqués par la présence de métastases. La mesure préventive principale recommandée dès 50 ans est le toucher rectal, effectué dès lors tous les ans. Il permet de déceler toute modification de volume et de forme au niveau de la zone périphérique à partir de laquelle le cancer se développe le plus fréquemment. Le cas échéant, une analyse du PSA (*Prostate specific antigen*) est réalisée (Haute Autorité de Santé, 2012), même si la fiabilité de ce marqueur est de plus en plus controversée. Le PSA est une glycoprotéine androgéno-régulée à activité sérine-protéase qui est impliquée, une fois dans la lumière des acini prostatiques, dans la mobilité des spermatozoïdes (Elzanaty et al., 2002). Une valeur supérieure à 4ng/mL est généralement considérée comme anormale. Mesuré à un âge précoce, le PSA permet de déterminer les personnes risquant de développer un cancer de la prostate (Lilja et al., 2007). Cependant, ce taux peut être modifié dans des conditions non pathologiques et ne permet pas de différencier les formes indolentes et agressives de la maladie (Thompson et al., 2004). Seule une analyse histopathologique et cytologique des glandes après une biopsie transrectale permet d'établir avec certitude la présence ou non d'un cancer de la prostate. Parmi les différents marqueurs histologiques utilisés, on retrouve l'*α-Methylacyl Coenzyme A Racemase* (AMACR), une enzyme mitochondriale surexprimée dans le cancer de la prostate (Xu et al., 2000; Sreekumar et al., 2004). Son analyse est souvent couplée au marquage de la protéine p63, permettant de détecter les cellules basales : le marquage p63 va ainsi être perdu dans les échantillons tumoraux (Molinié et al., 2005). Le diagnostic de la maladie peut être appuyé par l'utilisation de biomarqueurs urinaires, via la détection d'ARN fortement exprimés par les cellules tumorales tels que *PCA3* (*Prostate Cancer Antigen 3*), dont l'accumulation est observée dans 94,6 % des échantillons de cancer de la prostate, un taux 66 fois supérieur à celui des tissus sains (De Kok et al., 2002; Hessels et al., 2003). Une étude récente place ce marqueur comme plus performant, en terme de valeur diagnostique, que le dosage du PSA (Roobol et al., 2010).

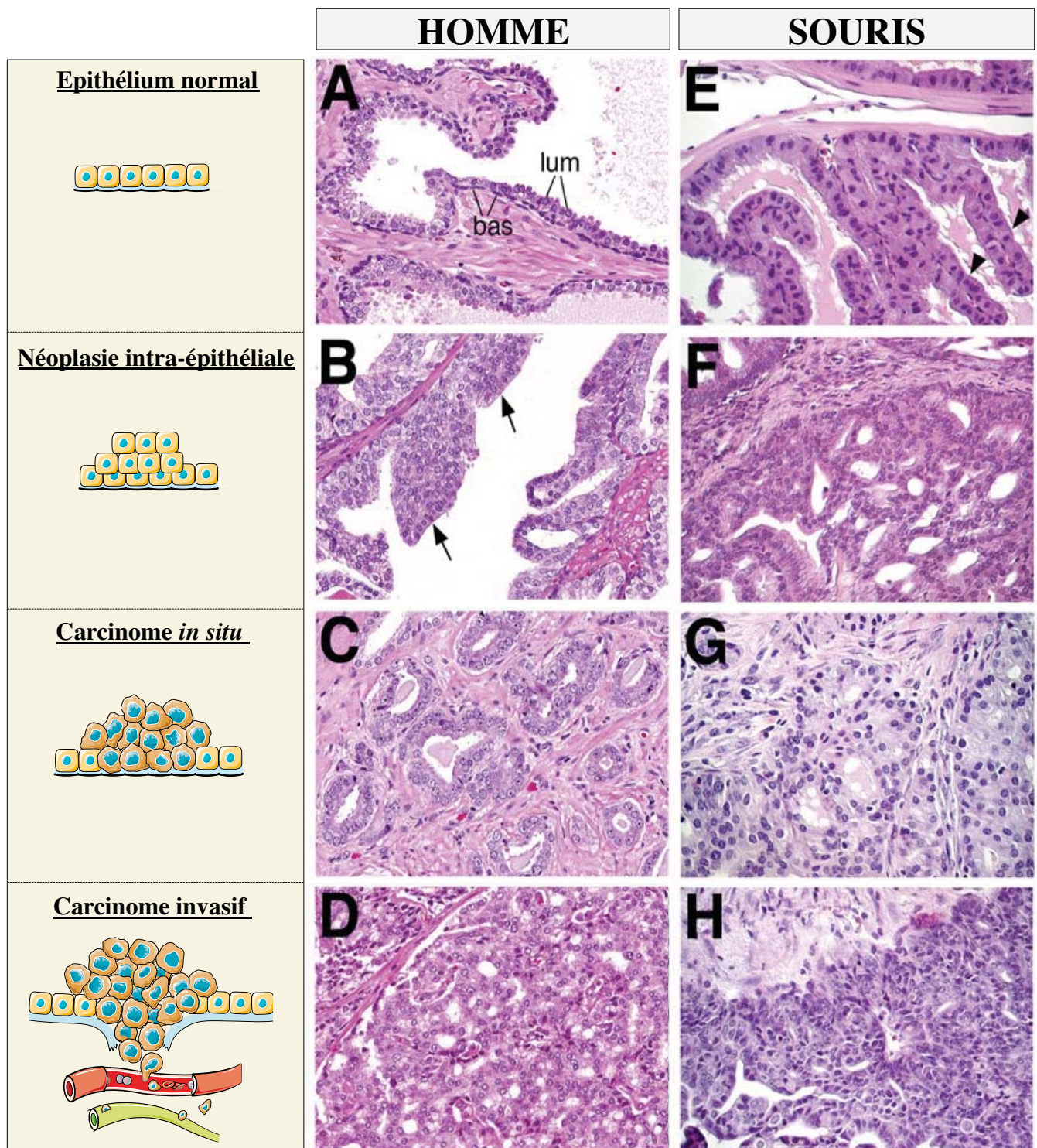


Figure 9 : Description de la progression du cancer de la prostate chez l'homme et la souris

Le cancer de la prostate est initié à partir de l'épithélium et caractérisé par plusieurs stades d'évolution. (B, F) Les cellules épithéliales prolifèrent de façon incontrôlée à l'intérieur du compartiment luminal, entraînant le développement de néoplasies intra-épithéliales (PIN). (C, G) Après un détachement de la lame basale et une dédifférenciation, les cellules proliférantes envahissent le compartiment stromal, caractérisant le stade de carcinome *in situ*. (D, H) Enfin, les cellules tumorales peuvent évoluer vers des stades plus agressifs où elles seront capables de coloniser d'autres tissus pour former des tumeurs secondaires ou des métastases. Lum : *Luminale* ; Bas : *basale*. Modifié d'après Abate-Shen et al., 2000 et Tomlins et al., 2007.

C) Etapes de la carcinogenèse et classification des tumeurs prostatiques

La carcinogenèse prostatique est un processus multi-étapes caractérisé par le développement d'un adénocarcinome majoritairement dans la zone périphérique de la glande (85 % des cas) (**Figure 9**). Elle est ainsi subdivisée en 4 étapes principales : l'atrophie inflammatoire proliférative, la néoplasie intra-épithéliale, le carcinome et la dissémination métastatique.

(1) Atrophie inflammatoire proliférative (PIA)

L'atrophie inflammatoire est caractérisée par une lésion hypertrophique corrélée à une prolifération de l'épithélium glandulaire, une atrophie stromale associée à de l'inflammation, ainsi qu'une fibrose (De Marzo et al., 1999). La localisation de la pathologie à la périphérie de la glande, à l'instar du carcinome, ainsi que les transitions observées vers des stades pré-malins suggèrent une connexion entre la PIA et le cancer. Son implication dans la cinétique de la carcinogenèse prostatique est controversée, du fait d'un manque de liens moléculaires avérés (Tomlins et al., 2007). Cependant, la pathologie est caractérisée par une dérégulation de la balance prolifération/apoptose et des anomalies moléculaires liées au stress oxydant et à la malignité, ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires (mononucléaires et polynucléaires neutrophiles) dans l'épithélium et le stroma. De plus, certaines des signatures moléculaires de la transformation néoplasique sont retrouvées dans cette étape (Joshua et al., 2008).

(2) Néoplasie intra-épithéliale (PIN)

La néoplasie intra-épithéliale correspond à la lésion initiatrice de l'adénocarcinome prostatique. La désorganisation de l'épithélium, ainsi que la présence d'un nucléole important et l'élargissement du noyau au sein de la cellule, rendent facilement identifiable la pathologie. Quatre types d'architectures majeures peuvent être identifiées : en touffe, micropapillaire, cribiforme et plate. Les PIN peuvent être classées en fonction de leurs caractéristiques histologiques et cytologiques en lésions de bas grade (LGPIN : *low grade*) ou de haut grade (HGPIN : *high grade*) (Abate-Shen and Shen, 2000; Bostwick et al., 2004b; Joniau et al., 2005). En plus d'être caractérisés par une similarité cytologique, les PIN et les carcinomes partagent des altérations et marques génétiques communes, suggérant que cette phase représente une transition entre un épithélium bénin et une pathologie maligne et que la plupart des altérations observées au cours de la progression tumorale se mettraient en place à cet instant (Tomlins et al., 2007).

TUMEUR PRIMITIVE	
T	Tx Tumeur primitive ne pouvant pas être classée
	T0 Absence de tumeur primitive
	T1 Tumeur non palpable de découverte fortuite
	<i>T1a</i> Tumeur envahissant moins de 5% du tissu réséqué
	<i>T1b</i> Tumeur envahissant plus de 5% du tissu réséqué
	<i>T1c</i> Tumeurs découvertes sur des biopsies en raison d'un PSA élevé
	T2 Tumeur limitée à la prostate
	<i>T2a</i> Atteinte de moins de 50% d'un lobe
	<i>T2b</i> Atteinte de plus de 50% d'un lobe
	<i>T2c</i> Atteinte des deux lobes
	T3 Tumeur avec extension au-delà de la capsule
	<i>T3a</i> Extension extra-capsulaire uni- ou bi-latérale
	<i>T3b</i> Extension aux vésicules séminales uni- ou bi-latérale
	T4 Tumeur fixée avec extension aux organes adjacents
GANGLIONS REGIONAUX	
N	Nx Ganglions régionaux non évalués
	N0 Absence de métastase ganglionnaire régionale
	N1 Atteinte ganglionnaire régionale
	<i>N1M1</i> Métastase ganglionnaire de moins de 0,2 cm
METASTASES A DISTANCE	
M	Mx Métastases à distance non évaluées
	M0 Absence de métastases à distance
	M1 Métastases à distance
	<i>M1a</i> Atteinte de ganglions non régionaux
	<i>M1b</i> Atteinte osseuse
	<i>M1c</i> Autres sites

Figure 10 : Classification TNM d'après le rapport d'orientation de la Haute Autorité de Santé

Le médecin spécialiste évalue le stade du cancer de la prostate à partir d'une classification internationale, la classification TNM, se basant sur 3 critères : la taille de la tumeur (T), la présence de cellules cancéreuses dans les ganglions (N), la présence de métastases (M).

(3) Carcinome et cancer métastatique

Contrairement aux HGPIN, le carcinome est caractérisé par une rupture de la lame basale délimitant chaque acinus, permettant l'envahissement du compartiment stromal et des tissus adjacents par les cellules tumorales. Il est caractérisé par une prolifération des cellules épithéliales basales et lumenales intense, expliquant une augmentation des sécrétions prostatiques et des marqueurs diagnostiques tels que le PSA, ainsi qu'une hausse des marqueurs d'agressivité (Wittekind et al., 2002). La progression s'oriente alors vers la formation de métastases. En effet, suite à une perte d'adhérence des cellules tumorales entre elles et avec la matrice extra-cellulaire, ces dernières disséminent dans les systèmes sanguins et lymphatiques. Les métastases sont principalement retrouvées au niveau des ganglions lymphatiques, des os et du cerveau (Tantivejkul et al., 2004; Salvati et al., 2005; Zeng et al., 2005).

(4) Classification et évaluation de l'agressivité tumorale

(a) Classification TMN

La classification TMN (*Tumor, Nodes, Metastasis*) est un système international permettant de classer les cancers selon leur expansion anatomique. Les trois lettres symbolisent alors la propagation de la maladie sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N), et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est suivie d'un chiffre correspondant à des critères cliniques permettant de caractériser l'envahissement tumoral (Salomon et al., 2010) (**Figure 10**).

(b) Classification de d'Amico

Ce système de classification a été mis en place pour évaluer le risque de récurrence après un traitement localisé du cancer de la prostate. Les patients sont stratifiés en trois niveaux : un risque faible, intermédiaire et élevé. Ce risque intègre des données cliniques simples telles que la classification TNM, le taux de PSA et la classification histologique (score de Gleason), permettant d'avoir un maximum d'information sur le cancer de la prostate et de choisir le traitement de référence (Hernandez et al., 2007) (**Figure 11**).

(c) Score de Gleason

La classification de Gleason est le système le plus couramment utilisé pour grader l'adénocarcinome prostatique en raison de sa reproductibilité et de sa valeur pronostique efficace. Ce score résulte de la somme des 2 profils histologiques les plus représentés dans la

Groupe	Définitions	Pronostic de rechute à 5 ans
Faible risque	PSA $\leq$ 10ng/ml + Gleason $\leq$ 7 + Stade clinique T1c ou T2a	< 25%
Risque intermédiaire	PSA entre 11 et 20 ng/ml ou Score de Gleason = 7 ou Stade clinique T2b	25-50%
Risque élevé	PSA > 20ng/ml ou Score de Gleason > 7 ou Stade clinique T2c	> 50%

Figure 11 : Evaluation de l'agressivité du cancer de la prostate selon la classification de D'Amico

La classification de D'Amico est basée sur l'évaluation de 3 critères : le stade TNM, le score de Gleason mesurant l'agressivité des cellules cancéreuses, et la valeur du PSA. Cette classification permet d'établir 3 sous-groupes de cancers de la prostate localisés selon le risque de rechute, c'est-à-dire 3 niveaux de risque de progression du cancer : un risque faible, un risque intermédiaire et un risque élevé. *D'après Hernandez et al., 2007.*

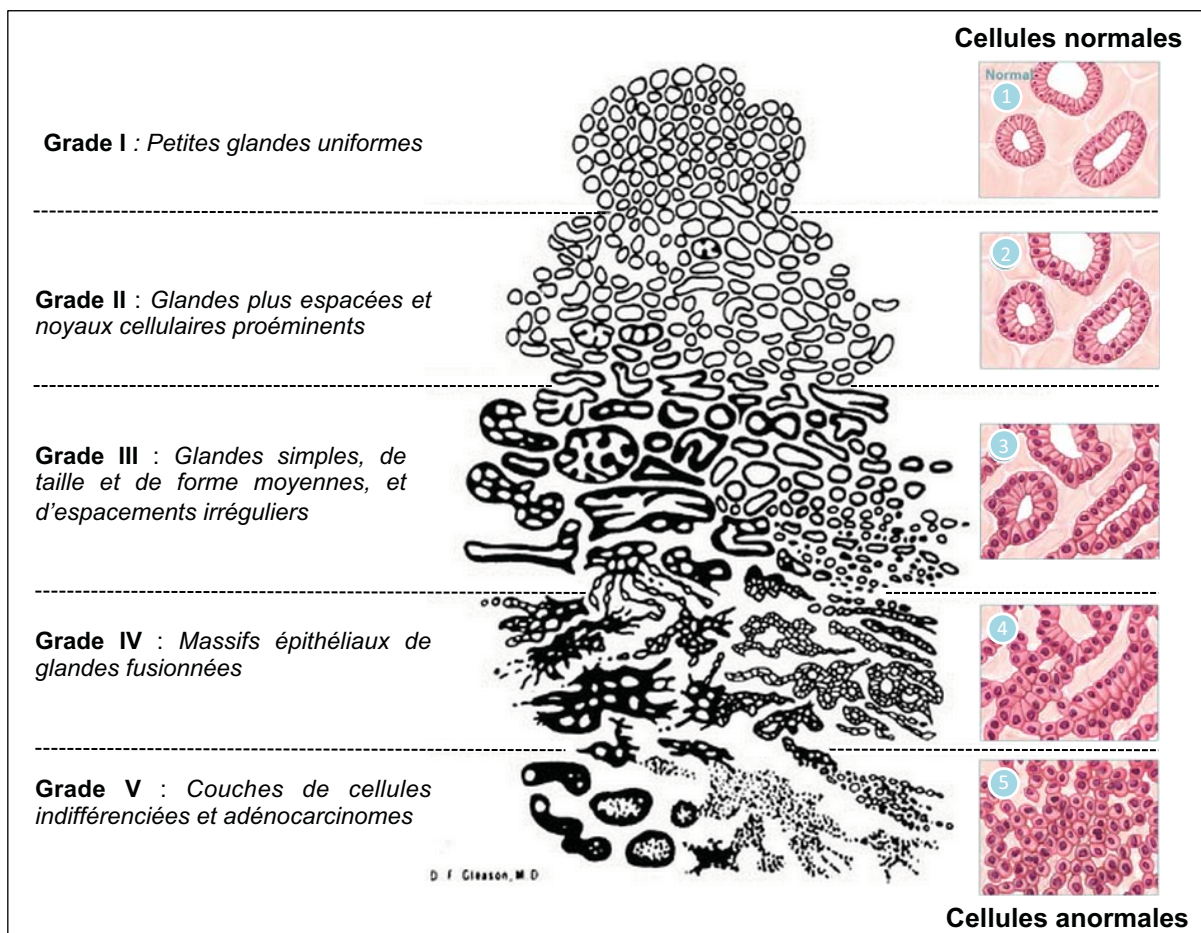


Figure 12 : Vue schématique de l'histologie prostatique à cinq grades différents selon la classification de Gleason

tumeur (grades 1 à 5) : il varie donc de 2 à 10, du moins agressif au plus agressif (Gleason and Mellinger, 2002) (**Figure 12**).

D) Prise en charge du patient et traitements

(1) Cancer localisé

Le cancer de la prostate progresse assez lentement chez la plupart des patients. Dans le cas d'hommes particulièrement âgés ou développant d'autres maladies graves, le praticien recommande une approche préférentiellement basée sur de la surveillance très active, caractérisée notamment par des dosages réguliers du PSA et des touchers rectaux pour apprécier la croissance du cancer. Des biopsies prostatiques peuvent être réalisées pour analyser l'agressivité de la maladie suite à un toucher rectal suspect. Si des changements majeurs ont lieu, le patient se voit proposer des traitements optionnels, tels que la chirurgie, la radiothérapie ou la cryothérapie (Dunn and Kazer, 2011).

La chirurgie, plus précisément la prostatectomie radicale, représente un traitement de choix si le cancer n'a pas métastasé. Elle consiste à retirer la glande prostatique entière et quelques tissus adjacents, incluant notamment les vésicules séminales. Cette pratique comporte des complications opératoires telles que des dysfonctionnements érectiles et des incontinences urinaires (Lepor, 2005).

La radiothérapie vise à cibler préférentiellement les cellules tumorales à l'aide de radiations ionisantes. Les rayons entraînent la mort des cellules malignes en bloquant leur multiplication. Elle peut être utilisée comme le premier traitement des cancers de bas grade localisés uniquement dans la prostate et développés hors de la glande dans les tissus adjacents, mais également dans les cas de cancers partiellement résectés ou afin de diminuer la taille d'une tumeur avancée (Incrocci, 2015). Les principaux effets secondaires de la radiothérapie sont des rougeurs de la peau et une inflammation de la vessie et de l'urètre.

La curiethérapie peut être utilisée par guidage échographique pour implanter dans la prostate soit de façon permanente des grains d'iode 125 radioactifs soit temporairement de l'iridium 192. Les radiations émises par ces substances provoquent la mort des cellules avoisinantes. La portée de ces implants est faible, ce qui permet de protéger les tissus voisins (vessie, rectum). La curiethérapie est indiquée majoritairement en cas de cancer localisé de bas grade.

Les ultrasons focalisés de haute densité (HIFU, pour *High Intensity Focused Ultrasound*) constituent une technique récente consistant à focaliser des faisceaux d'ultrasons de haute intensité dans la prostate *via* une sonde endorectale pour obtenir un effet d'ablation

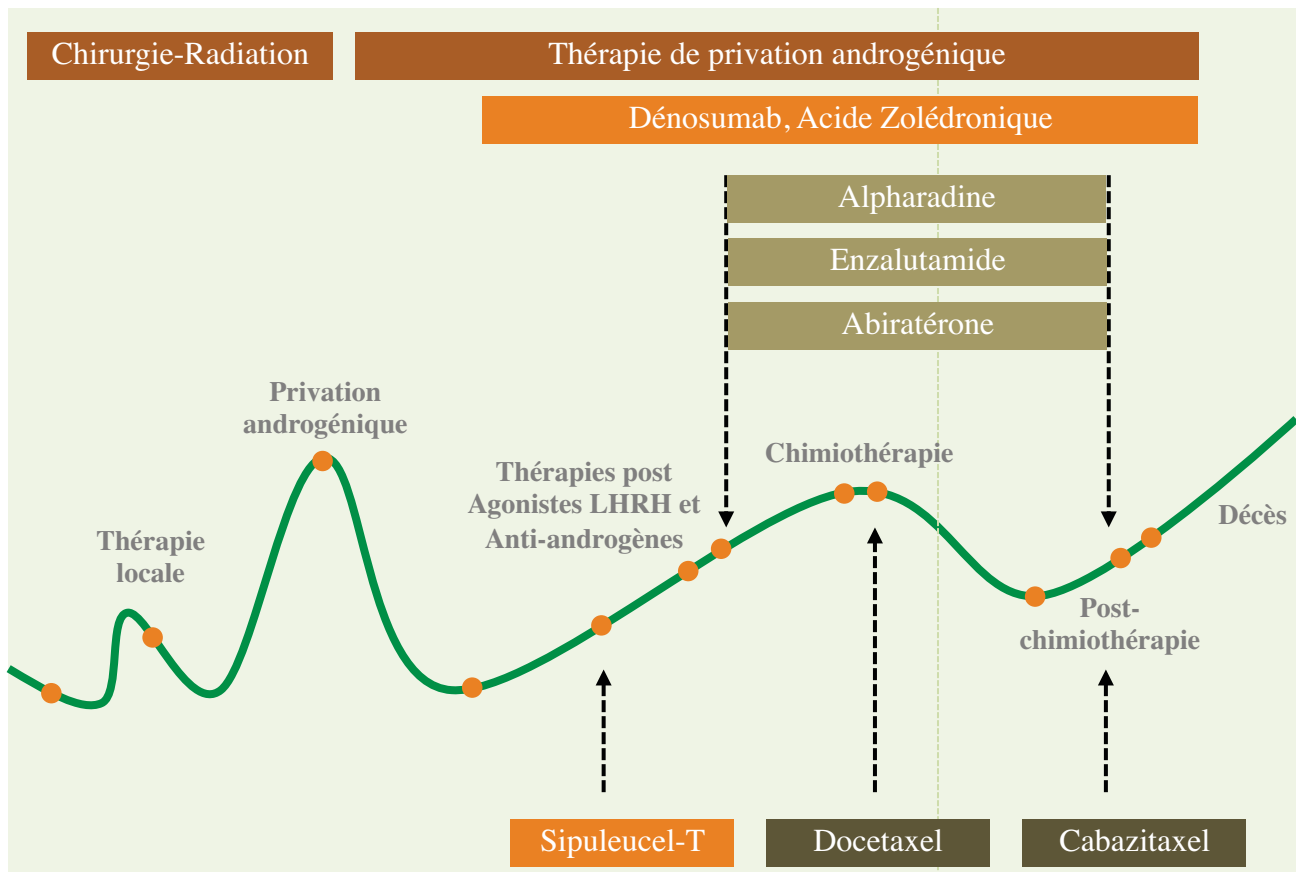


Figure 13 : Démarche couramment employée lors du traitement du cancer de la prostate

Après un suivi attentif de la maladie par dosage du PSA et biopsies régulières, l'oncologue peut décider de commencer le traitement par une prostatectomie partielle ou radicale associée à de la radiothérapie. Une hormonothérapie est mise en place dans le cadre d'une progression inchangée. Même si ce traitement ne guérit pas le cancer, il sert au contrôle de la croissance de la maladie, et notamment sa dissémination. Lorsque les thérapies hormonales ne fonctionnent plus, des agents chimio-thérapeutiques tels que le docetaxel sont utilisés. *Modifié d'après « Prostate cancer treatment », scotdir.com., consulté le 15/04/2016.*

thermique. Ce traitement peut être proposé en cas de cancer localisé de bas grade et lorsque la radiothérapie n'a pas eu d'effet.

La cryothérapie est parfois utilisée pour traiter les stades précoces de la maladie en congelant le tissu à l'aide d'une sonde transurétrale insérée dans la prostate et gelée entre -100 et -200°C. La plupart des praticiens n'utilisent pas ce traitement en première ligne, mais cela peut représenter une alternative quand les autres traitements n'ont pas été efficaces (Lau et al., 2015). Les complications sont du même type que lors de la radiothérapie (**Figure 13**).

(2) Cancer avancé

Dans le cadre de cancers avancés ayant disséminé dans les tissus adjacents et les organes distants et lors d'un échec des méthodes chirurgicales et des radiations, des approches thérapeutiques systémiques et chimiques sont mises en place afin de cibler les cellules tumorales prostatiques et les métastases.

Le cancer de la prostate étant androgéno-dépendant, l'hormonothérapie est donc centrée sur le blocage de la production et de l'action des androgènes. En association avec de la radiothérapie, elle représente le traitement de référence des cancers de la prostate localisés de haut grade ou localement avancés. Lorsque les ganglions sont atteints et que les métastases sont détectées, l'hormonothérapie est utilisée pour une longue durée. Comme décrit précédemment, les androgènes principaux sont la testostérone et la DHT, produits par les testicules et dans une moindre mesure par la surrénale. De ce fait, deux méthodes de choix sont utilisées :

- L'ablation des testicules : elle permet de réduire de 90 à 95 % la quantité de testostérone retrouvée dans le corps et entraîne une régression rapide de la tumeur prostatique.

- Les traitements médicamenteux : le premier traitement consiste à utiliser un analogue de LHRH, une hormone sécrétée par l'hypothalamus de manière pulsatile qui va activer la libération de LH par l'hypophyse, pour *in fine* favoriser la production de testostérone au niveau testiculaire. Ainsi, l'utilisation de Leuprolides® ou de Goserelin® stimule l'hypophyse constamment, entraînant une diminution du nombre de récepteurs de LHRH et la production de LH : leur efficacité est comparable à la castration chimique (Nacusi and Tindall, 2011).

La castration chimique, quant à elle, agit directement sur la signalisation androgénique. Le flutamide (Eulexin®), le bicalutamide (Casodex®) et le nilutamide (Nilandron®) sont des antagonistes de AR entrant en compétition avec la testostérone ou la DHT (Klotz, 2006). L'acétate de cyprotérone (CPA) est un analogue de

l'hydroxyprogestérone, un stéroïde bloquant l'interaction des androgènes avec AR (Connolly et al., 2012). L'un des derniers traitements proposés depuis 2012, l'acétate d'abiratéron (Zytiga®), constitue le seul inhibiteur de la biosynthèse des androgènes disponible sur le marché, et cible spécifiquement CYP17A1 (*Cytochrome P450 17A1*), une enzyme limitante de la synthèse stéroïdienne. Cette molécule empêche la synthèse des androgènes dans les testicules et la surrénale, mais également au sein de la cellule tumorale (Alex et al., 2016).

Les bénéfices de l'hormonothérapie ne perdurent pas. Après environ 30 mois de traitement, les cellules tumorales deviennent pharmaco-résistantes et le cancer progresse à un stade de CRPC (*Castration-Resistant Prostate Cancer*), souvent fatal (Crawford, 1992; Taplin et al., 1995; Loblaw et al., 2007).

La chimiothérapie va alors représenter l'alternative après l'installation du CRPC, et permet de cibler et bloquer la prolifération des cellules tumorales quelque soit leur localisation. Dans la plupart des cas, la première drogue administrée est le docetaxel (Taxotère®), en combinaison avec un anti-inflammatoire glucocorticoïde, la prednisone (Pred Forte®). Ce traitement prolonge l'espérance de vie du patient et réduit les symptômes dépendant de la maladie, sans pour autant l'éradiquer efficacement. Les chimiothérapies attaquant les cellules à prolifération rapide, quant à elles, ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et provoquent de graves effets secondaires à pondérer avec la gravité de l'atteinte métastatique (perte de cheveux, nausée, fatigue, perte d'appétit) (Tannock et al., 2004; Dunn and Kazer, 2011).

Une approche plus récente est basée sur l'utilisation d'un vaccin ciblant les cellules tumorales lors d'une perte de réponse à l'hormonothérapie. Le vaccin (Provenge®) est fabriqué spécifiquement pour chaque patient, à base de ses propres leucocytes auxquels on expose la PAP (*Prostatic acid phosphatase*), un antigène spécifique des cellules tumorales prostatiques. Les leucocytes sont ensuite ré-injectés aux patients et vont reconnaître plus efficacement les cellules métastasées. Le recul sur ce traitement n'est pas encore assez important pour savoir s'il pourrait être efficace dans des stades précoces de la maladie (Anassi and Ndefo, 2011).

La prévention de la dissémination métastatique représente donc un but majeur du traitement anti-cancéreux. Si le cancer a déjà colonisé les os, site majeur des métastases d'origine prostatique, le contrôle de la douleur du patient constitue un paramètre important. Les biphosphonates (Zometa®), en agissant sur l'activité des ostéoclastes, permettent par exemple de diminuer les taux importants de calcium libérés par les cellules métastatiques et préviennent d'éventuelles fractures (Polascik and Mouraviev, 2008). Le denosumab (Xgeva®),

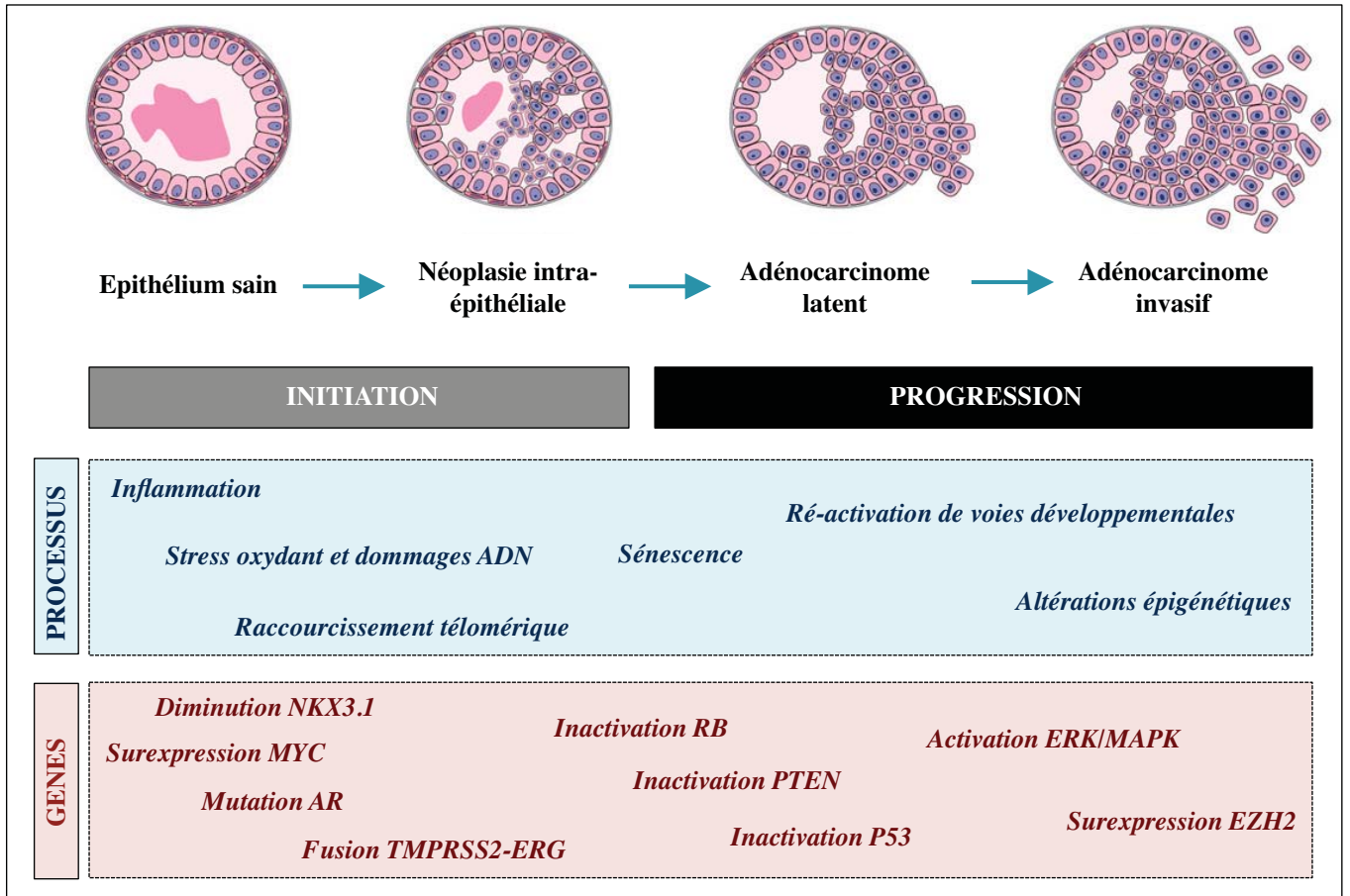


Figure 14 : Voies impliquées dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse prostatique

Les différentes étapes de la carcinogenèse prostatique sont représentées et associées avec les processus biologiques et altérations moléculaires principalement décrits lors de chaque stade. *Modifié d'après Abate-Shen and Shen, 2000.*

Prolia®) est une autre drogue prévenant la dissémination des métastases dans l'os et bloquant l'activité ostéoclastique plus efficacement que les biphosphonates (Fizazi et al., 2011) (**Figure 13**).

E) Mécanismes de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate

(1) Processus majeurs régulant la carcinogenèse prostatique

Le principal facteur de risque du cancer de la prostate demeure l'âge avancé. Malgré une méconnaissance des conséquences moléculaires du vieillissement, différentes variations d'expressions géniques ont pu être caractérisées et mises en relation avec la progression de la maladie, notamment concernant les processus inflammatoires, le stress oxydant, la sénescence, ou encore la réactivation de voies développementales (Begley et al., 2005 ; Bavik et al., 2006 ; Bethel et al., 2006) (**Figure 14**).

(a) Inflammation

De plus en plus de données épidémiologiques et moléculaires relient l'inflammation chronique à la carcinogenèse prostatique (Haverkamp et al., 2008 ; Klein and Silverman, 2008 ; Bardia et al., 2009). En effet, l'expression de certaines chimiokines représente un marqueur prédictif du cancer de la prostate. Chez les patients, l'analyse de l'expression de CX3CL1 (*C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1*), de l'IL-15 (*Interleukin 15*) ou de CCL4 (*C-C Motif Chemokine Ligand 4*) peut ainsi aider à prédire un temps de survie sans récurrence après une prostatectomie (Blum et al., 2008). De plus, la génération d'un contexte inflammatoire chez les rongeurs favorise le développement d'hyperplasies et de PIN (*Prostatic intra-epithelial neoplasia*) (Borowsky et al., 2006). De manière intéressante, les régions prostatiques développant une atrophie épithéliale sont souvent associées à une réponse inflammatoire et localisées à proximité des PIN et adénocarcinomes en progression. Ces données suggèrent que les événements inflammatoires prédisposeraient au développement de la carcinogenèse prostatique (De Marzo et al., 1999, 2003). Les origines conduisant au développement des atrophies inflammatoires prolifératives sont de plus en plus étudiées. Le rôle potentiel d'une infection bactérienne dans la carcinogenèse prostatique a été suggéré par l'identification de multiples espèces dans un fort pourcentage des échantillons issus de prostatectomies (Sfanos et al., 2008). Une prostatite d'origine bactérienne peut également aboutir à la diminution de l'expression du suppresseur de tumeur NKX3.1 (*NK3 homeobox 1*), tandis que son expression dans des lignées tumorales est régulée par des cytokines pro-inflammatoires (Markowski et al., 2008; Khalili et al., 2010).

(b) Stress oxydant

Plusieurs études suggèrent que l'effet majeur lié à l'âge et influençant la carcinogenèse prostatique est le stress oxydant (DeWeese et al., 2001; Khandrika et al., 2009; Minelli et al., 2009). Le stress oxydant résulte de la dérégulation de la balance entre les espèces oxygénées réactives (ROS) et les enzymes de détoxification contrôlant le niveau de ces ROS, conduisant à des dommages lipidiques, protéiques et génomiques. Différentes évidences relient l'initiation de la carcinogenèse prostatique et le stress oxydant. Des travaux montrent que des enzymes anti-oxydantes majeures sont diminuées dans les phases de PIN et de carcinomes, observations associées à une augmentation des adduits oxydés de l'ADN tels que 8-oxo-dG (*8-oxo-7,8-dihydro-29-deoxyguanosine*) (Bostwick et al., 2000). De plus l'expression de APE/Ref1, un complexe enzymatique impliqué dans le contrôle redox d'acteurs de la réparation ADN, est augmentée dans le cancer de la prostate. Une étude épidémiologique montre également qu'un polymorphisme du gène *Ape* (*Apurinic/Apyrimidinic endonuclease*) est corrélé au risque de développer la maladie (Kelley et al., 2001 ; Chen et al., 2006a). De plus chez la souris, une augmentation de la réponse oxydante a été directement associée à une accélération de la carcinogenèse prostatique (Frohlich et al., 2008). Enfin, la perte de NKX3.1 est corrélée à une dérégulation du stress oxydant, une augmentation du 8-oxo-dG et au développement d'une néoplasie intra-épithéliale (Ouyang et al., 2005).

(c) Sénescence

La sénescence cellulaire correspond à une forme d'arrêt du cycle cellulaire durant laquelle la cellule reste viable mais non proliférative face à des stimuli mitogéniques (Courtois-Cox et al., 2008 ; d'Adda di Fagagna, 2008 ; Evan and d'Adda di Fagagna, 2009). De plus en plus de travaux suggèrent que ce processus représente un mécanisme de défense entraînant la régression tumorale après un événement oncogénique. Effectivement, des oncogènes sont connus pour induire la sénescence *via* différents mécanismes moléculaires, incluant le stress réplicatif et la formation de ROS. Dans la prostate, la sénescence cellulaire a été caractérisée lors de l'atrophie prostatique liée à l'âge, puis décrite comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Ainsi, le SA- β -Gal (*Senescence-associated beta-galactosidase*), un marqueur des cellules en sénescence, est fréquemment détecté dans les hyperplasies prostatiques (Choi et al., 2000; Castro et al., 2003). En lignées murines, des études ont clairement démontré le rôle de la sénescence dans la tumorigenèse prostatique. En effet, l'inactivation conditionnelle du suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and tensin*

homolog) est associée à une augmentation des marqueurs de sénescence lors de la carcinogenèse, phénomène réversé par l'inactivation de p53 et favorisé par l'activation du pro-oncogène SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) (Chen et al., 2005; Lin et al., 2010). Une interprétation suggère ainsi que la différence d'occurrence entre un cancer latent et un cancer en progression pourrait être expliquée par une variation de l'efficacité de la sénescence cellulaire. Cette dernière serait en effet conditionnée par les différents *hits* oncogéniques subits par la cellule tumorale en devenir.

(d) Réactivation des voies développementales

Différentes études montrent que les tumeurs prostatiques sont capables d'exprimer une série de gènes normalement impliqués dans l'organogenèse de la glande, suggérant la remobilisation du programme génique embryonnaire (Schaeffer et al., 2008; Pritchard et al., 2009). C'est le cas de la voie WNT/ β -caténine, régulant notamment la mise en place de la résistance à la castration (Wang et al., 2008a). Cependant, des analyses indiquent que la localisation nucléaire de la β -caténine (forme active de la voie canonique) est inversement corrélée à la progression tumorale et suggèrent ainsi l'implication d'un autre mécanisme (Horvath et al., 2005). La voie Sonic Hedgehog semble également être activée lors de la carcinogenèse prostatique, même si les données ne montrent pas encore clairement s'il s'agit d'un mécanisme autocrine dans la cellule épithéliale, ou d'un signal paracrine impliquant le compartiment stromal (Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Yauch et al., 2008). Finalement, la signalisation du FGF est impliquée dans le cancer de la prostate dans des modèles tumoraux murins par une activation du récepteur épithélial FGFR1 et l'expression stromale du ligand FGF10. Ce mécanisme pourrait expliquer l'activation de la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), fréquemment observée lors de la carcinogenèse prostatique (Acevedo et al., 2007; Memarzadeh et al., 2007).

(e) Activité télomérique

Les télomères sont nécessaires au maintien de l'intégrité chromosomique. Leur raccourcissement durant les divisions cellulaires successives est généralement corrélé à des dommages ADN et à de l'instabilité chromosomique entraînant la mort cellulaire. Cependant, certaines cellules favorisées par les modifications oncogéniques échappent à cette crise et maintiennent une longueur télomérique courte mais stable au cours des divisions. Cette propriété leur permet alors de continuer de croître et éventuellement d'acquérir un phénotype malin. Le remaniement télomérique est fortement associé à l'initiation du cancer de la

prostate (Meeker et al., 2002, 2004). En effet, une anomalie de la longueur des télomères constitue un événement précoce observé durant la progression tumorale. De plus, l'activité des télomérases, enzymes nécessaires au maintien de la longueur des télomères, est très importante dans les carcinomes et les néoplasies de haut grade, suggérant que la longueur des télomères est activement modulée pendant la progression de la maladie (Koeneman et al., 1998). Ainsi, 96% des lésions néoplasiques sont associées à un défaut de la longueur télomérique. Cependant, les liens mécanistiques entre le raccourcissement télomérique et l'initiation du cancer sont mal caractérisés. Des études montrent néanmoins qu'une augmentation de l'expression du gène codant la télomérase TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) permet à la cellule d'acquérir cette immortalité proliférative (Jafri et al., 2016). Bien que le gène *TERT* ne soit pas exprimé dans la plupart des cellules somatiques, il est significativement surexprimé dans 90% des cancers chez l'homme. Les origines mécanistiques d'une telle activation restent à élucider, mais pourraient inclure des mutations du promoteur de *TERT*, des amplifications du gène, ainsi que des modifications épigénétiques (Jafri et al., 2016). Globalement, l'analyse *in situ* de la longueur télomérique pourrait représenter un biomarqueur pertinent pour prévenir l'évolution de la maladie et affiner les diagnostics précoces.

(2) Altérations génétiques et progression tumorale

Dans la partie précédente, nous avons abordé les événements moléculaires retrouvés dans un fort pourcentage des cancers prostatiques, en nous focalisant sur leur lien avec des processus clés de la tumorigenèse. De nombreux travaux se concentrent sur l'identification d'altérations génétiques associées à la progression tumorale. Un nombre important d'altérations somatiques a été identifié durant les stades de PIA, néoplasie, et carcinome, confirmant le lien étroit entre ces différentes lésions. Ainsi, différents régulateurs clés sont fréquemment mutés au sein des tumeurs, tels que AR, NKX3.1, PTEN ou MYC.

(a) Altération de AR et fusion TMPRSS2-ERG

L'activité de AR (*Androgen receptor*) est intimement liée à la progression de la carcinogenèse prostatique. Parmi les 1029 mutations décelées dans le gène codant le récepteur, 159 d'entre elles prédisposent au développement de la maladie (Gottlieb et al., 2012). De plus, des travaux indiquent que la longueur de certaines répétitions nucléotidiques du domaine amino-terminal (NTD) influence le risque de développer le cancer chez l'homme. Une méta-analyse de 19 études incluant des populations caucasiennes d'origines américaines

et asiatiques prédisent ainsi une augmentation du développement de la maladie corrélée à la diminution des répétitions CAG (Silva Neto et al., 2008; Schleutker, 2012).

Les cellules tumorales prostatiques, similairement aux cellules normales, requièrent la présence d'androgènes pour croître et survivre. La croissance du cancer de la prostate dépend du ratio entre le nombre de cellules proliférantes et la quantité de cellules en apoptose (Denmeade et al., 1996). La voie androgénique constitue un régulateur majeur de ce ratio. En 1946, Charles HUGGINS a ainsi démontré qu'une privation androgénique entraînait la régression de la maladie (Huggins, 1967; Huggins and Hodges, 2002).

L'initiation du cancer de la prostate peut être, dans de nombreux cas, attribuée à l'activation de voies promouvant la croissance cellulaire, parfois en lien avec la signalisation androgénique. Un premier exemple est l'augmentation de l'expression de la famille des facteurs de transcription ETS (*E-twenty-six*) via la fusion entre le promoteur d'un gène androgène-dépendant, TMPRSS2 (*Transmembrane protease, serine 2*) et la région codante du membre de la famille des facteurs de croissance ETS, ERG (*Erythroblast transformation-specific*). Cet événement entraîne donc une réponse de ERG aux androgènes, favorisant la progression du cycle cellulaire (Tomlins et al., 2005). L'induction de la fusion est conséquent au recrutement d'enzymes de réparation de l'ADN dépendantes de AR (Haffner et al., 2010). D'autres voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate peuvent être sous la dépendance de la signalisation androgénique, telles que la voie PI3K/AKT. Ainsi, des travaux récents ont-ils démontré un cross-talk de AR avec cette dernière (Lee et al., 2015). Les auteurs indiquent qu'une déplétion en androgènes dans des cellules tumorales prostatiques ou une diminution de l'expression de AR entraîne une augmentation de la phosphorylation activatrice de AKT. Enfin, la voie des androgènes constitue une clé de voute dans l'échappement de la maladie lors du développement de sa forme résistante à la castration (CRPC), processus développé plus précisément en partie II.

(b) Surexpression de Myc

Le proto-oncogène MYC (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) est un facteur de transcription capable de réguler une pluralité de gènes impliqués notamment dans la prolifération, la croissance, l'apoptose et la différenciation cellulaire. MYC est activé en réponse à divers signaux mitotiques tels que la voie WNT/ β -caténine et la signalisation Sonic Hedgehog. La région chromosomique contenant l'oncogène *Myc* (8q24) est fréquemment amplifiée, de manière somatique, dans un large nombre des tumeurs

prostatiques de stade avancé (Jenkins et al., 1997; Sato et al., 2008). Cependant, des études plus récentes ont suggéré un rôle de la surexpression de MYC dans l'initiation du cancer, puisque son accumulation est fréquemment observée dans les néoplasies intra-épithéliales et dans les carcinomes, sans amplification de la portion chromosomique (Gurel et al., 2008). Au niveau fonctionnel, des souris surexprimant MYC présentent un développement rapide de PIN évoluant en carcinomes (Ellwood-Yen et al., 2003). De plus, son expression forcée est suffisante pour immortaliser des cellules prostatiques humaines non cancéreuses (Gil et al., 2005).

(c) Diminution de l'expression de NKX3.1

La diminution de l'expression de NKX3.1 (*NK3 Homeobox 1*) représente un événement fréquent et précoce de l'initiation de la tumorigenèse prostatique (Abate-Shen et al., 2008). Chez l'homme, la perte du locus 8p, dans lequel se situe le gène codant NKX3.1, est largement observée au cours des phases précoces du développement tumoral (Bethel et al., 2006), avec une occurrence de plus de 85 %. Dans les cas où le suppresseur de tumeur n'est pas directement muté, il peut subir des modifications épigénétiques inhibitrices, par une méthylation de son promoteur (Asatiani et al., 2005). Bien que des premières analyses aient montré une perte totale d'expression de *Nkx3.1* dans les stades avancés de la maladie, des travaux plus récents utilisant des anticorps de haute sensibilité mettent en évidence une faible expression du gène, suggérant une prévalence du contrôle épigénétique face à la perte totale du gène (Gurel et al., 2010). L'inactivation de NKX3.1 chez la souris entraîne la formation de PIN, illustrant un rôle clé de suppresseur de tumeur, en lien avec sa fonction développementale dans la prostate (Abdulkadir et al., 2002; Kim et al., 2002). De plus, l'inactivation de NKX3.1 chez la souris est associée à un défaut de réponse au stress oxydant, tandis que son expression chez l'homme protège de ce dernier (Bowen et al., 2000; Markowski et al., 2008).

(d) Inactivation de PTEN

PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), second gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers, se situe au niveau de la portion chromosomique 10q23, fréquemment délétée lors de la tumorigenèse prostatique (Salmena et al., 2008). A ce jour, 4 mécanismes mènent à l'inactivation de PTEN dans le cancer chez l'homme : la délétion chromosomique ou la perte d'hétérozygotie, les mutations somatiques, l'oxydation, et des modifications épigénétiques comme la méthylation du promoteur (Covey et al., 2007).

Par ailleurs, des mutations de PTEN lors de la carcinogenèse prostatique confèrent des résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie, et favorisent également l'augmentation des taux de récidives après prostatectomie (Anai et al., 2006; Bedolla et al., 2007; Priulla et al., 2007). Des études mettent en avant le rôle de PTEN dans la progression tumorale vers l'androgéno-indépendance et la dissémination métastatique (Jiao et al., 2007). La compréhension de sa fonction au sein de la carcinogenèse prostatique *via* l'utilisation de différents modèles murins sera développée plus précisément dans la partie I)-4).

(e) Suractivation de la voie des MAPK

La voie des MAPK est une signalisation intracellulaire jouant un rôle clé dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que l'angiogenèse. Elle est anormalement activée dans de nombreux cancers dont le cancer de la prostate (Gioeli et al., 1999). Les mécanismes promouvant la voie sont principalement l'activation de récepteurs membranaires tels que l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), mais aussi la survenue de mutations somatiques au niveau de gènes codant pour les protéines RAS ou RAF. Même si des mutations de *Ras* et *Raf* sont rarement décelées lors de la progression tumorale prostatique (Taylor et al., 2010), des expérimentations sur des modèles murins montrent que la surexpression de RAS et RAF dans l'épithélium prostatique entraîne une activation constitutive de la voie des MAPK, favorisant l'initiation tumorale (Jeong et al., 2008; Pearson et al., 2009).

(f) Autres altérations associées au cancer de la prostate

(i) Rétinoblastome (RB)

Le suppresseur de tumeur RB (*Retinoblastoma*) est connu pour son rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire en réprimant le facteur de transcription E2F, censé stimuler la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S. L'inactivation de RB est un événement fréquent du développement tumoral prostatique (Uchida, 2012). De plus, la perte d'au moins un des deux allèles est observée dans 27 % des cas et corrélée à une diminution de l'accumulation protéique de RB (Brooks et al., 1995). Enfin, une approche de recombinaison tissulaire montre que la perte homozygote du gène entraîne des dysplasies et des carcinomes invasifs (Wang et al., 2000b). La délétion de la région chromosomique contenant *Rb* est donc un événement important dans la phase de progression des tumeurs prostatiques.

(ii) *P53*

P53 (*Tumor protein 53*) est muté dans plus de 50 % des tumeurs, caractérisant une place importante dans le développement de la maladie. Ce facteur de transcription régule diverses fonctions cellulaires capitales telles que l'apoptose, la mitose ou la sénescence. Dans un état cellulaire basal, une faible quantité de P53 est présente. Lorsque la cellule se trouve en situation de stress, tel qu'un stress oxydant et des dommages ADN, son association avec l'E3 ubiquitine ligase MDM2 est rompue, aboutissant à une augmentation de la quantité de P53 dans la cellule, activant *in fine* un panel de gènes impliqués dans le processus de sénescence. L'invalidation de *p53* n'induit pas de cancer de la prostate chez la souris, mais nécessite l'altération d'un autre gène tel que le suppresseur de tumeur *Pten* : en effet, les souris *pten/p53* développent des néoplasies avancées plus rapidement que des souris *pten* (Chen et al., 2005). De manière intéressante, la mutation des gènes *p53* et *Rb* *in vivo* favorise l'apparition de métastases, suggérant une synergie entre ces deux acteurs (Zhou et al., 2006). La littérature caractérise donc un rôle de P53 dans la progression de la maladie suite à d'autres altérations moléculaires plus précoces, ou concomitantes.

(iii) *Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)*

Une des modifications épigénétiques clés associées à la carcinogenèse prostatique est la marque répressive H3K27-me3, catalysée par l'histone méthyltransférase EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*). Elle est fréquemment surexprimée dans les formes agressives du cancer de la prostate et associée aux stades de CRPC (Varambally et al., 2002). Certaines études suggèrent que EZH2 pourrait favoriser la progression du cancer en réprimant des gènes suppresseurs de tumeurs et des acteurs développementaux, ainsi qu'en régulant le programme de dédifférenciation cellulaire (Yu et al., 2007, 2010; Cao et al., 2008). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la surexpression de EZH2 incluent une amplification du gène, une délétion de son régulateur négatif miR-101, ainsi qu'une régulation transcriptionnelle par MYC (Bohrer et al., 2010; Zhao et al., 2012). De plus, des études ont montré que l'expression de EZH2 est réprimée par la voie androgénique (Bohrer et al., 2010). Ainsi, les auteurs indiquent que l'expression de EZH2 est faible dans des lignées tumorales prostatiques sensibles aux androgènes telles que les LNCaP. De manière opposée, une privation androgénique dans des souris xénogreffées avec des LNCaP entraîne une augmentation des niveaux protéiques de EZH2. L'analyse suggère que la répression nécessite un récepteur aux androgènes fonctionnel et que cet effet est médié par le suppresseur de tumeur RB (*Retinoblastoma*). Ce phénomène explique peut-être l'origine d'une accumulation de l'histone

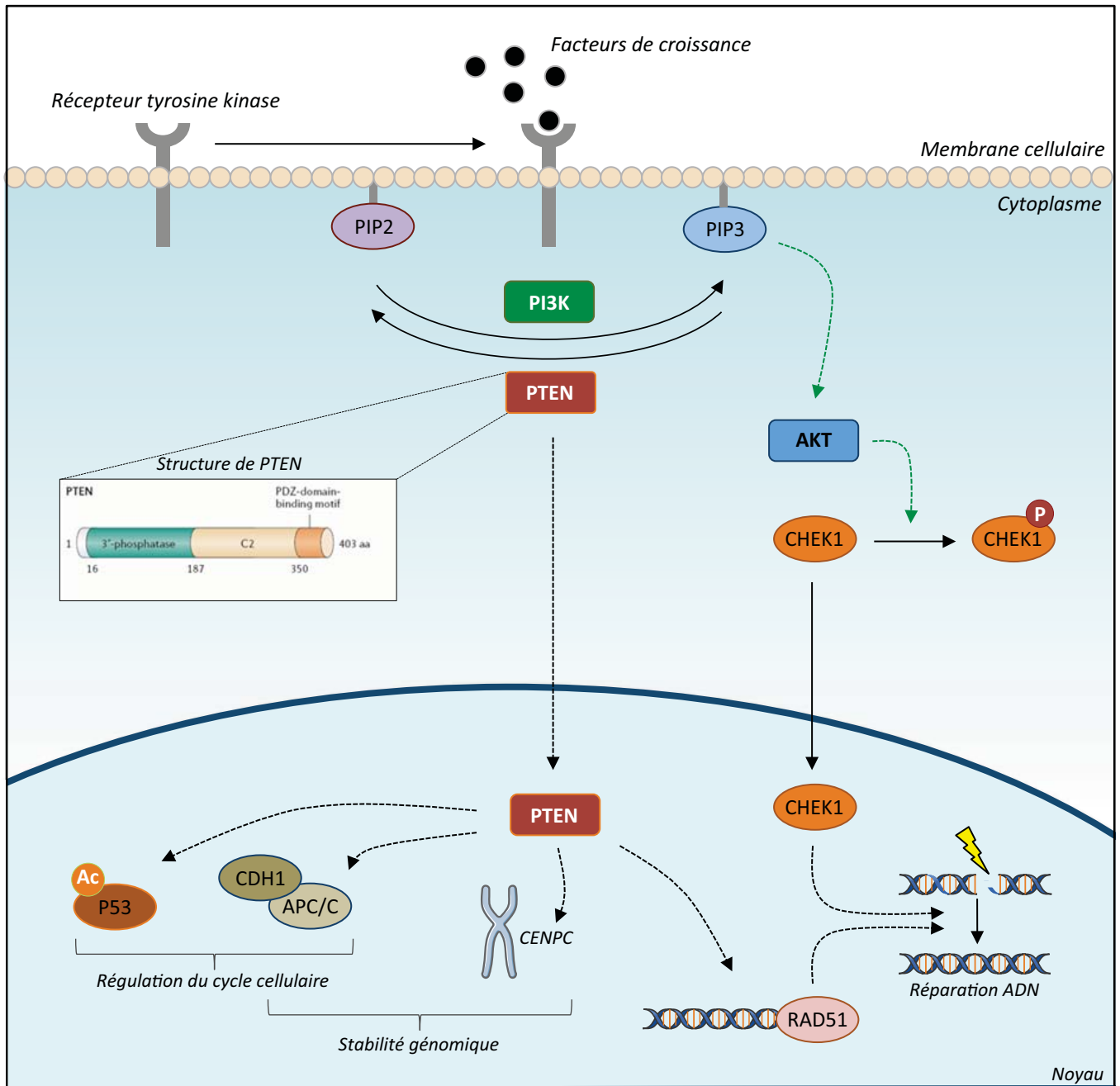


Figure 15 : Fonctions dépendantes de la PI3K et nucléaires de PTEN

PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) s'oppose à la fonction de la PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), aboutissant à l'inactivation de AKT dans le cytoplasme, et *in fine* à la répression des acteurs de survie et de croissance cellulaire. Des fonctions nucléaires dépendantes de PTEN ont également été décrites dans le noyau, mettant 3 mécanismes principaux en jeu : le contrôle de la prolifération cellulaire en favorisant l'acétylation de p53 en réponse aux dommages ADN et l'activation du complexe APC/C (*Anaphase-promoting complex*) ; la régulation de la stabilité génomique en se liant à CENPC (*Centromere protein C*) ; la réparation des dommages ADN en activant la protéine RAD51, ou en empêchant la séquestration de la protéine CHEK1 (*Checkpoint kinase 1*) par AKT dans le cytoplasme. Ac, acétylation ; P, phosphorylation ; PIP2, *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* ; PIP3, *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate* ; CDH1, *CDC20 homolog 1*. Réalisé d'après Song et al., 2012.

methytransférase EZH2 dans les phases métastasées et androgéno-indépendantes du cancer de la prostate.

F) Suppresseur de tumeur PTEN et modèles murins de cancers prostatiques

Comme énoncé précédemment, PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) est le second gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers (Stokoe, 2001). Maehama et Dixon ont caractérisé, en 1998, une fonction biochimique principale de phosphatase, impliquée dans la régulation de la voie PI3K/AKT (Maehama and Dixon, 1998), qui s'est depuis élargie à des fonctions nucléaires (**Figure 15**).

(1) PTEN et inhibition de la voie PI3K/AKT

Les phosphoinositides 3-kinases (PI3Ks) représentent une large famille enzymatique capable de phosphoryler une série de phospholipides membranaires tels que PtdIns(4)P (*Phosphatidylinositol Phosphate*) et PtdIns(4)P₂, permettant de former les messagers secondaires PtdIns(3,4)P₂ et PtdIns(3,4,5)P₃. Elles ont été découvertes il y a plus de 25 ans en association avec les oncoprotéines virales. De très nombreuses études ont permis de caractériser l'implication de la voie PI3K/AKT dans différents processus cellulaires tels que le métabolisme, l'inflammation, la survie cellulaire, la mobilité, ainsi que la progression tumorale. Cette pléthore de fonctions est exercée et expliquée par les différentes enzymes PI3K constituant la signalisation, qui divergent seulement par la spécificité de leur substrat et leurs mécanismes de régulation. Ainsi, les membres de la famille PI3K sont regroupés en quatre classes : les classes I à III ciblent les lipides phosphorylés tandis que la classe IV régule les protéines phosphorylées. La classe I est fortement associée au cancer et est composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa. Trois types d'effecteurs peuvent activer la PI3K : les récepteurs aux facteurs de croissance tels que IGF-R (*Insulin Growth Factor-Receptor*) ou PDGF-R (*Platelet Derived Growth Factor-Receptor*) ; les phosphoprotéines telles que IRS-1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*), GAB-1/2 (*Grb 2-associated binder 1/2*) ou l'oncogène Ras (McCubrey et al., 2007). La plupart du temps, la PI3K est activée par la fixation d'un ligand à son récepteur, entraînant l'association de la sous-unité régulatrice p85 avec les résidus tyrosine phosphorylés sur le récepteur *via* un domaine SH2 (*Src-Homology 2*). La sous-unité catalytique p110 transfère alors le groupement phosphate au niveau des phospholipides membranaires et plus spécifiquement le PtdIns (3,4,5)P₃, qui à son tour attire des kinases initiant la cascade de signalisation (Toker and Cantley, 1997) (**Figure 16**).

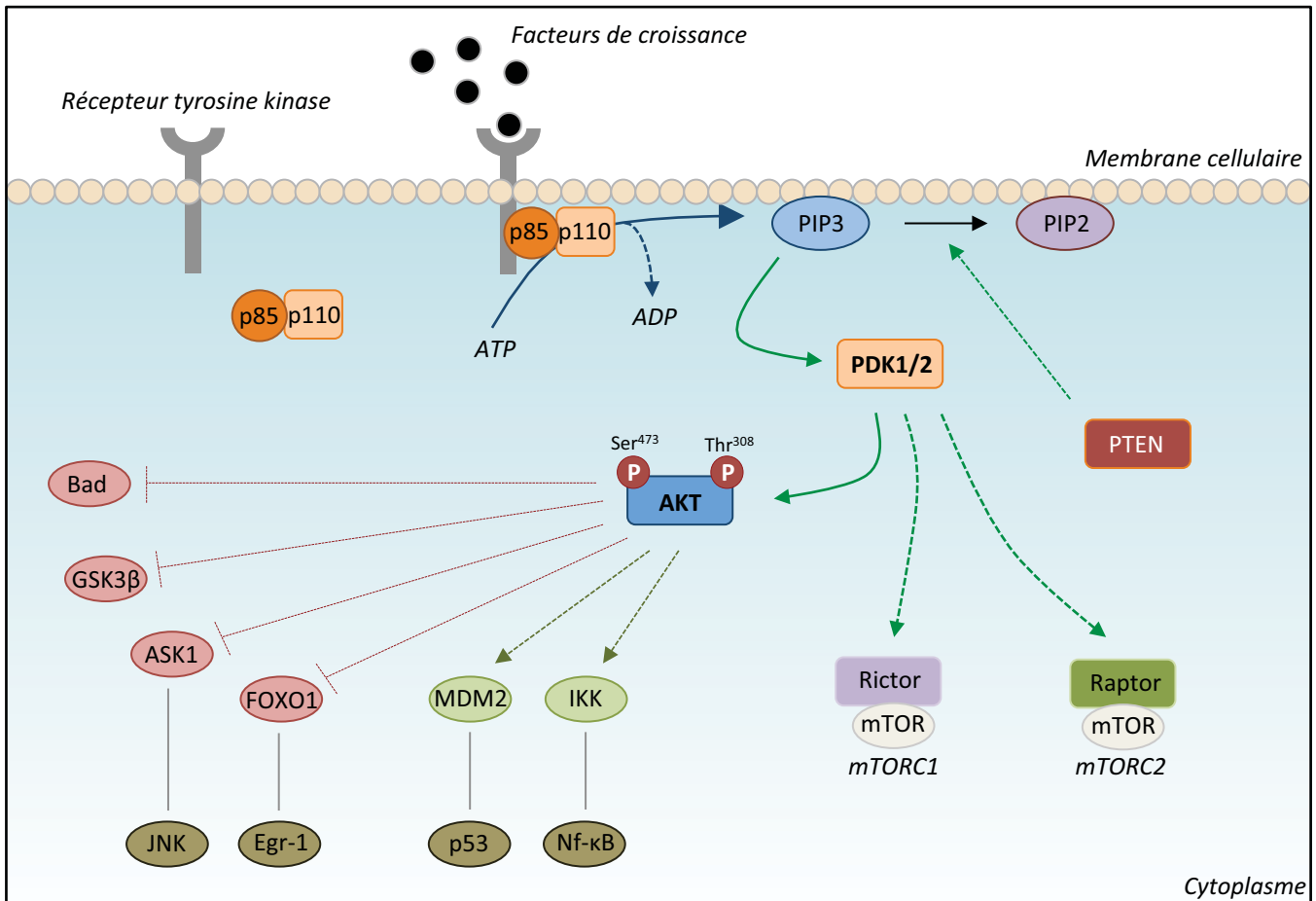


Figure 16 : Activation de la kinase AKT et son implication dans les voies de survie et de prolifération cellulaire

En réponse à des signaux extracellulaires tels que des facteurs de croissance, les récepteurs tyrosine kinase (RTK) entraînent une cascade de phosphorylation intracellulaire mettant en jeu la PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) phosphorylant l'inositol diphosphate en inositol triphosphate. Ainsi, les kinases PDK1 et 2 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*) activent AKT par phosphorylation, conduisant à la stimulation de la survie et de la prolifération cellulaire en modulant par phosphorylation l'action de facteurs clés dans ces mécanismes. GSK3 β , *Glycogen synthase kinase 3 β* ; ASK1, *Apoptosis signal-regulating kinase 1* ; FOXO1, *Forkhead box protein O1* ; MDM2, *Murine double minute 2* ; IKK, *I kappa B kinase* ; JNK, *c-Jun N-terminal kinase* ; Egr-1, *Early growth response protein 1* ; NF- κ B, *Nuclear factor-kappa B* ; mTOR, *mammalian target of rapamycin* ; Rictor, *Rapamycin-insensitive companion of mTOR* ; Raptor, *Regulatory-associated protein of mTOR*. Réalisé d'après Song et al., 2012.

En aval de la PI3K, AKT/PKB (*Protein Kinase B*) est une kinase présentant des similarités avec les PKA et C (*Protein Kinase A/C*). Chez les mammifères, il existe trois membres : AKT1, AKT2 et AKT3, codés par trois gènes distincts. Les kinases AKT contiennent un domaine amino-terminal de type PH (*Pleckstrin Homology*) permettant de diriger la protéine vers la membrane, lieu de son activation (Franke et al., 1997). Dans sa région centrale, AKT possède un large domaine kinase et est composée au niveau de sa région carboxy-terminale de régions hydrophobes, riches en proline (Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991). L'activation d'AKT dépend essentiellement de la phosphorylation de deux résidus ; la sérine 473 et la thréonine 308. Lorsque ces deux résidus sont phosphorylés, l'activation est optimale. Les PDKs (*Phosphatidylinositide-Dependent Kinases*) sont responsables de cette activation puisque PDK1 phosphoryle la thréonine 308 et PDK2 la sérine 473. AKT peut également être phosphorylée par la protéine RICTOR appartenant au complexe mTOR retrouvé en aval d'AKT (Delcommenne et al., 1998; Toker and Newton, 2000; Steelman et al., 2008). Par ailleurs, AKT peut être phosphorylée par la p70S6K qui est également en aval d'AKT dans la cascade de signalisation (Martelli et al., 2007). Lorsqu'elle est activée, AKT quitte la membrane pour phosphoryler les substrats intracellulaires. AKT peut ainsi transloquer dans le noyau où elle agit sur l'activité d'un grand nombre de régulateurs transcriptionnels (Andjelković et al., 1997). Les facteurs de transcription CREB (*Cyclic-AMP Response Element Binding protein*), E2F (*E2 factor*), NFκB (*Nuclear factor-kappa B*) et Forkhead sont des substrats directs ou indirects d'AKT et vont promouvoir la prolifération cellulaire ou la survie. En plus des facteurs de transcription, AKT peut agir sur des molécules affectant la survie cellulaire telles que la caspase-9, le facteur pro-apoptotique BAD (*Bcl-associated death*) et la GSK-3β (*Glycogen-Synthase kinase-3β*), (Figure 16).

Les produits de réaction de la voie PI3K sont déphosphorylés par deux types de phosphatases, PTEN et SHIP-1/2 (*SH2-domain-containing Inositol Phosphatase*). PTEN exerce une activité de phosphatase lipidique sur le PtdInsP3, le convertissant ainsi en PtdInsP, et provoquant l'inhibition de la voie PI3K/AKT (Georgescu, 2010). Par ailleurs, PTEN possède une activité de phosphatase protéique sur des substrats tels que FAK (*Focal Adhesion Kinase*), la protéine d'échange SHC (*Src Homology 2 domain Containing*) et les régulateurs transcriptionnels ETS-2 et Sp1 (Weng et al., 2002; Kang-Park et al., 2003). La protéine PTEN possède 4 domaines structuraux : au niveau amino-terminal sont retrouvés les domaines phosphatases lipidiques et protéiques ; le domaine C2 est responsable de la liaison lipidique ainsi que de la localisation membranaire ; les 2 domaines PEST (riches en proline (P),

MODELE MURIN	PHENOTYPE PROSTATIQUE
<i>Tp53</i> ^{-/-}	Pas de phénotype
<i>pRb</i> ^{-/-}	Pas de phénotype
<i>Pten</i> ^{+/-}	Dysplasie
<i>Cdkn1b</i> ^{-/-}	Légère hyperplasie
<i>Nkx3.1</i> ^{-/-}	Hyperplasie et dysplasie
<i>PSA.Cre;NKX3.1loxP/loxP</i>	Hyperplasie et dysplasie
<i>TMPRSS2-ERG</i>	PIN
<i>PB-Hras</i>	LGPIN
<i>MPAKT</i>	LGPIN
<i>ARR2PB-SKP2</i>	LGPIN et HGPIN
<i>Pten</i> ^{+/-} ;Erg+	HGPIN et carcinome
<i>MMTV-Cre;PtenloxP/loxP</i>	HGPIN et carcinome invasif
<i>Pten</i> ^{+/-} ;Cdkn1b ^{-/-}	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>Pten</i> ^{+/-} ;NKX3.1 ^{-/-}	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>PB-erbB2</i>	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>LADY 12T7</i>	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>ARR2PB-myc-PAI</i>	HGPIN et carcinome invasif
<i>PSA-Cre;PtenloxP/loxP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>Pten</i> ^{-/-} ;Tp53 ^{-/-}	Carcinome invasif létal
<i>LADY 12T10</i>	LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>PB-Cre4;PtenloxP/loxP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>Pten</i> ^{+/-} ;TRAMP	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>Tp53</i> ^{-/-} ;Rb ^{-/-}	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>TRAMP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>Pten</i> ^{pbcre4/-} ; <i>Smad4</i> ^{pbcre4/-}	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase

Figure 17 : Tableau récapitulatif des modèles murins de carcinogenèse prostatique

LGPIN (Low Grade Prostatic Intra-epithelial Neoplasia) et HGPIN (High Grade Prostatic Intra-epithelial Neoplasia) correspondent respectivement aux étapes de néoplasie intra-épithéliale de bas et de haut grade. Les modèles figurant en rouge sont les seuls à développer un phénotype métastatique.

glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T)) régulent la stabilité de la protéine ; PTEN possède également un domaine PDZ qui facilite les interactions protéine-protéine. Plusieurs études ont montré que les mutations au sein du domaine phosphatase rendent la protéine inactive (Maehama and Dixon, 1998; Myers et al., 1998; Maier et al., 1999).

(2) Fonctions indépendantes de la voie PI3K/AKT

En plus de son rôle très bien défini au niveau de la membrane plasmique, PTEN est retrouvée dans le noyau. Cette localisation contribuerait à son activité de suppresseur de tumeur *via* différents mécanismes. Sachant que les différents constituants de la voie PI3K/AKT sont également retrouvés dans le noyau, il est possible que PTEN constitue une phosphatase nucléaire du PIP3. Cependant, différentes études suggèrent que cette fonction nucléaire est tout autre. En effet, une implication dans l'inhibition des protéines kinases activées par les signaux mitogènes telle que la cycline D1 est caractérisée, induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Radu et al., 2003). La régulation de l'activité de P53 et sa stabilité par une interaction protéine-protéine directe est également décrite dans le noyau (Blanco-Aparicio et al., 2007). Par ailleurs, la forme nucléaire de PTEN joue un rôle dans le maintien de la stabilité chromosomique : la perte du suppresseur de tumeur entraîne une augmentation des cassures centromériques et des cassures doubles brins. Ce constat est étayé par des travaux montrant que PTEN est capable de s'associer au promoteur de la protéine RAD51 (*Radiation sensitive 51*), fondamentale dans la réparation des cassures de l'ADN. Une telle association favorise l'activation de la transcription de la protéine d'une manière dépendante du facteur E2F (Shen et al., 2007). Plus récemment, des études ont montré que PTEN interagit avec le complexe APC/C (*Anaphase promoting complex*), une E3 ubiquitine ligase qui adresse des protéines cibles du cycle cellulaire à la dégradation protéasomique. Cette interaction favorise l'association de APC/C avec CDH1 (*Cadherin 1*), activant *in fine* l'activité de suppresseur de tumeur du complexe formé (Song et al., 2011).

(3) Modèles de cancers prostatiques basés sur l'invalidation de PTEN

Même si l'invalidation totale de *Pten* est létale au stade embryonnaire, les souris *Pten*^{+/-} sont viables. Elles présentent, au niveau prostatique, une augmentation de la prolifération épithéliale et des néoplasies de bas grade, suggérant que la perte d'un seul allèle est suffisante pour induire un développement pathologique de la glande, mais pas pour la mise en place de métastases (Podsypanina et al., 1999; Di Cristofano et al., 2001). Le modèle MPAKT (*Murine Prostate restricted AKT kinase transgenic mice*), surexprimant AKT sous

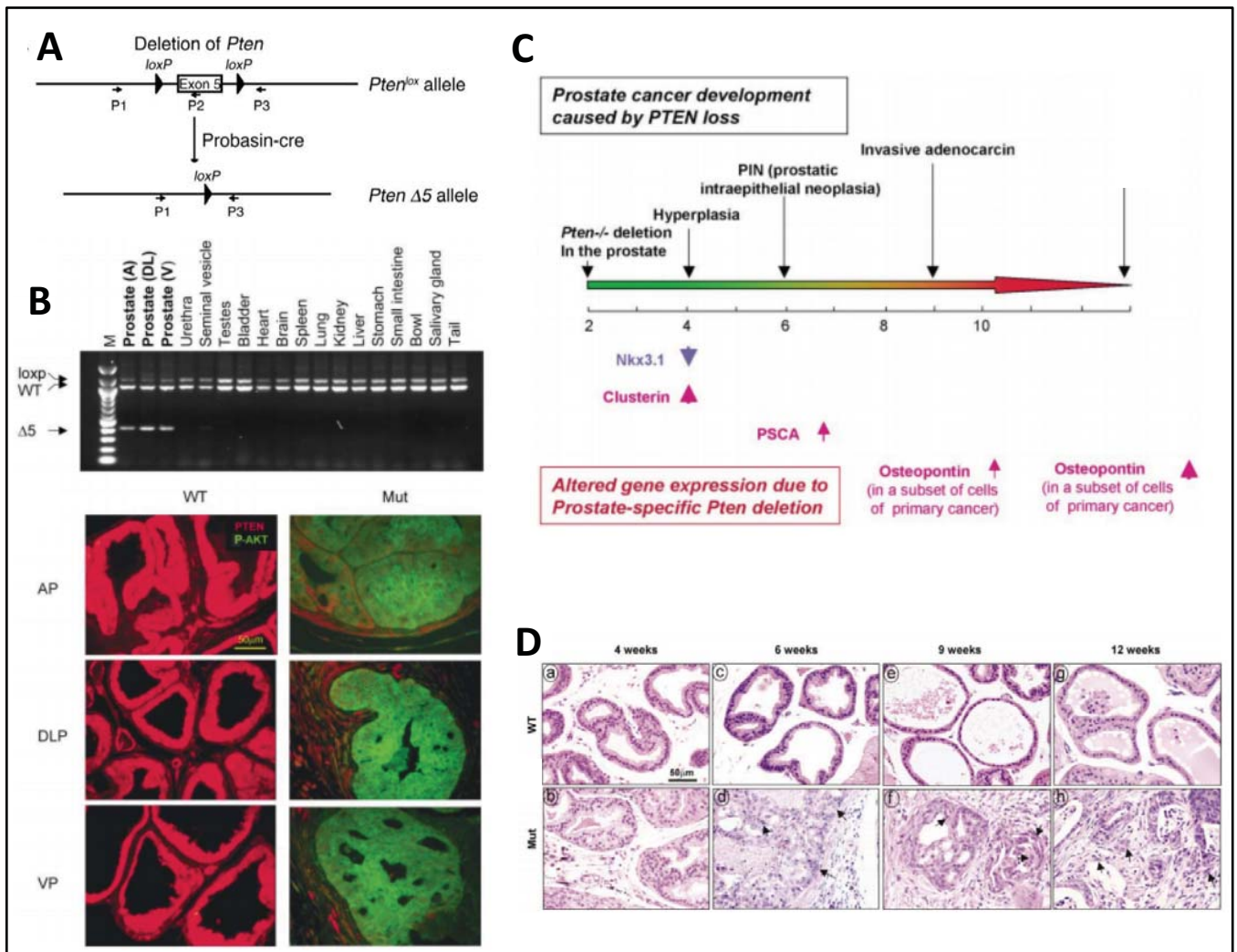


Figure 18 : Caractérisation de la carcinogénèse prostatique des souris *Pten^{-/-}*

(A) Les sites loxP sont insérés de part et d'autre de l'exon 5 codant le domaine phosphatase de *Pten*. La recombinaise Cre exprimée sous le contrôle du promoteur de la *Probasine* permet l'excision de l'exon et l'inactivation de *Pten*. (B) L'amplification des formes sauvages, floxées et recombinées de *Pten* chez la souris démontre une délétion spécifique dans les différents lobes prostatiques, associée à une augmentation de l'activité de la voie PI3K/AKT visualisée par immunomarquage dirigé contre P-AKT (vert). AP, Anterior prostate ; DLP, Dorsolateral prostate ; VP, Ventral prostate. (C, D) Schéma récapitulatif de la cinétique de la carcinogénèse prostatique chez les souris invalidées pour *Pten* et coloration hématoxyline-éosine du lobe dorsolatéral illustrant une hyperplasie à 4 semaines, une PIN à 6 semaines et un carcinome invasif à partir de 9 semaines. *Extrait et modifié d'après Wang et al., 2003.*

contrôle d'un promoteur probasine spécifique de l'épithélium prostatique, a été généré pour déterminer l'impact d'une activation constitutive d'AKT sur la transformation des cellules épithéliales et la progression du cancer de la prostate (Majumder et al., 2003). Le phénotype histologique de ces souris est très proche des souris *Pten*^{+/-}, confirmant que les effets dépendant de PTEN sont en partie relayés par la kinase AKT.

Le développement de modèles conditionnels d'inactivation génique par l'intermédiaire du système Cre-LoxP a permis de significativement optimiser les modélisations transgéniques mimant le cancer de la prostate et d'en étudier les acteurs fondamentaux (**Figure 17**). Dans ce type de construction, la portion ADN cible est flanquée par des cassettes LoxP (*Locus of X(cross)-over in P1*) dans la lignée germinale. L'inactivation du gène par délétion est catalysée par une recombinaise Cre recombinant deux sites LoxP. L'expression de la Cre est dépendante du promoteur sous lequel elle est clonée, permettant d'invalider un gène dans un tissu spécifique à un temps déterminé. La sélection du promoteur représente ainsi la phase critique pour cibler le tissu d'intérêt.

(a) Modèle PB-Cre4 x *Pten*^{loxP/loxP}

Un des promoteurs les plus couramment utilisés est celui de la probasine, couplé à deux éléments de réponse au récepteur des androgènes (*ARR2PB*^{-Cre4}). Ainsi, le modèle *PB-Cre4 x Pten*^{loxP/loxP} (nommé *Pten*^{-/-} pour la suite du manuscrit) permet-il l'inactivation du gène *Pten* spécifiquement au niveau de l'épithélium prostatique, en induisant la délétion de l'exon 5 codant son domaine phosphatase (Wang et al., 2003) (**Figure 18**). Les auteurs ont tout d'abord montré que l'expression de la recombinaise était bien spécifique de l'épithélium prostatique. Pour confirmer que la délétion prostatique était effective chez les souris *Pten*^{-/-}, les différents organes du bloc urogénital ont été analysés à l'âge de 9 semaines, la recombinaison étant effective à partir de quelques jours post-nataux. La délétion de l'exon 5 n'est observée qu'au niveau du tissu prostatique et associée à une activation constitutive de la voie PI3K/AKT. En effet, les souris développent les différents stades de la carcinogenèse prostatique humaine : hyperplasie à 4 semaines ; néoplasie intra-épithéliale à 6 semaines ; carcinome invasif à 9 semaines ; métastases entre 12 et 29 semaines au niveau des ganglions lymphatiques et des poumons (Wang et al., 2003). Les androgènes jouant un rôle critique dans le développement et le fonctionnement de la prostate ainsi que dans la survie des cellules tumorales, il est intéressant de préciser que les souris *Pten*^{-/-} castrées à 16 semaines présentent une amélioration du phénotype prostatique. Cependant, après 6 jours, l'effet de la castration

est perdu, indiquant que ces souris miment la mise en place du CRPC (*Castration-resistant prostate cancer*) chez l'homme (Wang et al., 2003). Une étude récente montre que les cellules tumorales issues des animaux *Pten*^{-/-} sont sensibles à la castration dès l'âge de 2 semaines mais qu'elles peuvent compenser la privation androgénique et promouvoir la prolifération. Cette information confirme alors les données de Wang et ses collaborateurs (Mulholland et al., 2011).

Comme décrit précédemment, PTEN exerce des fonctions anti-tumorales indépendamment de la voie PI3K/AKT. Cependant, les croisements entre des souris *Pten*^{-/+} et des animaux *Rictor*^{-/+} (un effecteur de la voie PI3K/AKT composant le complexe mTORC2) sont caractérisés par une augmentation du taux de survie. Ce résultat indique que l'activation d'AKT est capitale pour promouvoir le développement tumoral prostatique induit par la perte de *Pten* (Guertin et al., 2009). De plus, chez l'homme, une augmentation du marquage immunohistochimique de pAKT est observée dans 53 % des carcinomes prostatiques, soulignant une fois de plus l'importance de cette voie de signalisation dans la progression de la maladie (Sun et al., 2001).

(b) Autres modèles d'inactivation conditionnelle de PTEN

D'autres modèles murins d'inactivation conditionnelle de *Pten* ont été mis au point. Les souris *PtenloxP/loxP* ont été croisées avec des souris *MMTV-Cre* (*Mouse Mammary Tumor Virus-Cre*). Dans ce modèle, le promoteur MMTV peut être induit par les glucocorticoïdes aussi bien que par les androgènes, augmentant donc le potentiel de recombinaison. Ces souris développent des néoplasies intra-épithéliales de haut grade à partir de 2 semaines avec une augmentation de la prolifération et du nombre de cellules basales et luminales (Backman et al., 2004). Cependant, une étude indique que l'activité de la recombinase n'est pas strictement restreinte à la glande prostatique, puisque sa présence est également détectée dans des organes tels que les vésicules séminales, les canaux déférents, l'épididyme, les glandes salivaires, le rein et le poumon (Parisotto and Metzger, 2013).

Les souris *PSA-Cre x PtenloxP/loxP* développent une carcinogenèse progressive incluant une hyperplasie et une néoplasie intra-épithéliale de bas grade de 4 à 5 mois, une néoplasie de haut grade entre 7 et 9 mois et un carcinome invasif de 10 à 14 mois. Dans ce cas, le promoteur du PSA est actif à partir de la puberté dans les cellules luminales de la glande prostatique (Ma et al., 2005). Aucune expression ectopique de la recombinase Cre n'est rapportée à ce jour dans ce modèle.

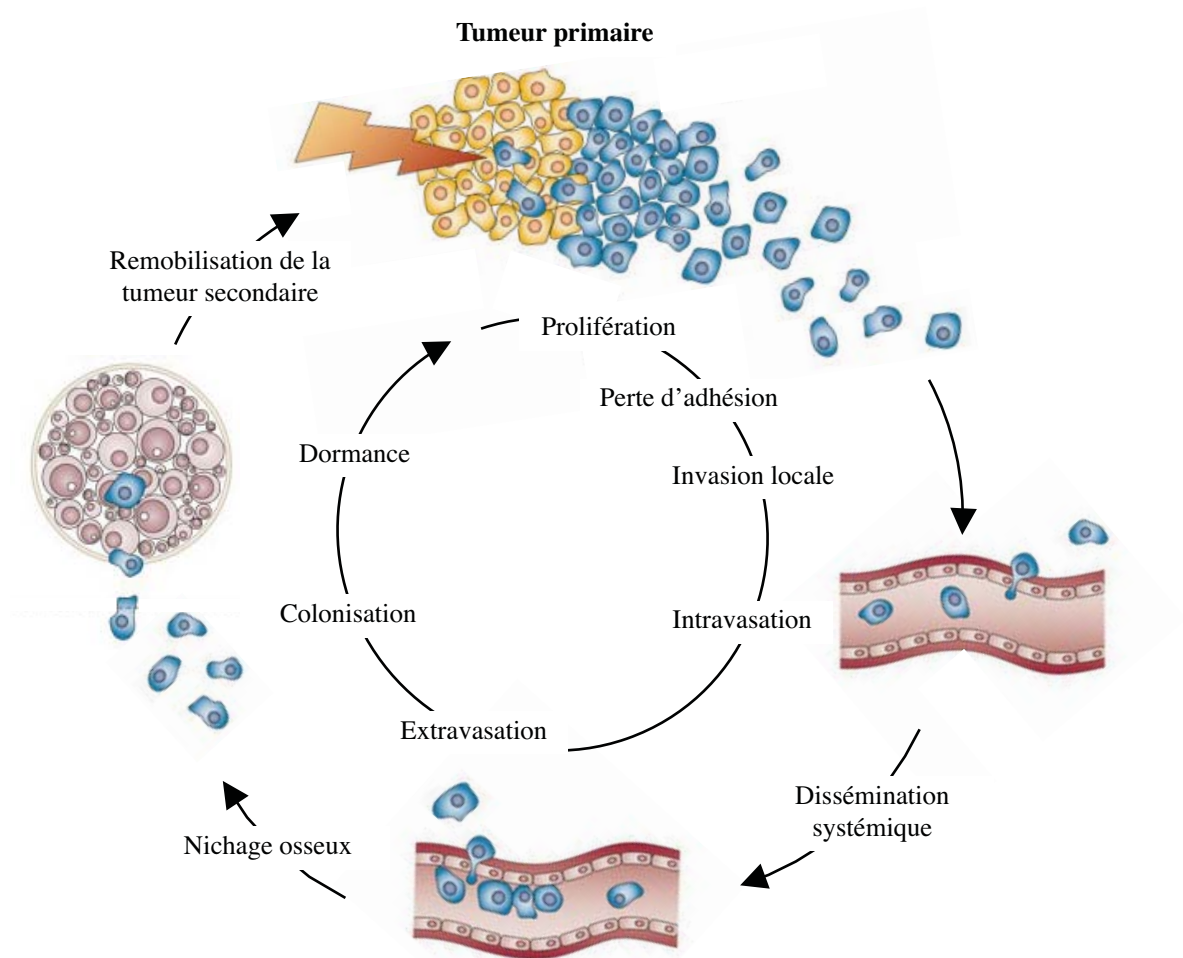


Figure 19 : Cycle de dissémination métastatique

Suite à sa transformation et à sa prolifération incontrôlée, la cellule tumorale perd l'adhésion vis-à-vis des cellules voisines et envahit le tissu adjacent. Après avoir rejoint la circulation lymphatique ou sanguine, cette dernière dissémine au niveau des organes distants. Pour cela, elle quitte la circulation sanguine pour rejoindre le tissu cible. Un état de quiescence peut alors avoir lieu pendant des années avant que la cellule ne commence à proliférer, à coloniser l'organe, et même à recoloniser un nouveau site distant. *Modifié d'après Schilling et al., 2012*

Plus récemment, des travaux ont généré des modèles murins pour lesquels la délétion de *Pten* est contrôlée au niveau temporel grâce à l'utilisation de souris *PtenloxP/loxP* croisées avec des souris contenant une recombinaise Cre inductible au tamoxifène sous le contrôle des promoteurs Probasine ou PSA (promoteur Cre-ER(T2)). De la même manière que les modèles détaillés précédemment, ces souris invalidées pour *Pten* présentent des lésions de type PIN progressant vers l'adénocarcinome invasif. Cette lignée est d'autant plus intéressante que l'on peut moduler le nombre de cellules génétiquement altérées (Luchman et al., 2008; Ratnacaram et al., 2008).

Globalement, toutes ces lignées transgéniques développent des néoplasies de haut grade et du carcinome invasif, mais l'agressivité des tumeurs est plus importante dans le cas d'un promoteur PB-Cre4. De plus, la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques et les poumons est plus fréquente dans les lignées *PB-Cre4 x PtenloxP/loxP* et *PSA-Cre x PtenloxP/loxP*. Cependant, les variations du fond génétique ainsi que l'efficacité variable de recombinaison de PTEN dans les cellules épithéliales peuvent modifier la cinétique de la tumorigenèse et l'agressivité de la maladie.

II) DISSÉMINATION MÉTASTATIQUE DU CANCER DE LA PROSTATE

1) Processus biologiques impliqués dans l'échappement tumoral

Par définition, un cancer devient malin lorsque la cellule tumorale commence à envahir les tissus voisins après avoir rejoint la circulation sanguine et lymphatique. La cause de décès du patient n'est pas principalement due à la tumeur primaire, mais plutôt attribuée à l'altération des fonctions physiologiques des différents organes touchés par la dissémination métastatique. La capacité de la métastase à se développer est la résultante d'un processus sélectif, qui, à partir d'une population hétérogène de cellules dans la tumeur primaire, permet à quelques clones présentant les meilleures capacités, de disséminer. La formation des métastases est un processus très complexe et dynamique durant lequel un grand nombre d'interactions ont lieu entre les cellules tumorales et avec leur micro-environnement. Initialement, quelques cellules tumorales se dissocient de l'épithélium prostatique pour aller activement infiltrer le stroma adjacent et entrer dans les systèmes circulatoires, pour finalement migrer et établir un site de croissance secondaire dans un organe distant (**Figure 19**). Un très faible pourcentage de ces cellules est capable de survivre, en raison de simples stress d'origines physiques, métaboliques, nutritifs ou immunitaires. L'implantation des

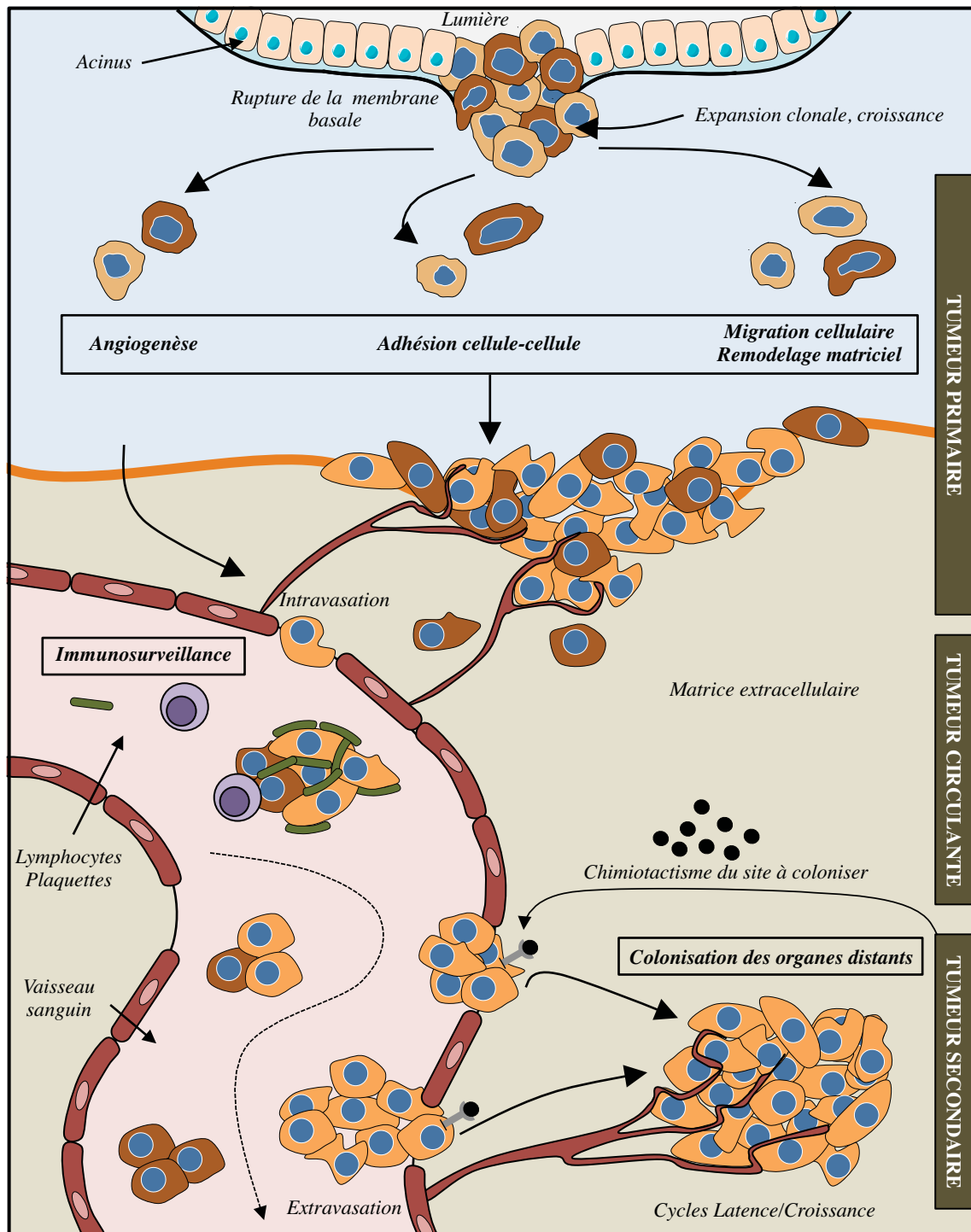


Figure 20 : Processus majeurs impliqués dans la dissémination métastatique

Après une phase d'expansion clonale et de croissance incontrôlée, la cellule tumorale doit acquérir des capacités lui permettant de rejoindre la circulation et de coloniser les foyers secondaires. Ces différents paramètres sont caractérisés par une augmentation de la néo-angiogenèse, une modification des adhésions cellule-cellule et une capacité accrue à remodeler la matrice extracellulaire et *in fine* à se mouvoir. Une fois la circulation atteinte, un contrôle de l'immuno-surveillance est nécessaire pour la survie de la cellule tumorale. Le tropisme vis-à-vis d'un site spécifique de colonisation met notamment en jeu des mécanismes de chimiotactisme indiquant à la cellule dans quelle région réaliser son extravasation et nicher au niveau d'un site secondaire. Au niveau du site secondaire peuvent s'alterner des cycles de latence et de croissance cellulaire, permettant une remobilisation de la métastase pour coloniser une autre zone.

cellules « survivantes » au sein des sites secondaires requiert l'implication de processus similaires à la carcinogenèse au sein de l'organe primaire, processus notamment médiés par le développement d'un microsystème construit progressivement par la cellule cancéreuse et les cellules hôtes. Comme abordé lors de la partie précédente, la tumorigenèse prostatique est la résultante de l'accumulation de changements génétiques multiples apparaissant à différents temps de la maladie : il est alors complexe d'attribuer une séquence spécifique d'événements, notamment dans les stades tardifs du cancer. De plus, les différentes altérations oncogéniques accumulées ne suffisent pas à expliquer le potentiel métastatique, comme par exemple démontré par les modèles transgéniques de carcinogenèse prostatique ne développant pas systématiquement de métastases. La cellule tumorale doit donc acquérir des capacités additionnelles : de ce fait, les signalisations contrôlant l'adhésion et la migration de la cellule, ainsi que l'immuno-surveillance ou l'intravasation endothéliale sont souvent dérégulées au profit de l'échappement tumoral du cancer de la prostate (**Figure 20**).

A) Adhésion cellule-cellule

Parmi les altérations décrites lors de la carcinogenèse prostatique, on retrouve une dérégulation des interactions entre les cellules épithéliales composant la partie glandulaire de l'organe. Ces interactions sont largement dépendantes des molécules d'adhésions appartenant à la famille des CAMs (*Cell Adhesion Molecules*), divisées en plusieurs catégories qui contiennent notamment les cadhérines et les intégrines.

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires récepteurs des protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont composées de deux sous-unités α et β présentes sous différentes isoformes (18 α et 8 β), dont la combinaison particulière alloue différentes spécificités et fonctions (Ramsay et al., 2007). Leur rôle dans de la carcinogenèse prostatique est suggéré, puisqu'un haut score de Gleason est corrélé à une baisse d'expression des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 6$. La diminution de la quantité de la sous-unité $\alpha 7$, quant à elle, est associée à une faible dissémination métastatique (Schmelz et al., 2002; Ren et al., 2007; King et al., 2008). Cinq variants de la sous-unité $\beta 1$ sont exprimés dans l'épithélium prostatique normal. La diminution de l'expression de la forme $\beta 1c$ est détectée dans 94 % des carcinomes prostatiques (Perlino et al., 2000), tandis que le niveau de la sous-unité $\beta 1a$ est augmentée dans de la maladie. *In vivo*, l'analyse du modèle murin de carcinogenèse prostatique TRAMP est également associée à une augmentation de l'expression de $\beta 1a$, favorisant la prolifération des cellules et leur survie en augmentant l'expression de l'IGFR-1 (*Insulin-like growth factor receptor type I*) (Goel et al., 2005). L'augmentation de l'expression des sous-unités $\beta 3$ et $\beta 6$ a

également été décrite dans l'adénocarcinome prostatique (Zheng et al., 1999a). Des études ont démontré que l'expression du complexe hétérodimérique $\alpha\beta3$ induit l'activité de la kinase CDC2 (*Cell division cycle 2*), conduisant à une augmentation de la migration cellulaire médiée par l'interaction de CDC2 avec la CCNB2 (*Cyclin B2*) et la phosphorylation de CALD1 (*Calmodulin-binding actin-regulatory protein*) (Manes et al., 2003).

Les cadhérines constituent une famille de glycoprotéines favorisant l'adhésion intercellulaire en présence de calcium extracellulaire, principalement *via* une liaison homotypique (Halbleib and Nelson, 2006). Il existe environ 20 cadhérines différentes, et les plus étudiées restent les cadhérines E (Epithéliale), N (Neurale) et P (Placentaire). Leur fonction est médiée principalement par une liaison intracellulaire avec les caténines (α , β et γ), dont le rôle est, dans le cas présent, de procurer un point d'attache aux microfilaments du cytosquelette. Il a été démontré que les tissus tumoraux présentent une forte diminution des niveaux de E-cadhérine, phénomène largement corrélé à la dissémination métastatique dans le tissu osseux (Wang et al., 2000a; Pontes et al., 2010). Des études soulignent une association entre l'expression du complexe E-cadhérine/ α -Caténine et les cancers prostatiques de haut grade, corrélée à une diminution de la survie du patient (Van Oort et al., 2007). Dans une étude plus récente, une diminution du complexe E-cadhérine/ β -Caténine a également pu être associée aux mêmes pronostics (Richmond et al., 1997). Généralement, un faible niveau protéique de la E-cadhérine associé à une augmentation de la N-cadhérine est corrélé avec la progression de la carcinogenèse prostatique et à une forte mortalité. La N-cadhérine n'est pas exprimée en situation non pathologique. Cependant, son accumulation est décrite dans les zones faiblement différenciées lors de la carcinogenèse, ainsi que dans les lésions métastatiques (Contreras et al., 2010). La N-cadhérine présente un effet opposé à la E-cadhérine puisque son expression promeut la mobilité et la migration cellulaire. En accord avec les données existantes, les différences fonctionnelles entre E et N-cadhérines pourraient être expliquées par des variations dans la modulation des signalisations intracellulaires principalement liées aux récepteurs à activité tyrosine kinase.

Enfin, l'expression aberrante des caténines, en lien étroit avec les cadhérines, est associée avec l'agressivité du cancer prostatique. Une activité anormale de l' α -caténine illustre par exemple un faible pronostic de survie du patient. De plus, la surexpression de la β -caténine est significativement associée aux stades métastasés de la maladie, notamment au niveau du tissu osseux (Richmond et al., 1997; van Oort et al., 2007).

B) Remodelage matriciel

L'invasion tumorale est notamment caractérisée par la perte de l'intégrité de la membrane basale et la migration des cellules tumorales à travers la matrice extracellulaire (Woodhouse et al., 1997). Ce processus requiert un cycle finement régulé de détachement et d'attachement vis-à-vis des composants matriciels, ainsi que la protéolyse locale des protéines de la matrice. Cette fonction est principalement assurée par les protéases exprimées par la cellule tumorale et les cellules hôtes (Scott, 1997), divisées en différents groupes majeurs : les métalloprotéases matricielles (MMPs), les sérines protéases incluant l'activateur du plasminogène (uPA), ainsi que des cystéine et aspartate protéinases. Les MMPs peuvent être subdivisées en différentes catégories selon leur structure et leurs propriétés fonctionnelles, telles que les collagénases et les gélatinases (Polette et al., 2004). Le rôle de l'uPA et des MMPs dans la perte des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans le contact cellule-MEC a été décrit en contexte tumoral (Wall et al., 2003). De plus, des études indiquent que la sécrétion de différents facteurs protéolytiques peut être médiée par le processus inflammatoire observé dans de multiples tumeurs, ainsi que *via* l'infiltration de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les neutrophiles et les macrophages qui vont engendrer des altérations locales du tissu (Stamenkovic, 2003). L'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo* a démontré que l'activité des enzymes protéolytiques est limitée par l'action d'inhibiteurs naturels tels que les TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) ou les PAIs (*Plasminogen activator inhibitors*) (Scott, 1997; Coussens et al., 2002). Ainsi, le jeu entre les enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs crée un réseau dynamique d'acteurs impliqués dans la capacité métastatique de la cellule tumorale. Le remodelage de la MEC par ces différents acteurs est accompagné de changements dans la composition et l'organisation de la matrice, promouvant l'activité de facteurs de survie, de migration et de dissémination.

De ce fait, lors de la tumorigenèse prostatique, une dérégulation de l'homéostasie MMPs/TIMPs en faveur de l'activité protéolytique est fréquemment observée. Un tel phénomène ne facilite pas uniquement le processus de remodelage matriciel, mais régule également des paramètres tels que la prolifération, l'angiogenèse ou l'EMT (Gong et al., 2014). Les MMPs sont donc plus souvent actives dans les phases tardives de la maladie, comme attesté par une association avec des scores de Gleason élevés et des stades métastatiques (Gong et al., 2014). Dans une étude récente, des auteurs ont par exemple montré que l'expression de MMP-2 n'était pas détectée dans les tumeurs de bas grade, mais plutôt présente lors du développement métastatique (Murray et al., 2012). De plus dans les travaux de Lokeshwar *et al.*, un milieu issu d'une culture en présence d'explants de prostates

développant un haut degré de malignité contient un niveau plus important de MMP2 par rapport à celle réalisée en présence de tissu normal (Lokeshwar et al., 1993). En ce qui concerne MMP9, des données montrent également une association avec des scores de Gleason élevés (Trudel et al., 2010). Les LNCaP, DU-145 et PC-3 représentent les lignées tumorales utilisées le plus couramment dans la littérature, et associées à différents degrés d'agressivité. Les PC-3 expriment MMP9 de manière plus importante que les autres lignées, paramètre corrélé à un plus haut niveau de capacité invasive (Aalinkeel et al., 2004). De plus, une expression stable de MMP9 dans des LNCaP, présentant un faible pouvoir métastatique, favorise les capacités invasives de la lignée (Aalinkeel et al., 2011). La MMP9 peut être impliquée dans la régulation de facteurs pro-angiogéniques, puisque son invalidation dans des PC-3 entraîne une inhibition concomitante du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et de molécules d'adhésion intercellulaire impliquées dans l'angiogenèse telles que ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) (Gupta et al., 2013). Enfin, MMP9 est capable d'activer l'uPA, des serpins protéases et d'autres protéines impliquées dans les processus d'invasion (Xu et al., 2010). Lors de la carcinogenèse prostatique, environ 65 % des tumeurs expriment fortement MMP7. De plus, les niveaux circulants de la protéine sont significativement élevés chez les individus présentant des métastases distantes, suggérant un rôle dans l'optimisation du processus (Szarvas et al., 2011). MMP7 a également été reliée aux métastases osseuses issues de l'adénocarcinome prostatique. Parmi les différentes métalloprotéases exprimées dans le microenvironnement tumoral osseux, MMP7 contribue de manière significative à l'implantation de la cellule tumorale en induisant de l'ostéolyse (Thiolloy et al., 2009). Des travaux suggèrent que la sécrétion de la protéine par les ostéoclastes et les cellules tumorales favorise l'activation du régulateur de différenciation RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*) sur la surface des ostéoblastes, aboutissant à une dégradation osseuse (Lynch et al., 2005).

C) Migration cellulaire

La migration cellulaire est traduite par la capacité de motilité de la cellule tumorale dans les régions de la MEC remaniées par la protéolyse, afin de rejoindre le réseau circulatoire déjà présent ou en cours de développement. Cette motilité est fortement liée à l'activité de RAS et d'autres membres de la famille des *GTP-binding protein*, tels que RHO et RAC. Ces protéines sont importantes pour les fonctions cellulaires de base, incluant l'assemblage du cytosquelette, la signalisation intracellulaire et les mouvements physiques de la membrane et de la cellule dans son ensemble (Oxford and Theodorescu, 2003). RAS est

une protéine glycosylée transmembranaire qui régule des processus tels que la prolifération, l'apoptose et les mécanismes d'invasion (Johnston, 2001). Elle agit donc comme un transducteur membranaire vis-à-vis de signaux extracellulaires liant des récepteurs à activité tyrosine kinase. Même si les mutations de *RAS* sont rares au sein de la carcinogenèse prostatique (3%), elles sont associées à 30 % des tumeurs solides (Adjei, 2001). Les RHO GTPases sont similaires à RAS en terme de structure et leur activation a lieu suite à leur mobilisation par ce dernier. Il a été suggéré que les RHO GTPases agissent *via* la régulation de la dynamique de l'actine, entraînant alors des changements morphologiques de la cellule incluant la croissance et la motilité (Giniger, 2002). Cette motilité existe grâce à l'implication d'extensions cellulaires nommées filopodes, reliées au réseau d'actine intracellulaire et à un ligand extracellulaire, et résultant en un mouvement précis de la cellule entière. Ainsi, l'inhibition de l'axe Ras-Rho au sein de l'adénocarcinome prostatique entraîne une diminution de la motilité cellulaire et de la transmigration des cellules à travers la barrière endothéliale (Khafagy et al., 2004). Des données indiquent également que cet axe est fortement activé dans les métastases issues d'adénocarcinomes prostatiques (Iiizumi et al., 2008).

D) Modulation de l'immuno-surveillance

Des données cliniques et épidémiologiques indiquent que la modulation du pouvoir immunitaire régule la capacité métastatique de la cellule tumorale. Comme décrit précédemment, les molécules inflammatoires telles que les cytokines peuvent représenter des signaux de croissance promouvant la transformation des cellules normales, la prolifération des cellules malignes, ainsi que les propriétés métastatiques (Mantovani et al., 2008). Dans un autre temps, la cellule tumorale produit des facteurs capables d'affaiblir la formation d'un micro-environnement hostile par les cellules immunitaires, permettant *in fine* une croissance et une propagation incontrôlées (Rabinovich et al., 2007). Ces dernières années, différents mécanismes d'échappement vis-à-vis du système immunitaire ont été identifiés, régulant à la fois la phase primaire de la réponse immunitaire dépendante des cellules dendritiques et la phase effectrice *via* les lymphocytes T et les cellules NK (*Natural killers*) (Vesely et al., 2011). Des études ont montré récemment que les cellules tumorales étaient par exemple capables d'inhiber la mobilité du TCR (*T cell receptor*) au niveau de la membrane lymphocytaire en surexprimant la galectine-3, appartenant à la famille des β -galactosides, conduisant à une inertie et une inefficacité des lymphocytes T. De plus, une inhibition de la galectine-3 *in vivo* entraîne le rejet de la tumeur chez la souris en favorisant l'infiltration

lymphocytaire (Demotte et al., 2008, 2010). Dans un autre temps, des analyses récentes du micro-environnement tumoral montrent une augmentation des TAMs (*Tumoral Associated Macrophages*) associés à un phénotype M2 (*Alternatively activated macrophages*). Cet enrichissement aboutit à une progression tumorale plus marquée. En effet, cette population macrophagique favorise la survie de la tumeur, phénomène expliqué par une capacité à produire des cytokines inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IL-13 ainsi que d'autres molécules suppressives vis-à-vis de la réponse lymphocytaire (Sica and Bronte, 2007 ; Allavena et al., 2008). Enfin, l'activité des cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes, est également perturbée lors de la tumorigénèse.

Il est intéressant de noter que le métabolisme lipidique peut être associé à une altération de la capacité immune de ces cellules. Des auteurs ont montré que les cellules dendritiques issues de patients développant une carcinogenèse étaient caractérisées par des taux importants de lipides, altérant leur capacité à activer la réponse lymphocytaire. La normalisation des taux en lipides à l'aide de molécules inhibitrices de la synthèse *de novo* du cholestérol restaure cette fonction (Gabrilovich, 2004).

Les différents mécanismes pris en exemple soulignent la résistance de la cellule tumorale face aux défenses immunitaires naturelles et/ou induites par des vaccins.

E) Intravasation endothéliale et mécanismes pro-angiogéniques

La migration de la cellule tumorale jusqu'à la surface de l'endothélium et sa migration transendothéliale constituent des événements clés de la dissémination métastatique. Les interactions entre la cellule tumorale et la cellule endothéliale débutent par une phase d'adhésion assurée notamment par des molécules de type PECAM-1 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule -1*), l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ ou encore VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) : la cellule peut alors pénétrer les jonctions endothéliales (Tang et al., 1993; Zheng et al., 1999b). Les cellules endothéliales sont également très actives dans le processus de transmigration puisque des changements apparaissent dans l'expression de molécules d'adhésion telles que les N-cadhérines, VE-cadhérines et PECAM-1, induisant une rétraction de la cellule endothéliale une fois que la cellule tumorale a adhéré à la matrice extracellulaire sous-jacente (Voura et al., 1998). Cependant la caractérisation du mécanisme moléculaire exact reste incomplète. Un composant majeur de la cascade de signalisation modulant la perméabilité est le calcium intracellulaire (Curry, 1992). Des études montrent que la liaison d'une cellule épithéliale de la glande mammaire à une cellule endothéliale issue de cordon ombilical induit une augmentation transitoire de la concentration en calcium dans cette

dernière, aboutissant à un phénomène de rétraction endothéliale et à une migration épithéliale. Cette capacité trans-migratrice est abolie lors de la diminution forcée des taux de calciums intracellulaires (Lewalle et al., 1998).

La deuxième composante essentielle à l'intravasation endothéliale est la présence d'un arbre vasculaire développé au sein du site primaire. En effet, les tumeurs hautement vascularisées présentent un meilleur potentiel à métastaser. En association, des concentrations importantes de VEGF dans le sérum de patients atteints de cancer sont corrélées à une diminution de la survie (Duque et al., 1999; Roberts et al., 2013). L'angiogenèse est réalisée *via* l'action de multiples facteurs impliquant la cellule tumorale et les cellules hôtes. De plus, la dégradation et l'altération de la MEC par les différentes protéases sécrétées par la cellule tumorale contribuent à la formation d'une vascularisation propice à la dissémination métastatique (Werb et al., 1999). Les facteurs angiogéniques les plus fondamentaux appartiennent aux familles du FGF (*Fibroblast growth factor*), du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et des angiopoïétines. L'expression de ces molécules a ainsi été associée à une augmentation de l'échappement métastatique de différents cancers, dont la carcinogenèse prostatique (Kwabi-Addo et al., 2004; Lind et al., 2005; Roberts et al., 2013). Il est également important de souligner que le VEGF est impliqué dans la lymphangiogenèse : il existe une corrélation entre la dissémination métastatique dans les ganglions lymphatiques et l'augmentation du VEGF-C (Jennbacken et al., 2005).

F) Colonisation des sites secondaires et mécanismes de chimiotactisme

La localisation des sites secondaires abritant les métastases n'est pas aléatoire. Même si la plupart des cellules tumorales colonisent dans un premier temps le réseau capillaire à proximité de la tumeur primaire, la bibliographie indique que leur distribution future ne peut pas être expliquée uniquement par des hypothèses mécaniques et anatomiques. La forte proportion de métastases osseuses dans différents cancers, dont le cancer de la prostate, est un exemple de colonisation sélective des organes. Trois types principaux de mécanismes de colonisation ont été proposés (Woodhouse et al., 1997). Le premier est basé sur la croissance sélective et suppose que les cellules tumorales réalisent un processus d'extravasation de manière ubiquitaire mais donnent lieu à un développement métastatique seulement dans les organes contenant les facteurs de croissance et l'environnement matriciel appropriés (Chambers et al., 2002). Le second postulat suggère un mécanisme d'adhésion sélective sur la surface endothéliale située au niveau des organes d'intérêt. Le dernier mécanisme, qui sera

développé plus précisément, met en avant un chimiotactisme sélectif guidant la cellule au sein du site à coloniser (Müller et al., 2001).

Les cellules immunitaires et les cellules souches utilisent des mécanismes de chimio-attraction pour coloniser les organes cibles. Les cytokines sont des molécules semblables aux facteurs de croissance, divisées en 4 groupes basés sur la présence d'un résidu amino-terminal cystéine fortement conservé : les CC, CXC, CX3C et C cytokines. Elles interagissent avec des récepteurs couplés à la protéine G, déclinés en 10 familles de type CCR (*C-C chemokine receptor*) et 7 familles de récepteurs CXCR (*C-X-C chemokine receptor type*) (Palomino et al., 2015). En réponse aux cytokines, ces récepteurs induisent des cascades de signalisation intracellulaire incluant des mobilisations calciques, l'activation de kinases telles que les ERK, MAPK ou PI3K (Kasper et al., 2007), ainsi que les RHO-GTPases (Henschler et al., 2003). Ce couplage récepteur/cytokine permet par exemple aux leucocytes d'adhérer aux cellules endothéliales et de migrer à l'endroit ciblé. Les cellules tumorales développent le même type de mécanisme pour cibler directement un organe de préférence. Lors de la carcinogenèse prostatique, l'interaction de la cellule tumorale dépendante de CXCR4 est ainsi importante dans le ciblage des métastases au niveau osseux (Gladson and Welch, 2008). Ces résultats suggèrent que CXCR4 représente un composant clé de l'implantation métastatique et une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, son blocage à l'aide d'anticorps neutralisants est associé à une diminution des métastases osseuses dans un modèle murin de cancer du sein (Xu et al., 2015). Sun *et al.* démontrent également que l'augmentation de l'expression de CXCR4 est corrélée à une aggravation de la dissémination du cancer de la prostate dans le tissu osseux chez l'homme (Sun et al., 2010).

Les cellules tumorales présentent un métabolisme lipidique très rapide qui nécessite la proximité d'une source convenable. Des études indiquent que les PC-3 prolifèrent plus rapidement dans la moelle épinière à proximité d'une source de lipides (Brown et al., 2009). Certaines classes lipidiques agissent ainsi en tant que chimio-attractants envers les cellules tumorales prostatiques : un traitement avec de l'acide arachidonique et des oméga-6 entraîne une migration rapide de cellules PC-3 vers la moelle épinière, effet bloqué par une compétition avec des oméga-3 (Brown et al., 2009). Ces études démontrent également que des déplétions lipidiques dans la moelle épinière diminue l'attraction des PC-3, confirmant une fonction critique dans la dissémination métastatique et ses organes cibles.

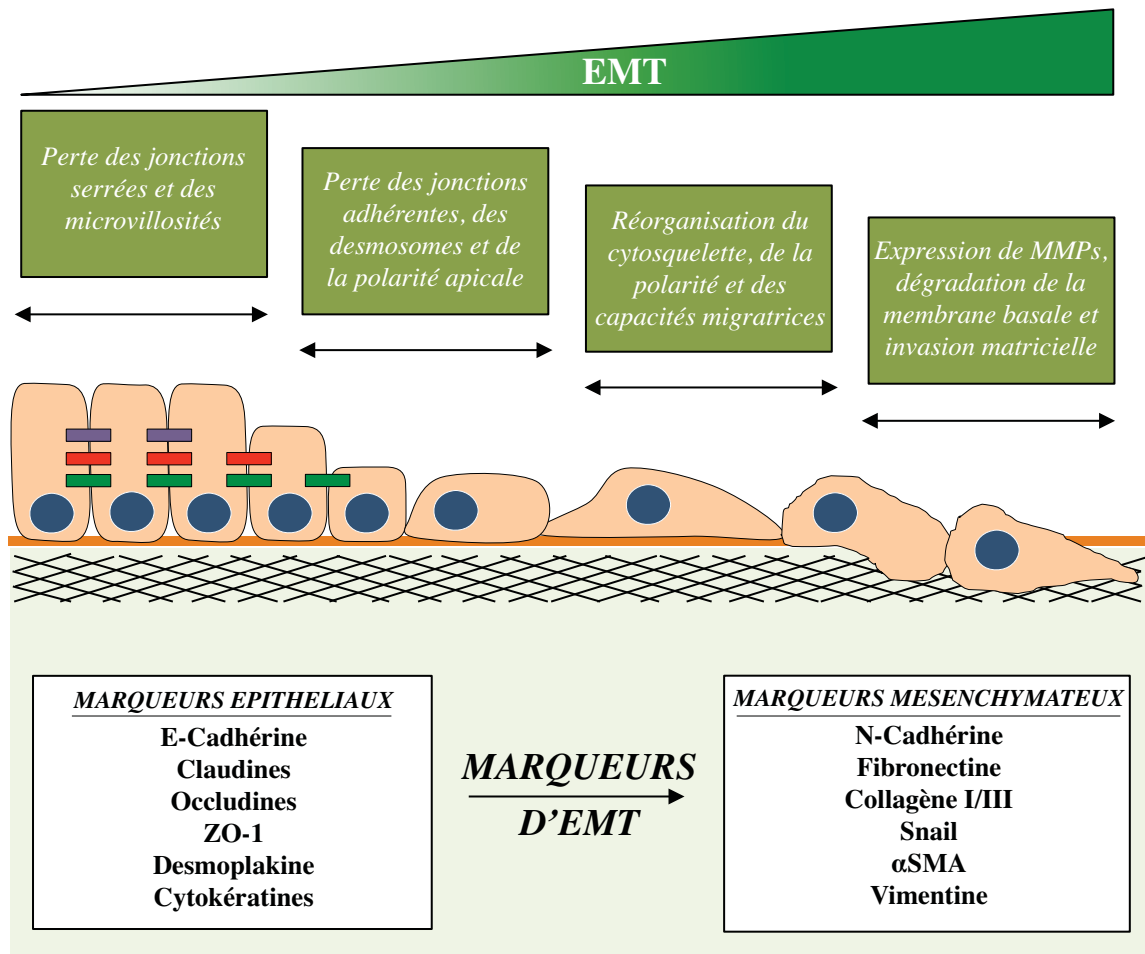


Figure 21 : Changements moléculaires caractéristiques de la mise en place de l'EMT

Réalisé d'après Angadi et al., 2015

2) Transition épithélio-mésenchymateuse et dissémination du cancer prostatique

A) Généralités

La majorité des tumeurs humaines provient des tissus épithéliaux. Les cellules épithéliales sont fortement connectées *via* leur pôle latéral grâce à des jonctions membranaires spécialisées telles que les jonctions serrées, les desmosomes ou encore les jonctions communicantes. Ces différentes structures permettent la formation d'un feuillet aligné de cellules polarisées (un pôle basal et un pôle apical) délimité par une membrane basale. Ces cellules peuvent, en condition non pathologique, se déplacer uniquement le long de cette membrane en utilisant des molécules d'adhésion incluant les cadhérines et les intégrines, mais ne peuvent pas se détacher et quitter le compartiment épithélial pour envahir la matrice extracellulaire (Schock and Perrimon, 2002; Thiery and Sleeman, 2006). En culture cellulaire, elles vont croître en monocouche, maintenant un haut niveau d'adhésion intercellulaire. A la différence du compartiment épithélial exerçant une fonction spécifique selon les tissus, les cellules mésenchymateuses jouent une fonction de support (Kalluri and Weinberg, 2009). Elles sont rarement en contact direct avec les cellules voisines et présentent des capacités de motilité importantes : si un contact existe, il est focal et transitoire. *In vitro*, les cellules mésenchymateuses présentent une morphologie semblable aux fibroblastes et tendent à être très mobiles et à migrer individuellement (Friedl, 2004; Thompson et al., 2005).

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) fait référence à un programme par lequel les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux, leur permettant alors de migrer hors de leur compartiment d'origine (Kalluri, 2009). Ce processus est réversible puisque la cellule peut réaliser une transition mésenchymo-épithéliale afin de s'intégrer au sein d'un nouveau compartiment épithélial. L'EMT a été décrite pour la première fois dans des cultures tridimensionnelles de cellules épithéliales issues de cornée en 1982, et a depuis été impliquée dans de nombreuses étapes du développement embryonnaire ainsi que dans des pathologies incluant la carcinogenèse (Hay, 2005a).

B) Bases moléculaires de l'EMT

Les changements morphologiques réalisés durant l'EMT incluent une perte de la polarisation de la cellule épithéliale et l'acquisition d'une motilité importante. Au niveau moléculaire, ce phénotype est caractérisable principalement par une perte des molécules impliquées dans les jonctions d'adhérence. On observe ainsi une corrélation directe entre la perte de la E-cadhérine et une diminution du phénotype épithélial (Thiery, 2002; Wang et al., 2007; Nauseef and Henry, 2011) : la dérégulation de cet acteur uniquement ne suffit pas à

Facteurs de transcription	Gènes réprimés durant l'EMT	Gènes activés durant l'EMT	Voies de signalisations associées
<i>SNAIL1</i> et <i>SNAIL2</i>	E-cadhérine, Claudines, Occludines, Cytokératines, Desmoplakine et Plakophiline	Fibronectine, N-cadhérine, Collagène, MMP15, MMP2, MMP9, TWIST1, ID1, ID2, ZEB1, ZEB2	TGFβ-SMAD3, WNT-β-caténine, Notch, PI3K-AKT, NF-κB, EGF et FGF
<i>TWIST1</i>	E-cadhérine, Claudines, Occludines, Desmoplakine, et Plakoglobine	Fibronectine, N-cadhérine et α5 intégrine	MAPK
<i>ZEB1</i> et <i>ZEB2</i>	E-cadhérine, ZO1, Crumbs3 et Plakophiline	N-cadhérine et MMPs	TGFβ-SMAD3, WNT-β-caténine et RAS-MAPK
<i>FOXD3</i>	Inconnus	Inconnus	β1 intégrine et laminine
<i>FOXC2</i>	E-cadhérine	Fibronectine, Vimentine, N-cadhérine, et αSMA	TGFβ-SMAD3
<i>FOXF1</i>	E-cadhérine, Claudine1, Occludines, Desmoglérine, Desmocolline2, Desmoplakine	Fibronectine et N-cadhérine	Inconnues
<i>FOXQ1</i>	E-cadhérine	Fibronectine, N-cadhérine et Vimentine	Inconnues
<i>FOXO3A</i>	E-cadhérine	SNAIL1	AKT
<i>FOXA1</i>	E-cadhérine	Fibronectine, Vimentine et SNAIL1	TGFβ, HGF et AKT
<i>FOXA2</i>	E-cadhérine et ZO1	Fibronectine, Vimentine, N-cadhérine, SNAIL1 et SNAIL2	TGFβ, HGF et AKT
<i>Serpentine, GATA4, GATA6</i>	E-cadhérine, Crumbs et Claudines	N-cadhérine et MMP1	Inconnues
<i>HMGA2</i>	E-cadhérine	SNAIL1, SNAIL2 et TWIST	TGFβ-SMAD3
<i>SOX9</i>	Inconnus	SNAIL2	BMPs et PKA
<i>KLF8</i>	E-cadhérine	MMP9	Inconnues
<i>CBFA-KAP1</i>	Inconnus	FSP1	Inconnues
<i>ZNF703</i>	E-cadhérine	Vimentine, N-cadhérine, SNAIL1 et Cytokératines	RHO-GTPase
<i>PRX1</i>	E-cadhérine	Vimentine et laminine	BMP2 et TGFβ

Figure 22 : Facteurs de transcription principaux impliqués dans l'EMT et leurs gènes cibles

Réalisé d'après Lamouille et al., 2014

expliquer une telle transition. La perte des cytokératines (constituants des filaments intermédiaires), l'acquisition de marqueurs mésenchymateux d'adhérence intercellulaire tels que la N-cadhérine et de marqueurs cellulaires mésenchymateux tels que la Vimentine (composant des filaments intermédiaires) ainsi que la capacité à sécréter des protéases telles que MMP2 et MMP9 sont des caractéristiques requises (Kalluri and Weinberg, 2009) (**Figure 21**). De nombreux facteurs de transcription appartenant notamment aux familles SNAI, SLUG, TWIST, ZEB ou FOX sont identifiés comme des marqueurs de l'EMT régulant la E-cadhérine, la N-cadhérine et les intégrines, et associés au développement d'un phénotype mésenchymateux (Kalluri and Weinberg, 2009) (**Figure 22**). La réorganisation des protéines du cytosquelette et la production d'enzymes de dégradation permettent alors aux cellules de migrer individuellement et d'envahir la matrice extracellulaire. Certaines d'entre elles acquièrent également une résistance à l'apoptose partiellement basée sur les propriétés de la transition épithélio-mésenchymateuse (Polyak and Weinberg, 2009).

C) Rôle de l'EMT dans la dissémination du cancer de la prostate

L'étude des pathologies cancéreuses a permis de caractériser l'implication de l'EMT dans le processus de dissémination métastatique, durant lequel les cellules tumorales issues de l'épithélium du site primaire doivent modifier leur phénotype pour franchir les barrières biologiques et survivre pour rejoindre le site secondaire. Certains chercheurs considèrent que l'EMT représente la première étape de l'échappement tumoral. Quand les cellules épithéliales activent différentes voies développementales impliquées dans la plasticité cellulaire et acquièrent des capacités d'EMT, elles génèrent différents dérivés mésenchymateux qui favorisent les capacités migratoires par le biais de différentes caractéristiques fondamentales : la diminution de la cohésion cellulaire, l'augmentation de la capacité à dégrader la matrice, la facilité à se mouvoir, ou encore la résistance à l'anoïkis. Elles peuvent ainsi envahir le stroma et pénétrer dans la circulation (**Figure 23**).

Différentes analyses montrent une diminution importante d'expression des cytokératines et des protéines de contact cellulaire telles que la desmoplakine et la E-cadhérine durant la carcinogenèse prostatique. Ces diminutions sont inversement corrélées au grade de la tumeur, à son invasivité et à sa résistance à la radiothérapie. De plus, les patients présentant une expression aberrante de marqueurs de l'EMT après une prostatectomie développent plus fréquemment un stade métastatique de la maladie (Ray et al., 2006). La majorité des études se focalise sur la E-cadhérine, indiquant par exemple que l'hyperméthylation de son promoteur constitue le mode principal de dérégulation lors de la

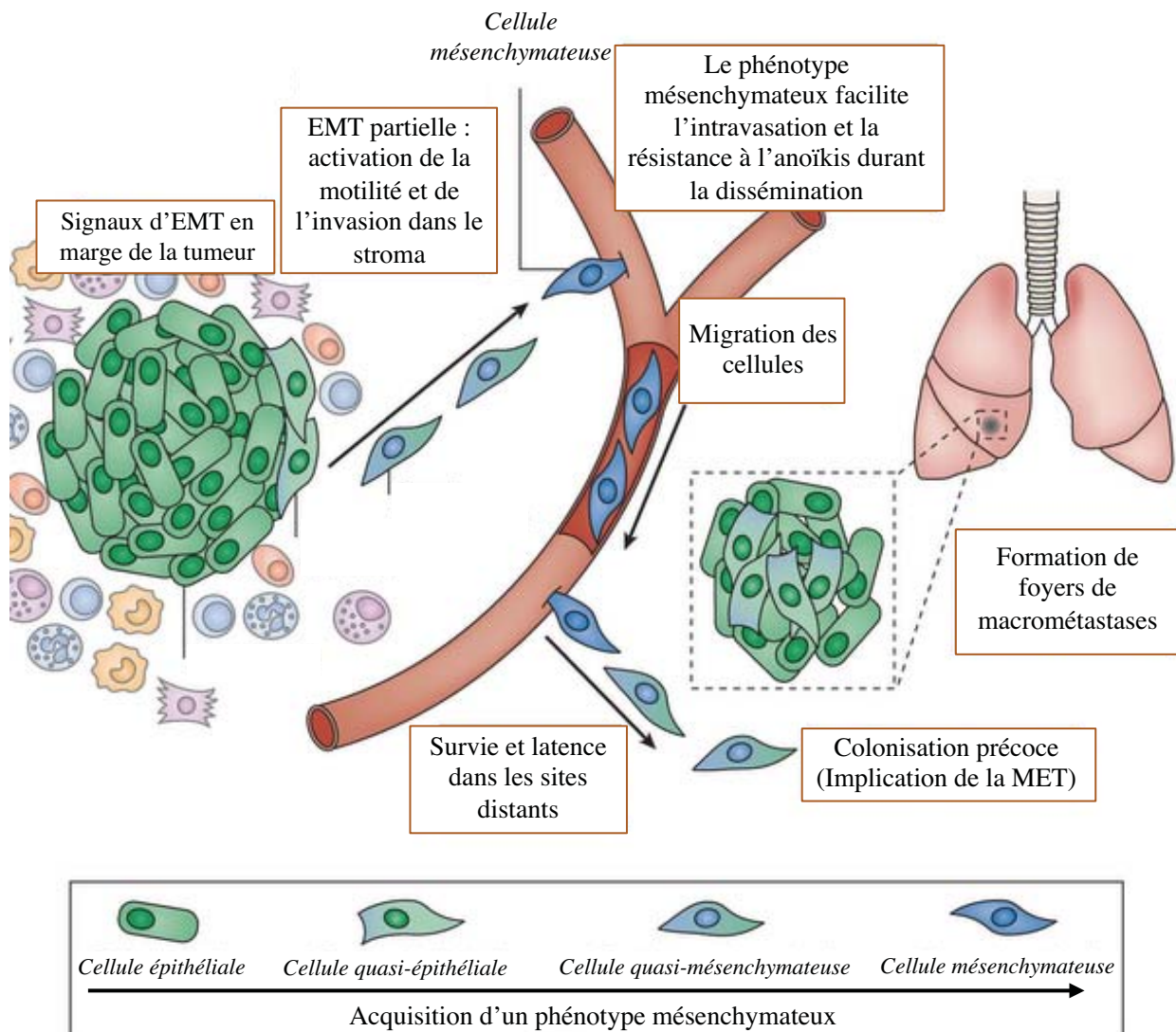


Figure 23 : Implication de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer

Modifié d'après Tam et Weinberg, 2013.

carcinogénèse (Graff et al., 1995). Cependant des pertes alléliques sont également observées (Berx et al., 1998). Dans le cadre du cancer de la prostate, l'expression de la E-cadhérine est principalement perdue sans mutation du gène, et plutôt due à une répression transcriptionnelle (Hirohashi, 1998). Lors de la pathologie, une augmentation concomitante de l'expression de la N-cadhérine est observée (Jennbacken et al., 2010). Ce *switch* caractéristique d'expression de la E- et de la N-cadhérine est associé à une augmentation de la capacité métastatique du cancer de la prostate, même si la variation d'autres marqueurs de l'EMT est également démontrée (Vimentine, Snail, Collagène de type I, Thrombospondine I) (Tanaka et al., 2010).

L'association de l'EMT avec le processus de dissémination métastatique est également mise en évidence *via* l'étude de facteurs de transcription clés. Par exemple, l'augmentation de l'expression de TWIST est observée dans 90 % des cancers prostatiques (Kwok et al., 2005). Des expériences d'interférence ARN indiquent que la diminution de l'expression de TWIST augmente significativement la sensibilité des cellules tumorales aux drogues anticancéreuses. En plus de l'EMT, TWIST pourrait également induire la dissémination du cancer prostatique vers l'os par l'activation de l'expression de DKK-1 (*Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1*) (Yuen et al., 2007a).

Enfin, l'accumulation de données récentes montre que l'EMT favoriserait l'émergence de la résistance à la castration lors de l'hormono-thérapie dans le cadre du cancer de la prostate. Les expériences suggèrent que la castration entraîne une activation des processus d'EMT qui, en retour, induisent l'indépendance de la tumeur vis-à-vis de la signalisation androgénique et l'apparition de métastases (Shiota et al., 2015). Ainsi, les résultats montrent-ils que l'induction de l'EMT *in vivo* par un traitement au TGF β active l'expression de AR et aboutit à l'émergence de certaines populations clonales résistantes à une privation androgénique. Ces clones sont, de manière intéressante, caractérisés par une surexpression de TWIST1. Une réversion de l'EMT à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de la voie du TGF β est capable de diminuer l'accumulation protéique de AR et de TWIST1, favorisant l'efficacité du protocole de castration.

D) Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'EMT

Différents événements moléculaires régulent directement ou indirectement l'EMT au sein de la carcinogénèse prostatique. Cette partie se focalisera sur le rôle des voies de réponse aux facteurs de croissance, et plus particulièrement la voie du TGF β (**Figure 24**).

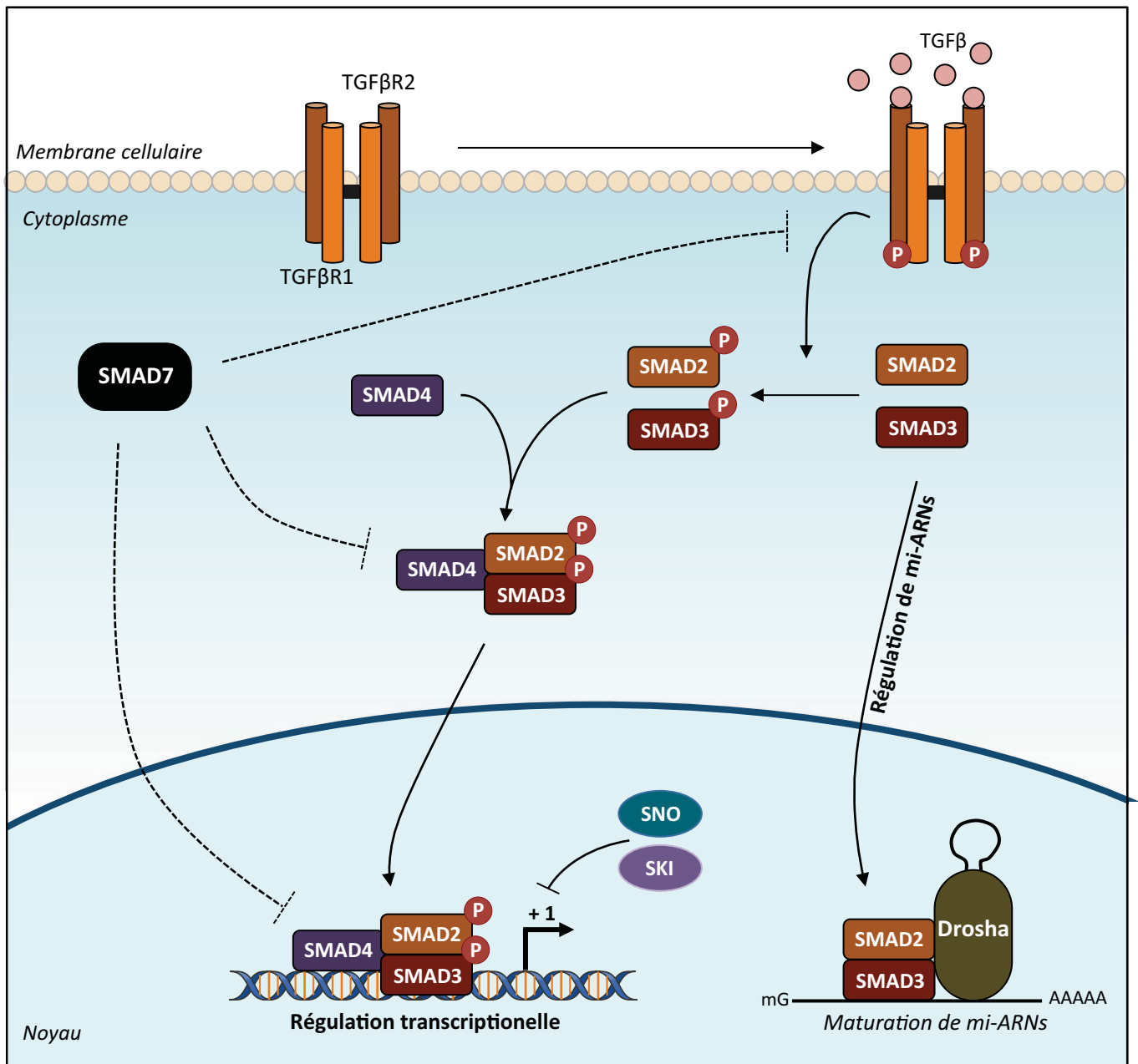


Figure 24 : Voie canonique de la signalisation du TGFβ

Les ligands TGFβ (*Transforming growth factor β*) sont synthétisés sous la forme de complexes latents composés en dimères et associés avec des peptides de latence (non montré). Après fixation du dimère et activation des récepteurs de type 1 et 2, les protéines SMAD2 et 3 subissent en aval une phosphorylation activatrice, induisant la formation d'hétérodimères de SMADs et leur translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, les complexes s'associent préférentiellement à des éléments de réponse spécifiques (SBE, *SMAD binding element*). Les protéines nucléaires SKI et SNO sont quant à elles capables d'antagoniser la régulation transcriptionnelle des SMADs. De plus, une SMAD inhibitrice, SMAD7, inhibe la voie du TGFβ *via* de multiples mécanismes, incluant la dégradation du TGFβR1 et l'inhibition de la formation des hétérodimères de SMADs. En plus de leur rôle transcriptionnel, les SMADs modulent la biogenèse des miRNAs en facilitant la maturation du miRNA primaire en précurseur miRNA dans le noyau. *Modifié d'après Akhurst et al., 2012.*

(1) Voie du TGF β

La famille du TGF β (*Transforming growth factor beta 1*) inclut notamment 3 isoformes, TGF β 1, 2 et 3, qui sont exprimées lors du développement embryonnaire et associées à l'EMT. Durant les phases tardives de la carcinogenèse prostatique, c'est l'isoforme β 1 qui est impliquée dans une pluralité de fonctions pro-métastatiques, notamment *via* l'induction de l'événement de transition épithélio-mésenchymateuse (Principe et al., 2014) (**Figure 25**). Des auteurs ont ainsi traité des lignées cellulaires prostatiques avec des anticorps neutralisants dirigés contre le TGF β 1 et ont observé une augmentation de la E-cadhérine et des cytokératines 5 et 8, associée à la diminution de l'activité de la voie du TGF β (Hu et al., 2014). De plus, les travaux de Slabáková *et al.* montrent que le TGF β est capable d'induire, dans des lignées tumorales prostatiques, l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'EMT tels que SNAI et SLUG (Slabáková et al., 2011). Durant la carcinogenèse prostatique, le TGF β active également l'accumulation de NF- κ B, phénomène corrélé à des changements morphologiques indiquant une transformation épithélio-mésenchymateuse. Cependant, cet effet est bloqué lors d'un traitement avec un inhibiteur de la voie NF κ B, le BAY11-7085 : elle représente donc un médiateur important du TGF β au sein du cancer de la prostate (Zhang et al., 2009). Dans différentes lignées tumorales prostatiques, un traitement à l'aide de TGF β est également capable d'induire l'expression de la protéine STAT3, activant *in fine* l'expression de facteurs impliqués dans l'EMT tels que TWIST1 (Cho et al., 2013). De la même manière le TGF β induit l'expression de PAR-4 (*Prostate apoptosis response-4*) (Chaudhry et al., 2014). Ainsi, PAR-4 entraîne l'accumulation d'acteurs tels que la VIMENTINE ou SNAI1, favorisant le phénotype de migration cellulaire. Un siRNA dirigé contre PAR-4 diminue l'accumulation de ces protéines suite à un traitement TGF β et illustre son rôle de médiateur. En plus du potentiel activateur du TGF β vis à vis de l'EMT, d'autres effecteurs de la voie semblent eux aussi impliqués, tels que le TGF β R2 (*Transforming growth factor receptor 2*), dans le modèle murin de carcinogenèse prostatique TRAMP. *In vivo*, l'altération de la voie du TGF β entraîne une accélération de la malignité tumorale dans ces souris, principalement en induisant l'EMT (Pu et al., 2009). Récemment, deux autres effecteurs directement dépendants du TGF β ont été impliqués dans la dissémination métastatique du cancer de la prostate. NEDD9 (*Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9*), associé aux adaptateurs protéiques CRK, diminue ainsi le potentiel activateur de la voie du TGF β envers l'EMT (Morimoto et al., 2014). La Clusterine, une molécule chaperonne aux effets pléiotropes, représente également un effecteur du TGF β . Dans une étude, les auteurs montrent que l'induction de la transcription de la

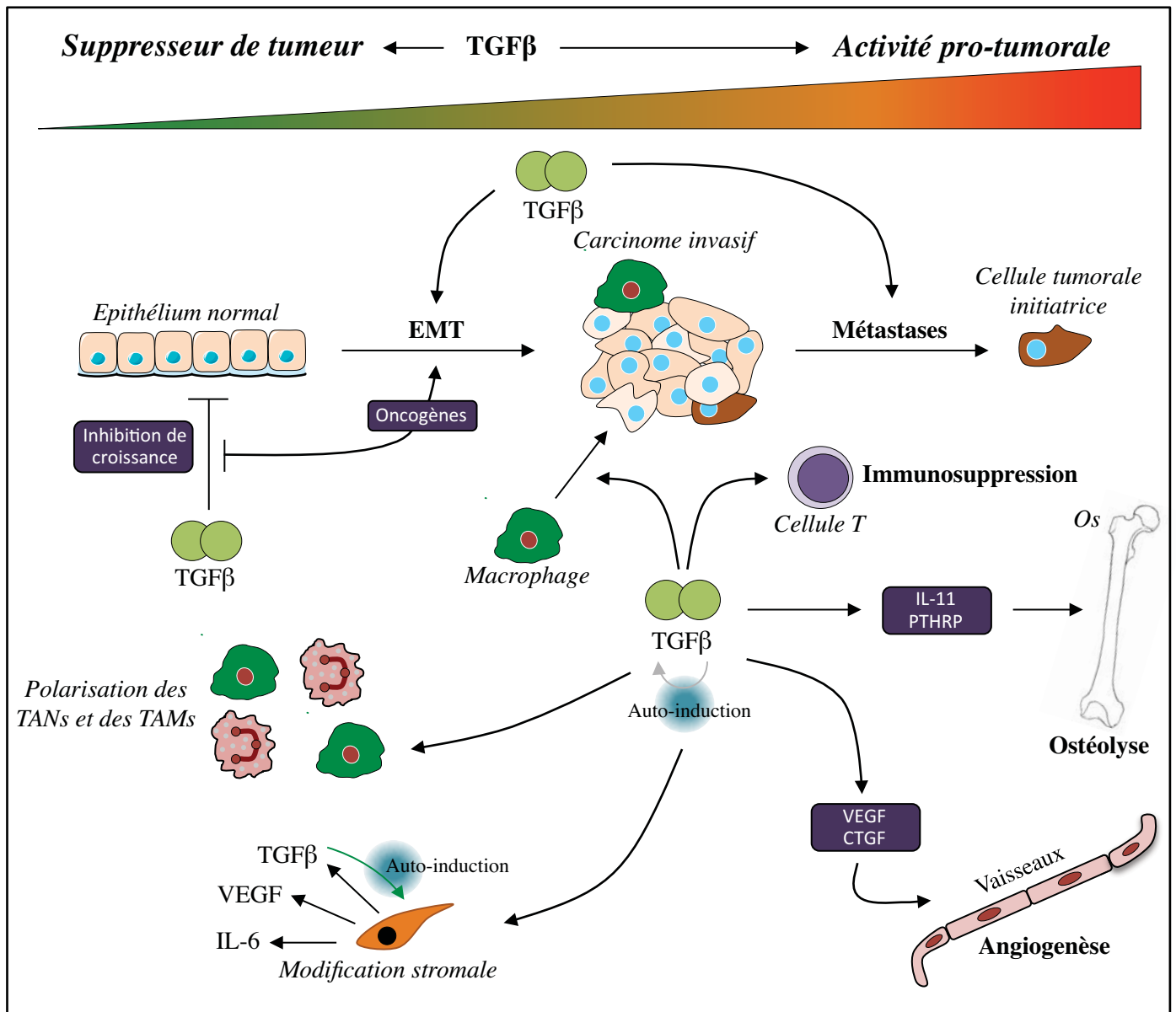


Figure 25 : Activité bi-phasique de la voie du TGFβ durant la tumorigenèse

Le TGFβ exerce deux rôles diamétralement opposés lors de la carcinogenèse, avec une fonction de suppresseur de tumeur dans les phases précoces de la maladie en régulant la croissance des cellules épithéliales et promouvant paradoxalement la progression tumorale dans les phases tardives. Cette seconde fonction est principalement attribuée à une régulation des processus d'EMT, des capacités immunosuppressives, de l'angiogenèse et du tropisme osseux. VEGF, *Vascular endothelial growth factor* ; TGFβ, *Transforming growth factor* ; IL-6/11, *Interleukine-6/11* ; CTGF, *Connective tissue growth factor* ; PTHRP, *Parathyroid hormone-related protein* ; TANs, *Tumor associated neutrophils* ; TAMs, *Tumor associated macrophages*. Modifié d'après Akhurst et al., 2012.

Clusterine par la voie du TGF β entraîne une accumulation importante de Twist1, favorisant l'induction de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine ou la Fibronectine : une inhibition de la Clusterine supprime cet effet (Shiota et al., 2012).

(2) Autres voies de signalisation

(a) Voie du FGF

La bibliographie indique que la voie du FGF (*Fibroblast growth factor*) est fortement recrutée lors de la carcinogenèse prostatique (Giri et al., 1999). Pour caractériser un lien potentiel avec l'EMT, des études ont utilisé des souris transgéniques inductibles pour FGFR1 (*Fibroblast growth factor receptor 1*) spécifiquement dans la prostate. L'induction de la protéine est associée à l'apparition d'un phénotype mésenchymateux lors du développement des adénocarcinomes. Une étude des gènes surexprimés dans ces tumeurs montre une forte accumulation du facteur de transcription SOX-9 (*Sry-related HMG box-9*), caractérisée comme mécanisme potentiel médiant l'effet du FGFR1 sur l'EMT (Acevedo et al., 2007). Le FGFR4 (*Fibroblast growth factor receptor 4*) est quant à lui associé à la surexpression de MMP-14 dans certaines lignées tumorales prostatiques, effecteur déjà illustré de la transition épithélio-mésenchymateuse (Sugiyama et al., 2010).

(b) Voie de l'IGF1

Même si cette voie n'est pas la plus étudiée vis-à-vis de l'EMT, des données rapportent qu'un traitement réalisé avec de l'IGF1 (*Insulin growth factor 1*) sur des lignées tumorales prostatiques induit une augmentation du facteur de transcription ZEB1, entraînant une diminution de l'expression de la E-cadhérine (Graham et al., 2008). Ces informations sont appuyées par l'étude de la signature génique de cellules tumorales circulantes issues de la carcinogenèse prostatique, où une corrélation entre les gènes EMT-dépendants et les IGF1 et 2 est mise en évidence (Chen et al., 2013).

(c) Voie de l'EGF

La dérégulation de l'expression de l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) dans les tumeurs prostatiques métastatiques est associée à une forte augmentation des marqueurs d'EMT (Giannoni et al., 2010). De plus, des traitements à l'aide d'EGF sur la lignée tumorale prostatique ARCaP entraînent une augmentation du processus, corrélée à la perte de l'E-cadhérine et une augmentation de SNAIL (Zhau et al., 2008). Le lien entre la voie de l'EGF et l'EMT a pour le moment été caractérisé comme dépendant de AKT (Gan et al., 2010).

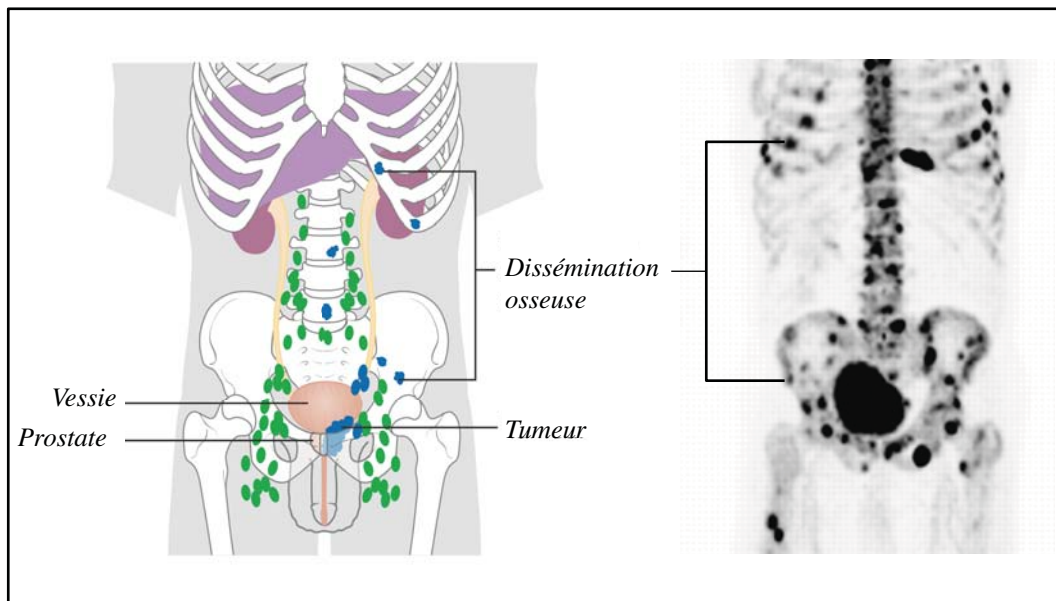


Figure 26 : Détection de métastases osseuses chez un patient atteint du cancer de la prostate

Modifié d'après Even-Sapir et al., 2005

Type de cancer	Fréquence (%)	Survie (mois)	Type de lésion
Prostate	85	36-48	Ostéoblastique
Sein	80-85	24-36	
Poumon	44	3-7	
Thyroïde	50	17-20	
Vessie	40	6-9	
Mélanome	40-45	6-10	
Rein	50	12	Ostéolytique
Myélome	95-100	20-33	

Figure 27 : Fréquence des métastases osseuses par cancer chez les patients

Modifié d'après Sahi et al., 2010

Récemment, Cho *et al.* ont démontré une augmentation des facteurs de transcriptions TWIST1 et STAT2 en réponse à la voie de l'EGF *in vivo* lors de la carcinogenèse prostatique (Cho et al., 2013).

(d) Voie PI3K-AKT/RAS/MAPK

Mulholland *et al.* ont montré que la perte de PTEN et l'activation de la voie RAS/MAPK coopèrent pour promouvoir l'EMT et les métastases durant la carcinogenèse prostatique. Les souris présentant une invalidation conditionnelle de *Pten* et une activation de *K-ras* sont caractérisées par une accélération de la progression tumorale. Cet événement est corrélé à un phénotype d'EMT et à la présence de métastases avec une pénétrance complète. De plus, les sous-populations de progéniteurs exprimant fortement RAS et AKT présentent des capacités d'EMT importantes et métastasent plus facilement lors de greffes orthotopiques (Mulholland et al., 2012).

3) Métastases prostatiques et tropisme osseux

A) Physiopathologie des métastases osseuses

Le tissu osseux constitue la cible majeure des métastases d'origine prostatique. Les métastases osseuses soulèvent un problème clinique puisqu'elles entraînent une morbidité importante chez les patients (douleurs, fractures, compression des racines nerveuses, anémie due à l'envahissement de la moelle osseuse) (**Figures 26-27**). Une des explications de ce tropisme suggère que les tumeurs prostatiques développent un phénotype spécifique facilitant leur croissance dans le tissu osseux (Mundy, 1997). Cependant d'autres cancers, tels que le cancer du sein, sont également capables de métastaser dans l'os. Ainsi des études plus récentes ont souligné l'importance du micro-environnement osseux et des interactions réciproques entre la cellule tumorale et les cellules osseuses (Efstathiou and Logothetis, 2010). La matrice osseuse est composée de 95 % de collagène de type I, les 5 % restants étant des protéines autres que le collagène, ainsi que des protéoglycanes. Cette matrice non-collagénique inclut des acteurs tels que l'Ostéopontine, la Sialoprotéine, ou encore l'Ostéonectine, constituant les principales molécules d'intérêt dans l'attachement et la croissance des cellules cancéreuses prostatiques (Romanowski et al., 1990; Pinero et al., 1995). Les cellules de la moelle osseuse ne comprennent pas seulement des ostéoblastes et des ostéoclastes, mais également des cellules hématopoïétiques, des adipocytes et des cellules immunitaires. Ensemble, la matrice osseuse et les facteurs de croissance sécrétés par les

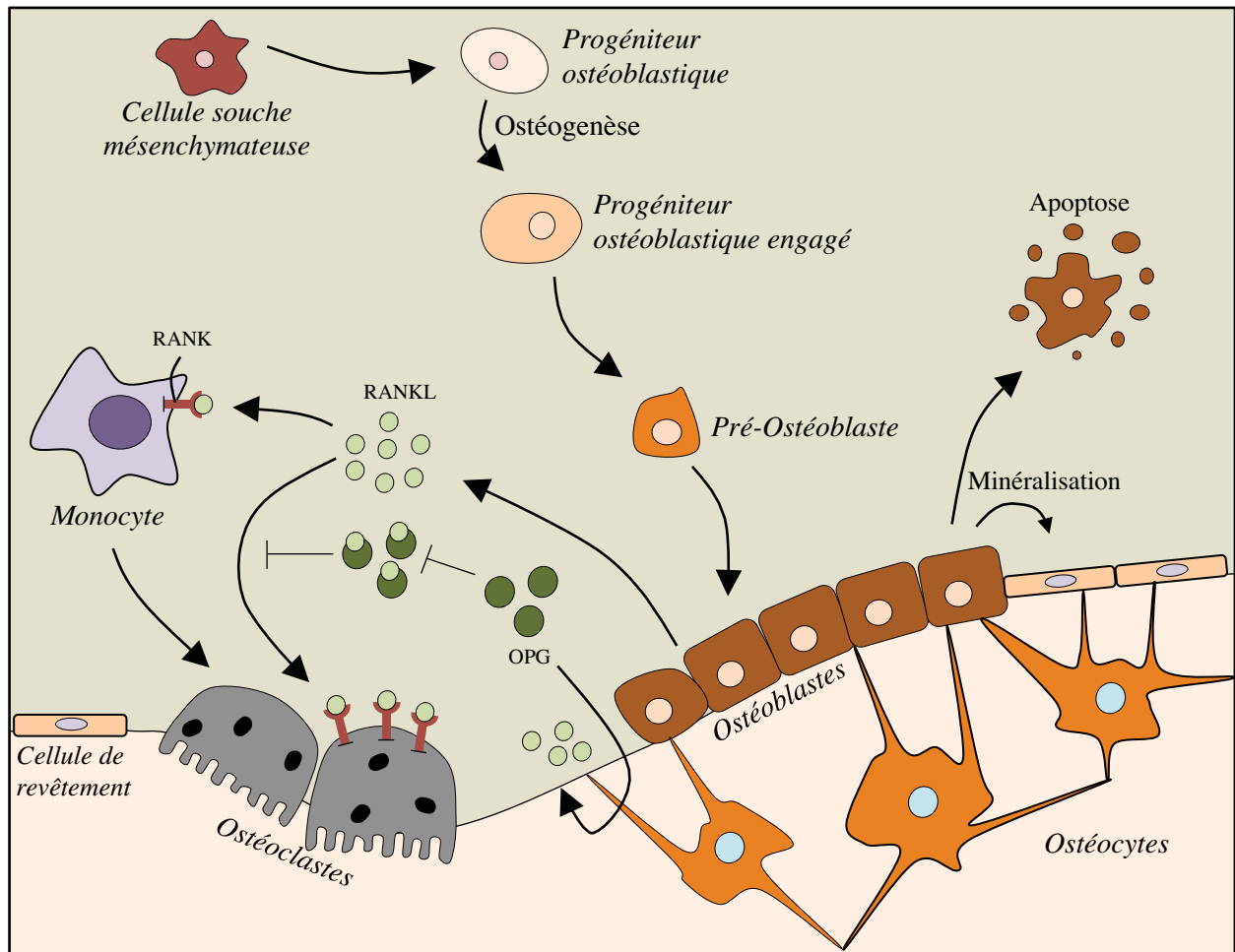


Figure 28 : L'homéostasie osseuse, un équilibre entre activité ostéoclastique et ostéoblastique

Cette figure définit les deux composantes majeures de l'homéostasie du tissu osseux, représentées par les ostéoblastes (synthèse osseuse) et les ostéoclastes (dégradation osseuse). Le lien entre ces deux populations cellulaires est également illustré : les ostéoblastes produisent le ligand RANK, qui en retour stimule l'ostéoclastogenèse. De manière concomitante, les ostéoblastes synthétisent de l'OPG (*Osteoprotegerin*), se liant compétitivement à RANKL afin de renforcer la diminution de l'ostéoclastogenèse. La balance OPG/RANKL est cruciale dans l'équilibre du tissu osseux. Réalisé d'après Lian et al., 2012.

différentes fractions cellulaires offrent un micro-environnement propice et fertile vis-à-vis de la cellule tumorale (Virk and Lieberman, 2007) (**Figure 28**).

Les métastases osseuses issues du cancer de la prostate conduisent invariablement à une dérégulation de la balance entre formation et résorption tissulaire, aboutissant à des lésions de types ostéoblastiques ou ostéolytiques (Ibrahim et al., 2010). Les lésions ostéolytiques sont préférentiellement causées par une stimulation de la différenciation des ostéoclastes et de leur activité, plutôt que par des actions directes des cellules tumorales sur le squelette. Ce processus de résorption est un prérequis pour l'établissement de la tumeur au sein de la structure minéralisée et confinée de l'os (Goltzman, 2001). Les lésions ostéoblastiques sont quant à elles caractérisées par une minéralisation osseuse importante et adjacente à la métastase, et rapportées dans la plupart des cas lors de la dissémination du cancer de la prostate (Logothetis and Lin, 2005). Cependant, beaucoup de patients présentent également des composantes ostéolytiques lors de l'analyse des lésions osseuses (Logothetis and Lin, 2005). Les mécanismes régulant le développement de la métastase osseuse sont donc complexes et impliquent des interactions coopératives entre les cellules tumorales, les ostéoblastes, les ostéoclastes et la matrice osseuse minéralisée.

B) Carcinogénèse prostatique et chémo-attraction osseuse

Des expériences basées sur des modèles de xénogreffes ont déjà démontré la prédisposition des cellules tumorales prostatiques à s'intégrer au tissu osseux (Tsingotjidou et al., 2001). De plus, des extraits d'os sont capables de favoriser le chimiotactisme et l'invasion de lignées tumorales prostatiques telles que les PC-3 et les DU-145, tandis que les extraits provenant d'autres organes ne présentent aucun effet (Jacob et al., 1999). Ces données suggèrent que les os contiennent des facteurs chimiotactiques attirant la cellule tumorale. L'expression de deux de ces facteurs, CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) et SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*), est augmentée dans différentes lignées tumorales prostatiques et dans les métastases osseuses (Arya et al., 2004). Des travaux suggèrent l'implication de ces acteurs lors de l'implantation de la cellule tumorale, puisque les cellules prostatiques localisées au niveau osseux expriment CXCR4 et migrent préférentiellement selon un gradient de SDF-1 *in vitro* (Taichman et al., 2002; Hirbe et al., 2010). Ces observations sont corrélées à une étude *in vivo* démontrant que l'injection d'anticorps neutralisants contre CXCR4 réduit l'apparition des métastases osseuses après des injections intra-cardiaques et intra-tibiales de PC-3 chez des souris immunodéprimées (Sun et al., 2005). Cependant, l'expression de CXCR4 seule n'est pas suffisante pour promouvoir la métastase osseuse.

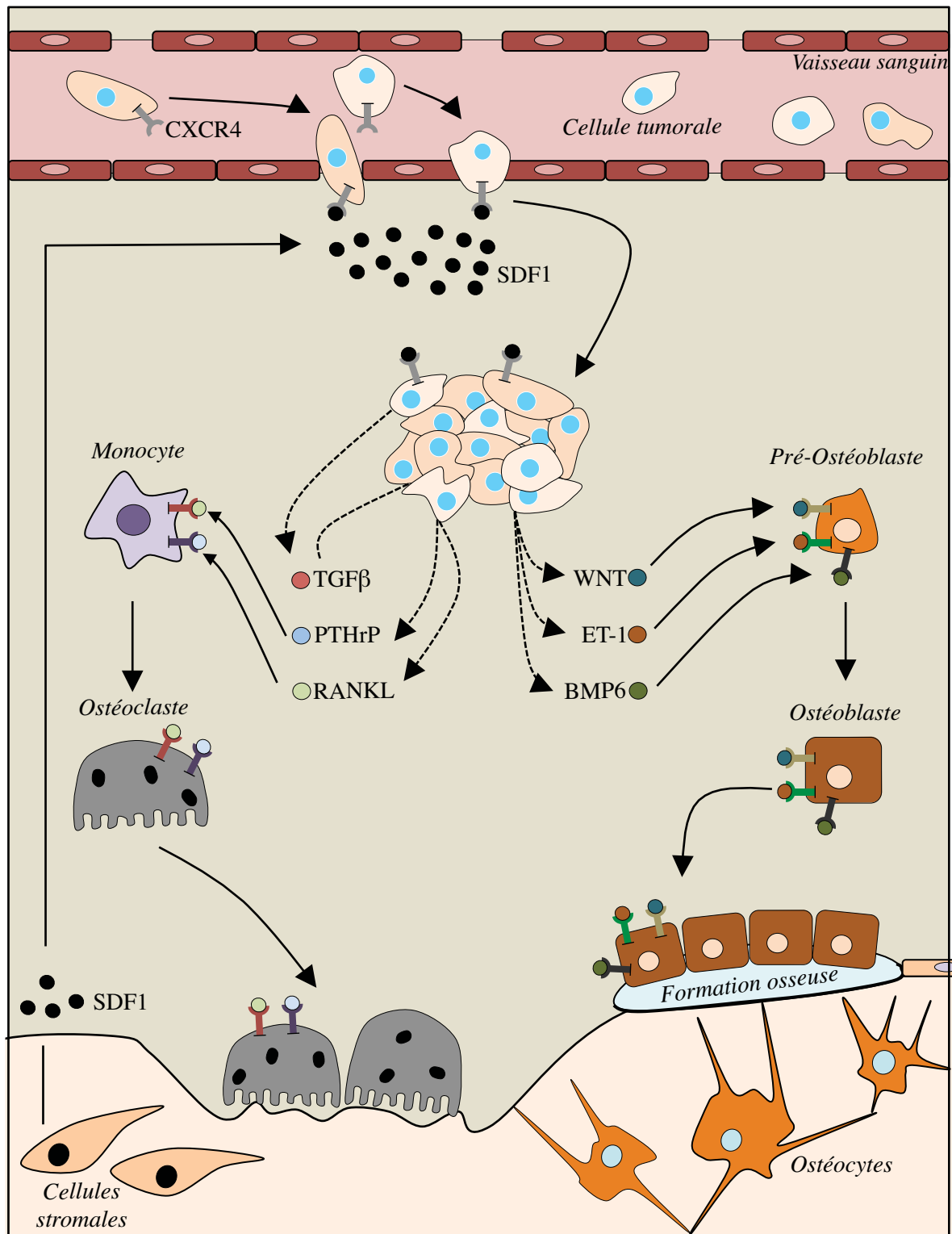


Figure 29 : Cellule tumorale prostatique et tropisme osseux

Les capillaires osseux, appelés sinusoides, sont tapissés d'un endothélium fenêtré relativement permissif au passage des cellules tumorales. Cependant, certaines chimiokines peuvent faciliter le ciblage et l'extravasation de la cellule vers le site à coloniser. C'est le cas de la chimiokine SDF1, diffusée sous forme de gradient à partir des cellules du stroma osseux et se liant au récepteur CXCR4 exprimé par les cellules tumorales prostatiques. Par l'intermédiaire d'un panel de molécules sécrétées, la tumeur est capable de moduler l'ostéogenèse (TGF β , PTHrP, RANKL) et l'ostéolyse (WNT, ET-1, BMP6) pour favoriser son nichage au sein du tissu.

Quand Hart *et al.* ont utilisé des antagonistes peptidiques de CXCR4, l'invasion des cellules tumorales prostatiques au niveau de la barrière endothéliale de la moelle osseuse n'était pas complètement inhibée, suggérant que l'axe CXCR4/SDF-1 ne constitue pas le seul facteur chimiotactique gouvernant la métastase osseuse (Hart et al., 2005) (**Figure 29**). D'autres acteurs, tels que l'EGF ou l'IGF ont également été impliqués dans l'augmentation de la chémo-invasion des cellules tumorales prostatiques (Arya et al., 2006). En plus de ces molécules, les tissus osseux nouvellement formés contiennent des protéines de la matrice extracellulaire tels que le collagène de type I, l'Ostéopontine, l'Ostéonectine ou les sialoprotéines osseuses, qui agissent également en tant que chémo-attractants (Jacob et al., 1999; Stewart et al., 2004). L'Ostéopontine (OPN) est une phosphoprotéine glycosylée sécrétée qui interagit notamment avec les intégrines et constitue 2 % des protéines non collagéniques de la matrice osseuse. Elle exerce des effets pléiotropes sur la migration et la survie cellulaires, l'inhibition de la calcification et l'immunité. Sa fonction principale est impliquée dans la régulation de la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse ainsi que dans l'adhésion des ostéoclastes à l'os, entraînant une résorption de ce dernier (Gerstenfeld, 1999; Sodek et al., 2000; Denhardt et al., 2001). L'Ostéopontine est fortement associée à la dissémination du cancer de la prostate. Une corrélation importante entre l'agressivité, le stade métastatique de la maladie et l'expression de l'OPN est observée, même si les liens moléculaires sous-jacents ne sont que partiellement caractérisés (Coppola et al., 2004). Sa surexpression dans des PC-3 et des LNCaP confère par exemple un avantage prolifératif aux cellules et favorise leurs capacités invasives *in vitro* (Angelucci et al., 2002). *In vivo*, une telle surexpression promeut la capacité des LNCaP à envahir des membranes chorioallantoïques d'embryons de poulet (Khodavirdi et al., 2006).

C) Régulation de l'homéostasie osseuse par la cellule tumorale prostatique

(1) Régulation de l'activité ostéoblastique

Un des mécanismes par lesquels la cellule tumorale peut induire des lésions ostéoblastiques repose sur la sécrétion de facteurs spécifiques, incluant l'Endothéline-1, les BMPs et la voie WNT, favorisant la croissance des ostéoblastes et de la tumeur prostatique au niveau osseux (**Figure 29**).

Nelson *et al.* ont été les premiers à proposer l'association de ET-1 (*Endothelin-1*), un peptide vasoconstricteur, avec les métastases ostéoblastiques issues du cancer de la prostate et ont démontré qu'une expression exogène de ET-1 favorisait la prolifération des cellules tumorales prostatiques (Nelson et al., 2003). De plus, le niveau de ET-1 plasmatique chez les

patients est corrélé à la présence de métastases osseuses (Nelson et al., 1995). L'administration d'un antagoniste du récepteur à ET-1 inhibe le développement des réponses ostéoblastiques dans un grand nombre de modèles biologiques (Russo et al., 2010). Cette protéine est ainsi impliquée dans les processus de transport de phosphates, importants dans l'initiation de la calcification de la matrice osseuse, et contribue également à la prolifération des ostéoblastes et à l'inhibition de la motilité ostéoclastique (Chiao et al., 2000; Guise et al., 2003; Clines et al., 2007).

Lors de la dissémination de la tumeur prostatique dans l'os, la protéine WNT est produite par la cellule tumorale et stimule la différenciation ostéoblastique (Hall et al., 2006). L'expression de DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*), un antagoniste de la voie WNT, est également diminuée dans les métastases osseuses (Hall et al., 2008). De plus, l'inhibition de DKK1 dans le modèle ostéolytique PC-3 stimule leur activité ostéoblastique (Hall et al., 2005). Ces résultats suggèrent que DKK1 pourrait constituer un des « switches » moléculaires gouvernant le devenir ostéoblastique de la métastase dans les stades tardifs de la dissémination.

Les BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) appartiennent à la superfamille du TGF β et sont impliquées dans l'activation de la migration des cellules tumorales. Différentes études indiquent que les BMPs constituent des facteurs importants impliqués dans l'initiation de la différenciation ostéoblastique *in vitro* et *in vivo* (Gori et al., 1999; Abe et al., 2000). L'injection d'anticorps neutralisants contre BMP6 est par exemple capable de réduire le nombre d'ostéoblastes et la croissance tumorale lors de xénogreffes de cellules tumorales prostatiques dans des souris immunodéprimées (Dai et al., 2005). Cette implication est confirmée par l'expression de Noggin (un antagoniste des BMPs) dans des cellules LAPC-9 (cellules ostéoblastiques prostatiques), qui induit le développement de métastases osseuses ostéolytiques lors de greffes intra-tibiales chez la souris (Feeley et al., 2005).

(2) Régulation de l'activité ostéoclastique

La cellule tumorale prostatique produit également des cytokines et des facteurs de croissance activant la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse. Lors de la carcinogenèse, RANKL, la PTHrP et le TGF β constituent des facteurs ostéolytiques importants contribuant à cette résorption osseuse (**Figure 29**).

En plus des différents facteurs activant les ostéoclastes, la cellule tumorale prostatique est capable de sécréter RANKL (*Receptor activator of nuclear factor κ -B ligand*), une protéine normalement produite par les ostéoblastes et appartenant à la superfamille du TNF

(*Tumor necrosis factor*). Sa liaison à RANK (*Receptor activator of the nuclear factor κ -B*) sur la surface des ostéoclastes active la tyrosine kinase TAK1 (*TGF-beta-activated kinase-1*), induisant NF κ B et la transcription de gènes impliqués dans la maturation ostéoclastique (Huang et al., 2002b; Boyle et al., 2003; Zhang et al., 2003). Ce processus est inhibé par l'Ostéoprotégérine (OPG) produite par les ostéoblastes, qui constitue un récepteur contenant seulement le domaine extracellulaire de RANK (Boyle et al., 2003). Des travaux utilisant l'OPG afin de bloquer l'axe RANK/RANKL montrent ainsi une diminution de l'ostéoclastogenèse et l'augmentation de l'apoptose au sein de cette population cellulaire (Zhang et al., 2001). Cependant, les effets inhibiteurs de l'OPG sur la croissance tumorale contrastent avec l'effet protecteur qu'elle confère aux cellules tumorales prostatiques vis-à-vis de l'apoptose (Holen et al., 2002). Une autre approche est de bloquer l'axe en utilisant un antagoniste de RANKL, RANK-Fc. Ainsi dans une étude *in vivo*, des cellules tumorales prostatiques implantées chez la souris présentent-elles une capacité moindre à réaliser des lésions ostéolytiques en présence de RANK-Fc (Zhang et al., 2003).

La PTHrP (*Parathyroid hormone related protein*) est un homologue de l'hormone parathyroïdienne et contribue aux métastases ostéolytiques en induisant l'expression de RANKL et en inhibant la production de l'Ostéoprotégérine (Liao et al., 2008). Lors de la carcinogenèse prostatique, la PTHrP favorise l'ostéoclastogenèse *in vitro* et *in vivo* (Liao et al., 2008). Chez les patients, le niveau de PTHrP circulant est corrélé à la présence de métastases ostéoblastiques, suggérant son implication dans ce processus également (Liao and McCauley, 2006). De plus, la PTHrP peut être clivée par le PSA, entraînant une diminution de la résorption osseuse et une augmentation de la réponse ostéoblastique. Ces données suggèrent que la dégradation de la PTHrP pourrait induire une transition entre les processus ostéoclastiques et ostéoblastiques lors de la tumorigenèse prostatique (Cramer et al., 1996; Iwamura et al., 1996).

Le TGF β joue un rôle de suppresseur de tumeur important dans la cellule épithéliale normale et subit de nombreuses dérégulations lors de la carcinogenèse. De manière intéressante, il est capable de réguler le développement osseux et sa résorption en activant l'expression de la PTHrP et de RANKL au sein de la cellule tumorale (Yin et al., 1999; Yasui et al., 2011). La dernière évidence reliant la voie du TGF β à la dissémination osseuse du cancer de la prostate est issue d'expériences réalisées à l'aide d'inhibiteurs naturels de la voie. Ainsi, BMP7 inhibe les métastases ostéolytiques dans un modèle de xénogreffe intra-tibiale de PC3. Cependant, BMP7 n'empêche pas le développement des cellules lorsqu'il est inoculé

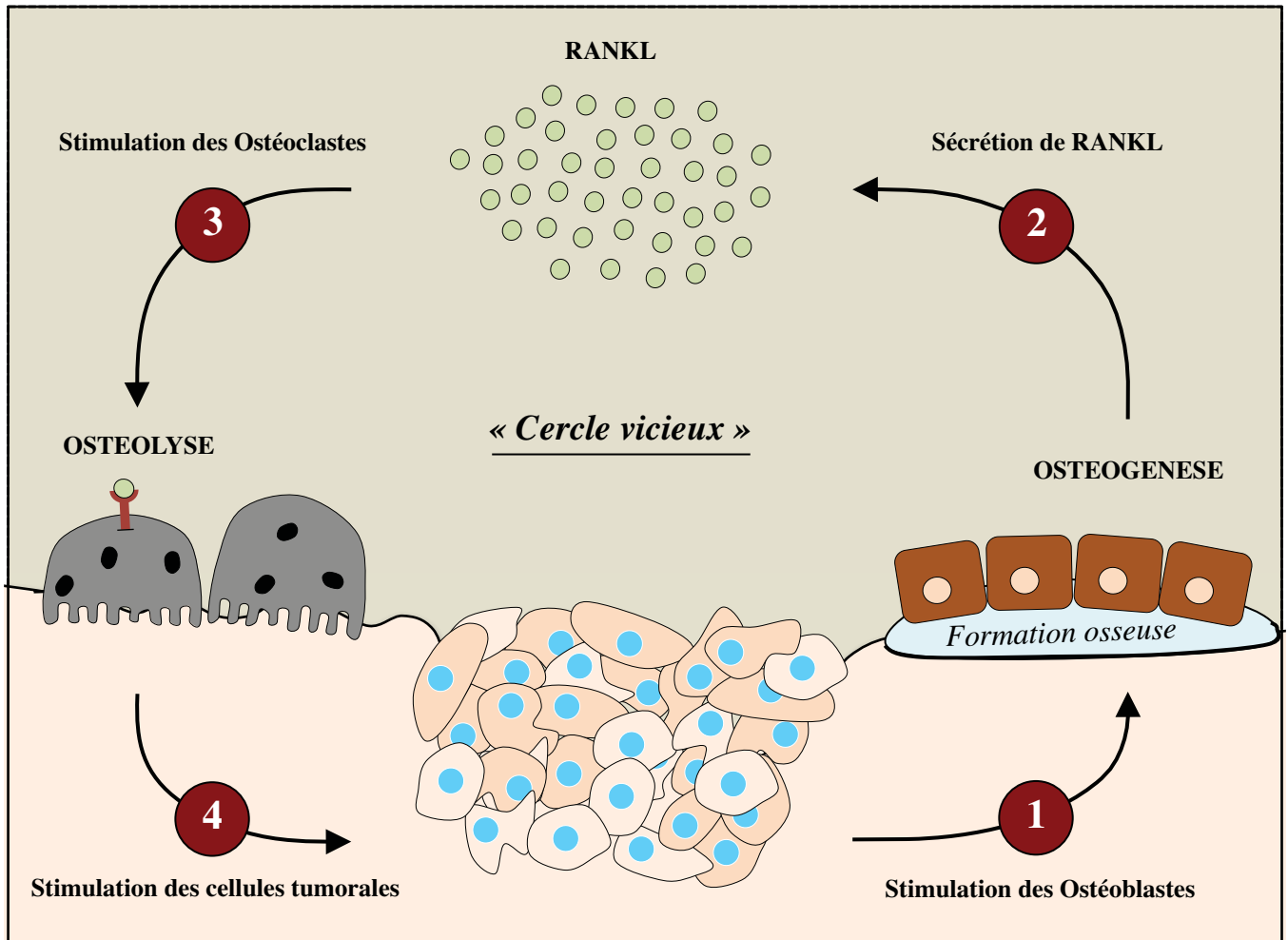


Figure 30 : Cercle vicieux du remodelage osseux par la cellule tumorale prostatique

Les cellules tumorales produisent des facteurs stimulant l'activité des ostéoblastes et la sécrétion de RANKL par ces derniers. L'accumulation de RANKL favorise en retour l'augmentation de la différenciation des ostéoclastes, leur survie et leur activité. Ce processus clé entraîne la résorption osseuse et le relargage de facteurs de croissance qui favorisent l'activité des cellules tumorales et crée alors un cercle vicieux entretenant l'activité ostéoblastique et ostéoclastique.

intraprostatiquement chez des souris immunodéprimées, suggérant un effet *in situ* dans l'os (Yin et al., 1999; Yasui et al., 2011).

De nombreux facteurs de la cascade métastatique ont été reliés à la nature du tropisme osseux caractérisant les cellules tumorales prostatiques. Cependant, il semblerait que ces acteurs puissent être partiellement redondants, et les processus pourraient alors travailler de concert pour promouvoir le développement de la métastase osseuse. De plus, il est important de noter que la cellule tumorale n'est pas cantonnée à un seul processus de remodelage osseux et peut, par l'intermédiaire des facteurs sécrétés définis précédemment, alterner entre des phases d'induction de l'ostéogenèse ou de l'ostéolyse afin d'établir au mieux sa « niche » métastatique (**Figure 30**).

4) Développement du cancer résistant à la castration (CRPC)

A) Résistance à la castration et activité de la signalisation androgénique

Lorsque l'apparition de métastases est détectée chez les patients, l'hormonothérapie est mise en place afin de limiter la dissémination de la tumeur. A cette étape de la maladie, la cellule tumorale prostatique est dite hormono-dépendante. Ainsi, la privation androgénique se manifeste par une apoptose cellulaire rapide dans la prostate tumorale et une régression de la colonisation des métastases au niveau des sites primaires et secondaires. Cependant, un phénomène de résistance à la castration entraîne une croissance de la tumeur incontrôlable par cette thérapie.

Comme décrit précédemment dans l'épithélium prostatique normal, AR (*Androgen receptor*) régule la prolifération cellulaire et l'apoptose, effets notamment illustrés lors d'une délétion conditionnelle du récepteur des androgènes dans l'épithélium murin (Wu et al., 2007). Les auteurs montrent ainsi que les souris mutantes pour AR dans l'épithélium mature développent un compartiment tissulaire moins différencié et prolifératif en comparaison de souris sauvages. De plus, ils observent une diminution de marqueurs prostatiques caractéristiques tels que la probasine ou NKX3.1, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules luminales prostatiques, et finalement une invagination glandulaire. Un croisement de cette lignée avec des souris T857A (AR constitutivement actif au sein de l'épithélium prostatique) permet de restaurer les fonctions et caractéristiques moléculaires de la glande prostatique. Ainsi ces données montrent-elles que AR, au niveau de l'épithélium prostatique mature, joue un rôle dans la croissance prostatique en inhibant la prolifération et la différenciation cellulaires.

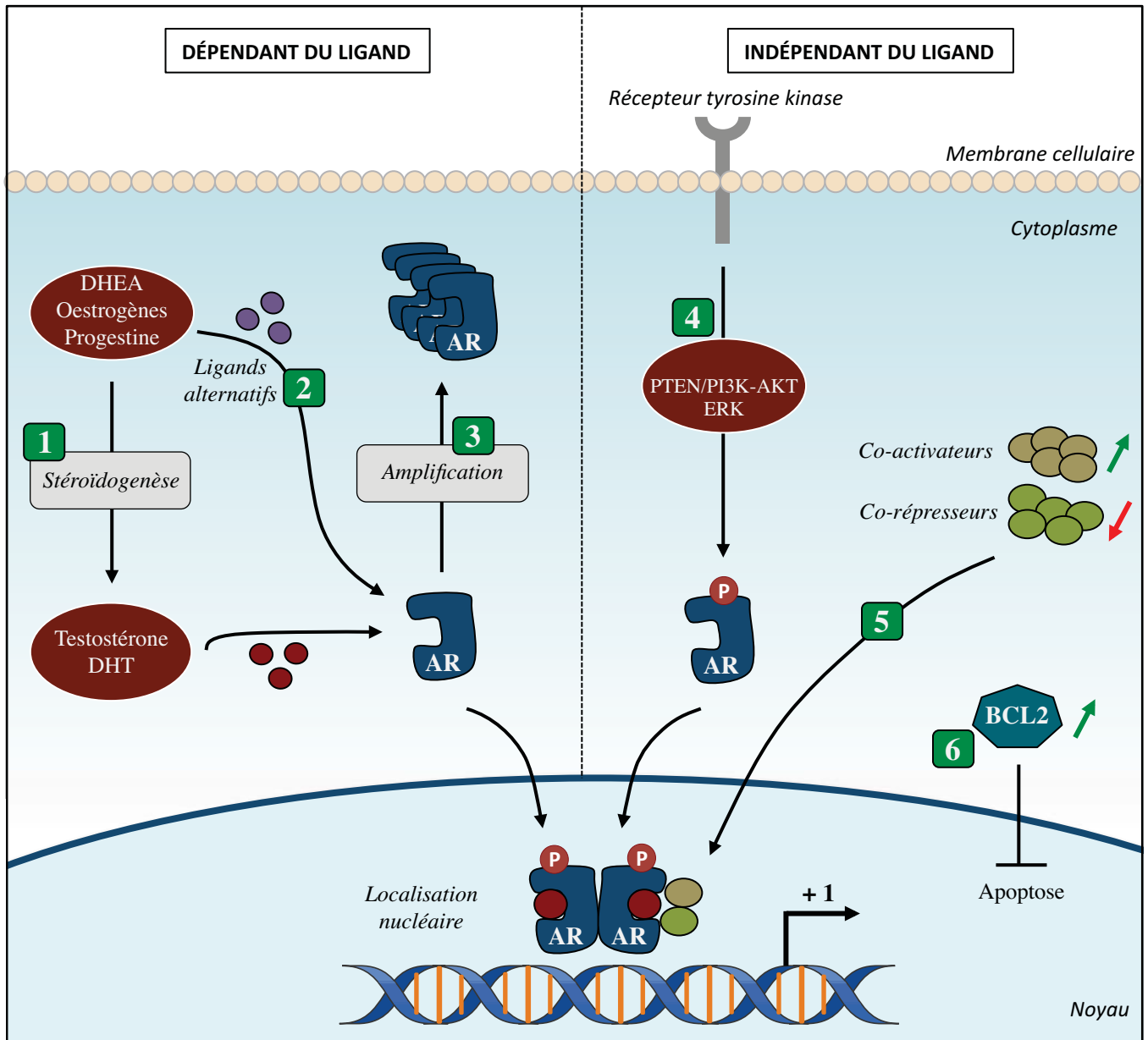


Figure 31 : Mécanismes conduisant à l'émergence du cancer de la prostate résistant à la castration

Cette figure résume les mécanismes démontrés et hypothétiques impliqués dans le développement du CRPC (*Castration resistant prostate cancer*), divisés en deux catégories principales : les voies ligand-dépendantes et ligand-indépendantes. (1) La stéroïdogénèse *in situ* au sein de la cellule tumorale contribue à la synthèse de testostérone et de DHT, pouvant potentiellement conduire à une persistance du niveau d'androgènes tissulaires après l'hormonothérapie. (2) Les mutations au niveau du récepteur permettent son activation par des ligands alternatifs ou augmentent son affinité pour les androgènes. (3) L'amplification de AR favorise son abondance au sein de la cellule. (4) Une activation ligand-indépendante du récepteur notamment *via* un crosstalk avec d'autres voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT (phosphorylation activatrice de AR) aboutit à une hypersensibilité et une translocation nucléaire accrue. (5) Un changement dans la balance co-activateurs/co-répresseurs module l'activité de AR. (6) Des voies de « bypass » fonctionnent indépendamment de AR *via* la régulation de molécules telles que BCL2. Réalisé d'après Harris et al., 2009.

Lors de la carcinogenèse prostatique cependant, le rôle du récepteur des androgènes est plus ambigu, puisqu'il présente une dualité de fonctions. En effet, AR inhibe la prolifération des cellules prostatiques basales, mais promeut la survie des cellules luminales et le processus métastatique (Niu et al., 2008a). Ainsi dans cette analyse, les auteurs utilisent-ils deux lignées transgéniques différentes : un modèle de carcinogenèse prostatique TRAMP (expression de l'antigène T du virus SV40) invalidé pour *Ar* au niveau de l'épithélium et du stroma, ainsi qu'un second modèle TRAMP uniquement invalidé au niveau de l'épithélium. La perte de AR dans les deux compartiments conduit au développement de tumeurs primaires peu étendues, et à des cellules tumorales aux capacités prolifératives restreintes. Au contraire, l'invalidation de AR uniquement dans l'épithélium aboutit à l'apparition de tumeurs plus développées et très proliférantes. Cette étude différentielle suggère alors que l'expression stromale de AR pourrait être impliquée de manière prédominante dans la promotion tumorale. Les auteurs ont également réalisé des expériences de recombinaisons tissulaires à l'aide de cellules prostatiques stromales humaines associées à des cellules tumorales épithéliales prostatiques. Ils ont ainsi démontré que AR fonctionnerait comme un acteur anti-tumoral dans la cellule épithéliale, tandis que sa fonction stromale favoriserait la croissance tumorale (Niu et al., 2008b). Globalement, l'efficacité de l'inhibition de la signalisation androgénique dans le cadre du cancer hormono-sensible souligne une action pro-tumorale de AR. Nous verrons par la suite que la signalisation androgénique peut en effet être impliquée dans différents processus pro-métastatiques.

Lors de la progression de la tumeur vers un stade de CRPC, l'activation de AR et de la signalisation androgénique demeurent, et ceci malgré les différentes thérapies de privations réalisées. En effet, des données indiquent que les tumeurs résistantes à la castration expriment *AR* ainsi que des gènes cibles de la voie, tels que le *PSA* (Gregory et al., 1998). En lien, des expériences montrent que des xénogreffes sélectionnées pour leur résistance à la castration diffèrent des lignées parentales dépendantes des androgènes par une surexpression de AR (Chen et al., 2004). L'identification des mécanismes aboutissant à une activation constitutive de la signalisation androgénique lors du CRPC semble donc fondamentale afin d'améliorer les approches basées sur les thérapies hormonales.

B) Mécanismes de l'activation constitutive de AR au sein du CRPC

Différents mécanismes moléculaires ont été décrits pour expliquer l'activité de la voie androgénique malgré la castration (**Figure 31**). Ces mécanismes incluent une amplification génique de AR dans approximativement un tiers des CRPC (Linja et al., 2001). 20 à 30 % des

tumeurs présentent quant à elles des mutations « gain de fonction » du récepteur. Ces altérations concernent majoritairement le domaine de liaison du ligand et entraînent par exemple une augmentation de sa stabilité protéique, une meilleure sensibilité aux androgènes, une réponse à de nouveaux dérivés stéroïdiens, une activation indépendante du ligand, ou encore une augmentation du recrutement des co-activateurs (Taplin et al., 1995; Zhao et al., 2000; Robzyk et al., 2007; Brooke et al., 2008; Steinkamp et al., 2009). L'exemple typique est la mutation AR-T877A, une mutation faux-sens identifiée dans la lignée tumorale prostatique LNCaP. Localisée dans le domaine de liaison du ligand, elle confère à AR une activation possible par la progestérone, les oestrogènes ou encore les androgènes surrénaliens (Han et al., 2005). De plus, des études plus récentes mettent en évidence l'expression d'isoformes alternatives de AR constitutivement actives lors de l'émergence du CRPC. Dans le cas de la lignée tumorale 22Rv1, 3 isoformes de AR sont exprimées : une contenant une duplication de l'exon 3 et deux autres sans domaines carboxy-terminaux. Fonctionnellement, ces isoformes sont constitutivement actives et permettent l'expression de gènes dépendants de la signalisation androgénique (Dehm et al., 2008). Un mécanisme original pour augmenter l'activité de la voie androgénique est l'expression endogène d'enzymes de synthèse des stéroïdes par le tissu tumoral (Montgomery et al., 2008a). Une activation de AR indépendante du ligand peut également avoir lieu *via* le recrutement des voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire. Ainsi, la suractivation de la voie PI3K/AKT après une délétion de *Pten* semble-t-elle particulièrement efficace dans ce processus puisque les souris présentent une résistance à la castration avant la formation des carcinomes (Gao et al., 2006). De plus, l'analyse de lignées cellulaires dépendantes des androgènes dans des expériences de recombinaisons tissulaires montrent que la résistance à la castration peut être induite en activant la voie PI3K/AKT, et synergiquement suractivée par la mobilisation de la voie des MAPK (Jiao et al., 2007). Des données indiquent que ces voies de signalisation favorisent l'activité de AR par un mécanisme de phosphorylation (Guo et al., 2006). La résistance à la castration peut être appuyée par les mécanismes pro-inflammatoires puisque la production d'IL-1 β par les macrophages infiltrant la tumeur prostatique entraîne par exemple une levée d'inhibition du complexe corépresseur de AR (Zhu et al., 2006). Finalement, le dernier postulat indique que l'androgéno-indépendance tumorale n'est pas un phénomène adaptatif mais qu'elle serait due à la sélection d'une population de cellules tumorales hormono-indépendantes et présentes dans l'épithélium prostatique avant le début du traitement hormonal (Wang et al., 2009). Pendant la privation, les cellules dépendantes des androgènes vont être éliminées alors que les cellules androgéno-indépendantes restées latentes vont

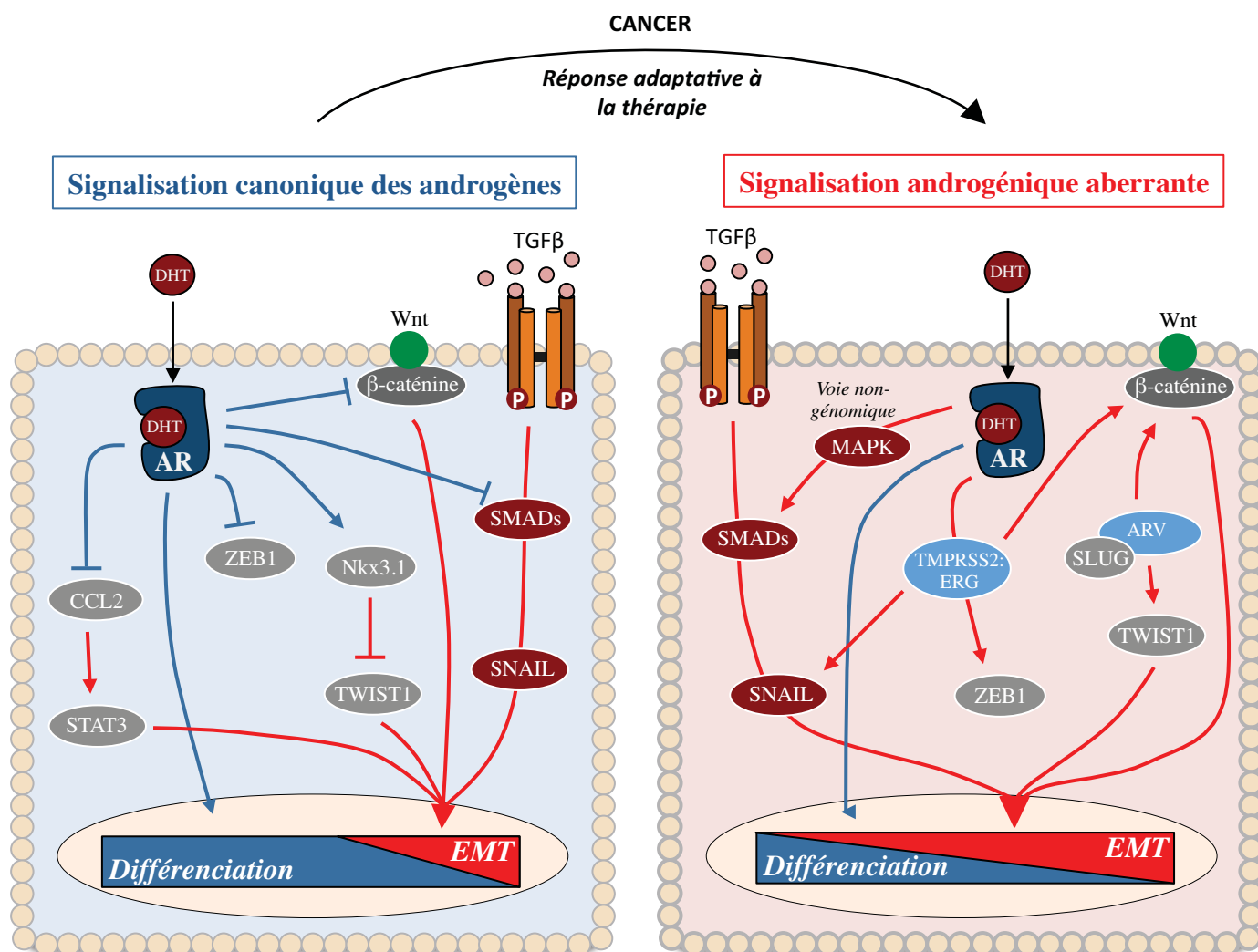


Figure 32 : Régulation croisée de la voie androgénique et du TGFβ sur le processus d'EMT

La cellule de gauche illustre les voies par lesquelles la signalisation canonique de AR peut inhiber le programme transcriptionnel régulant la mise en place de l'EMT. A l'inverse, la cellule de droite caractérise les mécanismes dépendant d'une signalisation aberrante des androgènes promouvant ce même programme. Certains de ces événements sont intrinsèques à AR (émergence de variants constitutivement actifs, ou ARV ; voie non-génomique), tandis que d'autres sont la conséquence de différents facteurs altérés lors de l'acquisition du phénotype résistant à la thérapie (TMPRSS2:ERG par exemple). Il est à noter que dans la majorité des cas, la voie canonique des androgènes demeure active dans le cancer et les cellules résistantes à la castration, mais est également perturbée dans les cellules épithéliales normales. L'équilibre entre le potentiel de différenciation et l'EMT est dérégulé dans la cellule tumorale, particulièrement à la suite d'une hormonothérapie. Ainsi, les voies présentées sur la cellule de gauche peuvent être enrichies dans les cellules normales, tandis que les voies de la cellule de droite sont enrichies dans les cellules tumorales en réponse à une pression sélective imposée par la thérapie. Enfin, la voie du TGFβ peut être en lien étroit avec la signalisation androgénique notamment par l'intermédiaire des SMADs, effecteurs des récepteurs au TGFβ. Réalisé d'après Das et al., 2014.

survivre et proliférer, et seront responsables de l'échappement hormonal.

C) CRPC et potentiel métastatique

Les études abordées précédemment indiquent un rôle de la signalisation androgénique dans la promotion et la progression de la carcinogenèse prostatique. La mise en place du CRPC est de plus associée à un mauvais pronostic de survie et au développement métastatique de la maladie. Des efforts sont donc entrepris pour identifier les fonctions par lesquelles le récepteur des androgènes facilite les processus de dissémination et/ou leur maintenance. Différentes analyses illustrent des implications de la signalisation androgénique dans la régulation d'acteurs pro- ou anti- métastatiques. Comme précédemment décrit, la dissémination métastatique est dépendante de l'EMT, du remodelage de la matrice extracellulaire, de la néo-vascularisation et de la migration cellulaire. Certains de ces processus, et notamment l'EMT qui sera développée dans cette partie, peuvent être dépendants de la signalisation androgénique (**Figure 32**).

L'inhibition de la voie NFκB au cours de la carcinogenèse prostatique chez la souris est associée à une diminution des processus d'angiogenèse, d'invasion et de dissémination métastatique (Huang et al., 2001). En parallèle, l'activation de cette voie dans les tumeurs primaires chez l'homme est hautement prédictive de l'apparition des métastases ganglionnaires (Lessard et al., 2006). Ainsi, la bibliographie indique que la signalisation androgénique est capable d'inhiber la voie NFκB. L'activation de AR entraîne par exemple une diminution de l'expression de RelA/p65, une sous-unité de NFκB, inhibant la localisation nucléaire du complexe et son activité transcriptionnelle (Nelius et al., 2007).

Les molécules d'adhésion telles que les cadhérines jouent un rôle fondamental dans l'activation de l'EMT, et plus précisément sur le changement caractérisé entre la diminution de l'expression de l'E-cadhérine et l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine (Tanaka et al., 2010). Ces deux acteurs semblent en lien avec la signalisation androgénique, puisqu'une privation hormonale entraîne une augmentation de la E-cadhérine lors de la carcinogenèse prostatique (Patriarca et al., 2003). De plus, un traitement androgénique *in vitro* sur la lignée cellulaire du cancer du sein MCF7 entraîne une diminution de la E-cadhérine, suggérant que les androgènes répriment l'expression de cette dernière. Ces données ont été confirmées par l'identification d'un élément de réponse au récepteur des androgènes (Liu et al., 2008). La cadhérine 11 est une molécule permettant l'adhésion ostéoblastique, son rôle est donc important dans le développement des métastases osseuses. L'augmentation de son expression est corrélée au développement du CRPC, suggérant une implication de la voie

androgénique dans la dissémination osseuse du cancer de la prostate (Chu et al., 2008; Lee et al., 2010). En effet, Lee *et al.* indiquent que des analyses immunohistochimiques sont caractérisées par une surexpression de la cadhérine 11 dans 85 % des tumeurs résistantes à la castration chez l'homme. Au contraire, seulement 14 % des tumeurs hormono-sensibles expriment la protéine. Dans des expériences de xénogreffes, la réalisation du protocole de castration est suivie d'une augmentation de l'expression de la cadhérine 11. Aucun élément de réponse au récepteur des androgènes n'a pu être identifié dans le promoteur de la protéine, suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation indirect.

La Maspine est un inhibiteur de sérine protéases qui présente des propriétés anti-tumorales. La perte de cette protéine est associée au développement d'une variété de tumeurs incluant le cancer de la prostate (Zou et al., 2002). Ainsi, sa ré-expression dans des lignées tumorales prostatiques inhibe-t-elle la croissance tumorale et la métastase osseuse lors de greffes orthotopiques (Cher et al., 2003). Une privation androgénique *in vitro* et *in vivo* induit l'expression de la Maspine, tandis que cette dernière est inhibée lors de traitements androgéniques. Ceci suggère un rôle de la protéine dans l'inhibition de la croissance tumorale lors d'une privation en androgènes. Des éléments de réponse au récepteur des androgènes ont été identifiés dans le promoteur de la Maspine, expliquant les régulations précédemment décrites (Zou et al., 2002; He et al., 2005).

Au niveau des cellules tumorales prostatiques, le facteur de transcription Twist est un indicateur des tumeurs de haut grade résistantes aux thérapies anti-cancéreuses, notamment en promouvant les capacités migratoires et invasives de la cellule et en jouant un rôle crucial dans les processus d'EMT (Yuen et al., 2007b). Un lien fonctionnel entre l'augmentation de l'expression de AR et de TWIST1 a été rapporté lors du développement du CRPC (Shiota et al., 2010). Dans l'étude, les auteurs montrent que TWIST1 est capable d'activer l'expression du récepteur *via* une liaison dans la région promotrice du gène *Ar*. Ainsi, l'inhibition de l'expression de TWIST1 altère la croissance de cellules LNCaP en induisant un arrêt du cycle cellulaire et en activant l'apoptose.

Ces quelques exemples montrent que l'EMT joue un rôle central dans le développement du CRPC. A l'inverse, certaines fonctions de la signalisation androgénique ne contrôlent pas uniquement le développement prostatique normal et la croissance tumorale, mais contribuent également à la dissémination métastatique en facilitant la mise en place des processus d'EMT, octroyant ainsi un avantage migratoire et agressif à la cellule tumorale. Les mécanismes d'EMT et la signalisation androgénique sont donc intimement liés.

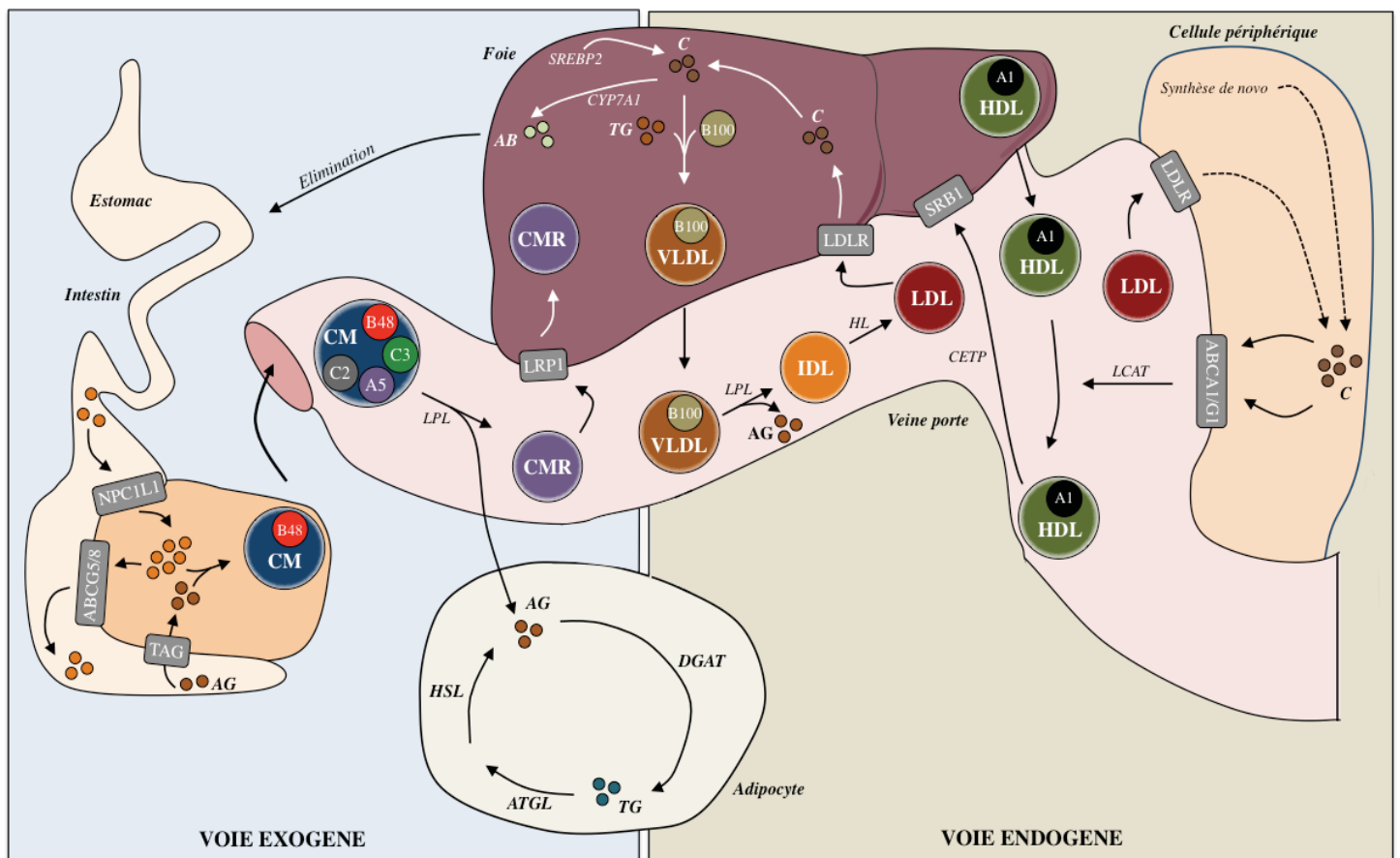


Figure 33 : Métabolisme des lipoprotéines durant le cycle entéro-hépatique

Les principales classes de lipoprotéines sont représentées par le cholestérol libre et estérifié (C), ainsi que les triglycérides (TG). Lors du métabolisme des TG, les acides gras hydrolysés pénètrent dans les entérocytes *via* des transporteurs spécifiques. Les TG reconstitués sont emballés avec du cholestérol dans des chylomicrons enrichis en apolipoprotéine de type B48 (APOB48) grâce à la protéine de transfert MTTP. Les chylomicrons sécrétés par le système lymphatique entrent alors dans la veine cave et interagissent avec la LPL (*Lipoprotein lipase*) : les acides gras libérés pénètrent dans les cellules périphériques. Dans les adipocytes, des enzymes incluant DGAT (*Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase*) synthétisent les TG qui seront hydrolysés par la TG lipase si nécessaire. Les chylomicrons restants (CMR) sont internalisés dans les hépatocytes *via* le LDLR (*LDL receptor*) ou LRP1 (*LDLR-related protein-1*). Les TG sont alors emballés avec le cholestérol et APOB100 dans les VLDL (*Very low-density lipoprotein*) qui retournent dans la circulation pour être hydrolysés par la LPL (*Lipoprotein lipase*), libérant des AG et les VLDL restants (IDL). Les IDL sont hydrolysés par la lipase hépatique (HL), aboutissant à la formation de LDL internalisés dans les hépatocytes par le LDLR. Concernant le métabolisme du cholestérol, les stérols pénètrent dans les entérocytes *via* NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*) tandis que d'autres sont excrétés dans la lumière intestinale par ABCG5/G8 (*ATP-binding cassette transporter*). Dans les entérocytes, le cholestérol est emballé avec les TG dans les chylomicrons. Au niveau hépatocytaire, ce dernier est recyclé, éliminé par le biais de la synthèse d'acides biliaires (notamment *via* CYP7A1), mais peut aussi être synthétisé *de novo* (l'HMG-CoA réductase étant l'enzyme limitante). Le cholestérol est internalisé dans les cellules périphériques par le LDLR et son transport inverse est initié par les cassettes de transport ABCA1 et ABCG1, aboutissant à la formation des HDL (*High density lipoprotein*) retournant au niveau hépatocytaire grâce au transporteur SRB1 (*Scavenger receptor classe B type I*).

III) RÉGULATION DU CHOLESTÉROL ET CANCER DE LA PROSTATE

1) Métabolisme du cholestérol

Chez les mammifères, deux voies principales permettent l'apport de cholestérol à la cellule : une source alimentaire et une synthèse *de novo*.

A) Cholestérol d'origine alimentaire

Le cholestérol alimentaire est acheminé dans un premier temps depuis l'intestin grêle vers le foie, le redistribuant ensuite vers les organes demandeurs. Pour les tissus distants, les entérocytes emballent le cholestérol dans des lipoprotéines qui rejoignent la circulation intestinale lymphatique et le sang (Müller et al., 2001) (**Figure 33**). Les protéines APOC-II (*Apolipoprotein C-II*) qu'elles contiennent permettent alors leur reconnaissance par la LPL (*Lipoprotein lipase*), hydrolysant les triglycérides. Les acides gras formés rejoignent les tissus sous-jacents, ou des structures de types HDL (*High Density Lipoprotein*), composées de phospholipides, de cholestérol et d'apolipoprotéines telles que APOC ou APOA (*Apolipoprotein C/A*). Les chylomicrons restants, enrichis notamment en APOB48 et APOE (*Apolipoprotein B48/E*), cholestérol et restes de triglycérides, sont pris en charge par les hépatocytes *via* leurs récepteurs aux APOE. Les hépatocytes synthétisent ensuite des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) qui sont impliquées dans le transport des triglycérides et des esters de cholestérol depuis le foie vers les tissus périphériques. Les VLDL sont dégradés au niveau plasmatique par la LPL (*Lipoprotein Lipase*), qui reconnaît APOC-II. Des structures enrichies en APOB100 (*Apolipoprotein B100*) et APOE se forment avec les triglycérides et esters de cholestérol restants : il s'agit des IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), ou β -VLDL hépatiques, pouvant être dégradées soit dans le foie après internalisation *via* la reconnaissance par les récepteurs B/E ou LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*), soit dans la circulation grâce à la lipase hépatique, ce qui permet la transformation des IDL en LDL (*Low Density Lipoprotein*). Ces LDL représentent la part de lipoprotéine la plus importante apportant le cholestérol aux tissus périphériques. Le captage des LDL se fait par une voie classique d'endocytose au niveau du récepteur aux LDL (LDLR) par reconnaissance d'APOB100 (Brown and Goldstein, 1976). L'ensemble LDL/LDLR est internalisé par endocytose *via* des vésicules contenant de la clathrine, puis transporté aux compartiments acides où les esters de cholestérol sont hydrolysés par la lipase acide (Brown and Goldstein, 1986). Le LDLR se dissocie des LDL au niveau de l'endosome précoce en raison du pH plus faible, puis il est recyclé au niveau de la membrane par des mécanismes vésiculaires dépendant des protéines G telles que RAB8 et RAB11 (Hölttä-Vuori et al., 2002 ;

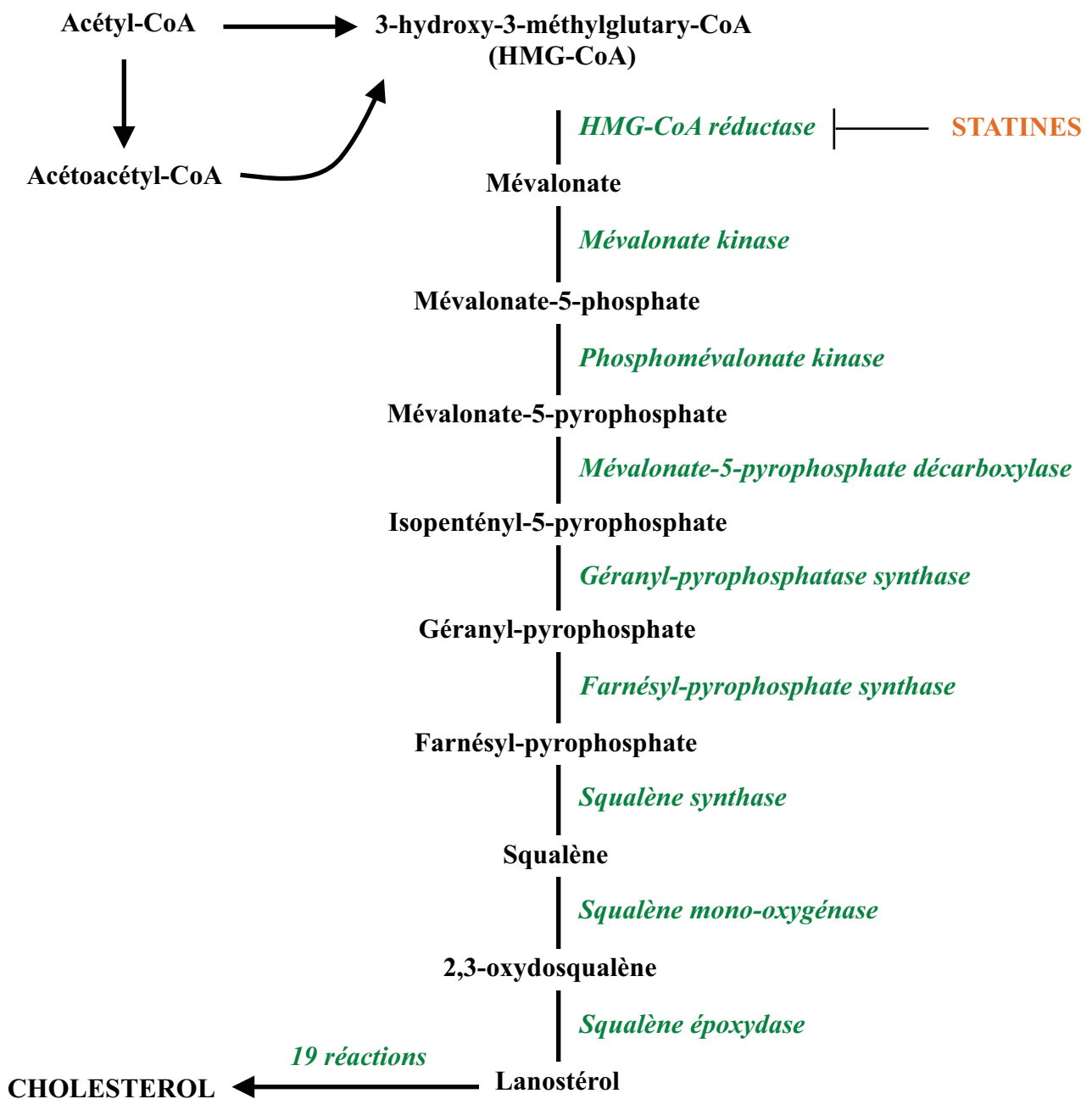


Figure 34 : Synthèse *de novo* du cholestérol

Représentation des différentes réactions de la voie du mévalonate avec les enzymes impliquées (en vert). Les statines inhibent la réaction enzymatique effectuée par la HMGCoA-réductase.

Linder et al., 2007). Le contenu non recyclé de l'endosome précoce, c'est-à-dire le cholestérol, est ensuite pris en charge par l'endosome tardif et redirigé vers d'autres membranes plasmiques, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Wang et al., 2010a).

B) Synthèse *de novo* du cholestérol

La quantité de cholestérol apportée par l'alimentation demeurant limitée, le reste du cholestérol nécessaire au bon fonctionnement de la cellule est fourni par la synthèse *de novo*. Presque toutes les cellules composant l'organisme disposent de la machinerie nécessaire à la synthèse de cholestérol. Le foie et les intestins, à eux seuls, réalisent 25 % de ce processus (Dietschy et al., 1993).

Le cholestérol est synthétisé dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le cytoplasme à partir de l'Acétyl-CoA (*Acétyl-Coenzyme A*) par la voie du mévalonate (Bloch, 1965; Goldstein and Brown, 1990) (**Figure 34**). L'enzyme limitante de cette voie est la HMG-CoA Réductase (*Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA Réductase*) qui catalyse la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate (cette étape est fréquemment ciblée par les traitements hypocholestérolémiants tels que les statines) (Rodwell et al., 1976; Jasińska et al., 2007). Dans les phases précoces de la synthèse, le squalène est converti en lanostérol, à partir duquel 19 étapes impliquant 9 enzymes différentes sont nécessaires pour obtenir le cholestérol. Les dernières étapes sont divisées en deux voies majeures qui peuvent utiliser le desmostérol ou le lathostérol (Kandutsch and Russell, 1960; Bloch, 1992). Ces précurseurs et le cholestérol synthétisé quittent alors le réticulum endoplasmique pour être ciblés à la membrane plasmique par deux protéines de transfert. Le cholestérol libre représentant une molécule toxique pour la cellule, il est converti en une forme estérifiée par les enzymes ACAT1 et ACAT2 (*Acyl-CoA acyltransférases*) (Chang et al., 1997), puis stocké dans des gouttelettes lipidiques. Il peut être mobilisé à tout moment par une *Cholesterol Ester Hydrolase* (CEH) (Brown and Goldstein, 1980).

C) Transport inverse et élimination du cholestérol

Éliminer le cholestérol est primordial pour la régulation de son homéostasie et éviter tout excédent intracellulaire. Il est donc transporté au niveau du foie pour être réutilisé ou excrété (Glomset and Norum, 1973) (**Figure 33**).

Le mécanisme de transport inverse du cholestérol depuis les tissus extra-hépatiques est initié notamment par inclusion dans des accepteurs extracellulaires majeurs : les HDL (*High Density Lipoprotein*), composés principalement de phospholipides, de cholestérol et

d'apolipoprotéines A (Oram and Yokoyama, 1996; Yokoyama, 1998). Ainsi, l'enzyme LCAT (*Lecithin-Cholesterol AcylTransferase*), retrouvée à la surface des HDL, converti le cholestérol libre en esters en transférant des acides gras de la phosphatidylcholine au cholestérol non estérifié (Jonas, 2000). Les esters de cholestérol sont alors séquestrés au sein des HDL et transportés au foie et aux tissus stéroïdogènes où ils sont importés par le récepteur SRB1 (*Scavenger Receptor Class B type I*) (Ji et al., 1997). Une grande partie des esters de cholestérol formés dans les HDL est également transférée aux TLR (*Triglyceride Rich Lipoprotein*) par la CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*). Les fractions restantes de TLR sont converties en LDL et éliminées par la voie du LDLR, directement au niveau du foie ou par excrétion dans la bile (Linsel-Nitschke and Tall, 2005). Au niveau hépatique, les deux transporteurs, ABCG5 et ABCG8, appartenant à la sous-famille G des *ATP-Binding Cassettes*, fonctionnent en hétérodimères pour permettre l'excrétion du cholestérol dans la bile (Dijkers et al., 2013).

Un autre mécanisme pour éliminer le cholestérol est dépendant en grande partie de APOA1, composé majeur des HDL, qui permet leur formation avec les phospholipides et le cholestérol (Oram and Yokoyama, 1996). Le transporteur ABCA1 (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1*) est à l'origine de la formation de ces HDL et correspond à la première étape du transport inverse du cholestérol (Tall et al., 2008). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'efflux de cholestérol dépendant de ABCA1. D'une part, des études ont suggéré un rôle des endosomes tardifs et des lysosomes dans le processus d'efflux, mais le mécanisme n'est pas encore élucidé (Haidar et al., 2006). D'autre part, APOA1 forme des complexes avec les phospholipides et le cholestérol au niveau de la membrane plasmique, ce qui est également dépendant de ABCA1 (Vaughan and Oram, 2003; Vedhachalam et al., 2007; Nandi et al., 2009) : une petite quantité d'APOA1 se lie à ABCA1, augmentant la translocation des phospholipides et donc la tension au sein de la membrane. Cette tension est atténuée grâce au repliement et à la création de domaines lipidiques exo-vésiculés qui permettent la liaison d'APOA1 (Vedhachalam et al., 2007). Alors qu'ABCA1 est le facteur prédominant pour l'efflux de cholestérol vers APOA1 et la formation des pré- β -HDL, d'autres facteurs tels que la LCAT et les transporteurs ABCG1 et ABCG4 sont nécessaires pour la maturation des HDL (Van der Velde, 2010). Il a été montré que l'hétérodimère ABCG1/ABCG4 agit de manière synergique sur l'efflux de cholestérol vers les HDL (Van der Velde, 2010).

2) Rôles biologiques fondamentaux du cholestérol

Les stérols jouent un rôle important dans la physiologie des organismes eucaryotes, spécialement en assurant la perméabilité et la fluidité membranaires. En raison de sa structure chimique, le cholestérol est attiré par les portions de chaînes d'acides gras présentent sur les phospholipides les plus proches. Au final, ceci permet à la membrane une meilleure immobilisation et une plus faible solubilité vis-à-vis des petites molécules. Sans cholestérol, la membrane cellulaire serait trop fluide et incapable de freiner le passage de molécules de petite taille. Le cholestérol promeut également l'intégrité membranaire puisqu'à des concentrations élevées, il sépare les phospholipides de telle sorte que les chaînes d'acides gras ne se rassemblent plus, créant alors une structure solidifiée. La fluidité membranaire est enfin une composante essentielle de la signalisation cellulaire : la membrane plasmique contient en effet des protéines telles que les canaux ioniques, les pompes ioniques ou des protéines initiant les cascades de signalisation intracellulaire. Par exemple, les radeaux lipidiques (*rafts*) ou DRM (*Detergent-Resistant Membrane domain*), sont des micro-domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides. Lorsque plusieurs *rafts* se regroupent pour former des domaines plus étendus, on parle de coalescence des *rafts*. Ce phénomène est important dans la régulation des voies de transduction intracellulaire (Hooper, 1999; Freeman and Solomon, 2004). En effet, la protéine AKT est par exemple phosphorylée de manière beaucoup plus efficace lors de cette coalescence, *via* le regroupement, dans une même géographie membranaire, des différents acteurs initiant la cascade. Le cholestérol, par l'intermédiaire de ces structures, constitue une plateforme de signalisation cellulaire. Chez les animaux, le cholestérol sert enfin de messenger dans la signalisation développementale en constituant un précurseur des stéroïdes, des acides biliaires ou encore de la vitamine D (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012).

3) Cholestérol et agressivité tumorale

A) Préambule

Depuis près d'un siècle, il est connu que le cholestérol est impliqué dans la prolifération des cellules animales (White, 1909), et que sa synthèse est étroitement synchronisée à la progression du cycle cellulaire (Pelton et al., 2012). Ainsi, les tumeurs solides sont caractérisées par une quantité anormalement importante de cholestérol (White, 1909; Swyer, 1942). Depuis ces observations, de nombreuses analyses ont associé l'élévation du cholestérol sanguin à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate, et plus particulièrement un cancer dit « de haut-grade » (Pelton et al., 2012). La hausse des

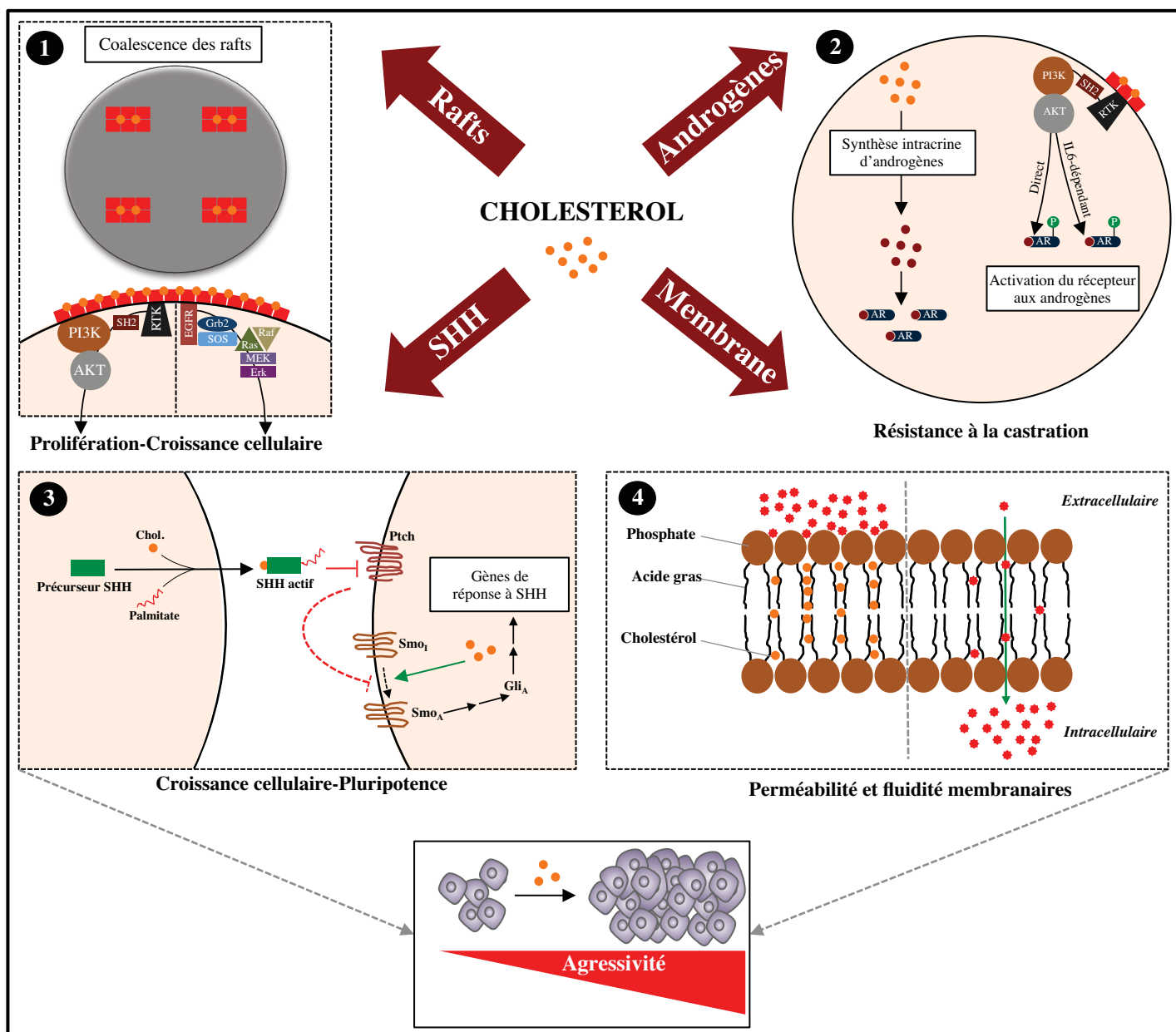


Figure 35 : Implication du cholestérol dans la carcinogenèse prostatique

Différents mécanismes moléculaires peuvent expliquer le lien croissant entre le cholestérol et la progression tumorale. **1** : Du fait de son implication dans la coalescence des radeaux lipidiques, le cholestérol est par exemple capable de stimuler des signalisations pro-prolifératives impliquées dans la croissance cellulaire telles que la voie PI3K/AKT et la voie de l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*). **2** : Le cholestérol constitue également un précurseur de la synthèse des androgènes et un activateur du récepteur des androgènes (phosphorylation « raft » dépendante), lui attribuant une fonction potentielle dans l'installation du cancer résistant à la castration (CRPC). **3** : De manière intéressante, le cholestérol représente un facteur clé dans la maturation du ligand et la transduction du signal au sein de la voie SHH (*Sonic hedgehog*), critique dans la pluripotence cellulaire et l'agressivité tumorale. **4** : Enfin, le cholestérol demeure un composant structural de la membrane cellulaire, régulant la perméabilité de cette dernière vis-à-vis des molécules extracellulaires et ainsi la communication de la cellule tumorale avec son micro-environnement.

taux de cholestérol circulant, en particulier les LDL, est en lien avec une augmentation de 60 % du risque d'adénocarcinome prostatique (Mondul et al., 2010; Shafique et al., 2012). Inversement, un faible taux circulant de LDL est corrélé à la diminution du développement d'une forme agressive de la maladie (Platz et al., 2009). De plus, l'utilisation de molécules visant à réduire les taux de cholestérol sur de longues périodes, comme les statines (inhibiteurs de la synthèse *de novo* du cholestérol), est associée à une diminution du risque de développer une forme agressive du cancer de la prostate (Graaf et al., 2004; Shannon et al., 2005). Il est important de noter que ces observations cliniques ont été soutenues par des résultats sur des modèles cellulaires humains et sur des lignées murines. En effet, l'addition de statines sur des lignées tumorales prostatiques inhibe par exemple la prolifération (Ukomadu and Dutta, 2003). De plus, des souris immunodéprimées xénogreffées avec des cellules tumorales prostatiques et traitées avec des statines présentent une diminution de la croissance tumorale par rapport à des souris non traitées (Alonso et al., 1998). Ces données obtenues *in vitro* et *ex vivo*, associées aux observations réalisées chez les patients, convergent vers un rôle pro-carcinogène du cholestérol, notamment dans le cas de l'adénocarcinome prostatique.

La perspective est alors de comprendre si et comment le cholestérol peut directement affecter la progression tumorale, et caractériser le cas échéant les mécanismes expliquant son enrichissement dans un tel contexte, ainsi que son action pro-tumorale.

B) Liens moléculaires entre le cholestérol et le cancer

Le cholestérol est donc impliqué dans une pluralité de fonctions biologiques et la dérégulation d'une de ces dernières pourrait offrir un contexte favorable à la tumorigenèse prostatique (**Figure 35**). Il est intéressant de souligner une nouvelle fois que les radeaux lipidiques peuvent être impliqués dans l'activation de voies pro-carcinogènes. De plus, le cholestérol sert de précurseur dans les voies développementales, fréquemment altérées dans le cadre de cancers. Finalement, une dérégulation du métabolisme du cholestérol, essentiel pour la synthèse des hormones stéroïdes, peut représenter un paramètre déterminant dans la progression du cancer prostatique, notamment vers le stade résistant à la castration.

(1) Cholestérol, radeaux lipidiques et cancer

Comme précédemment décrit, les radeaux lipidiques constituent des structures composées de glycosphingolipides et de cholestérol, l'ensemble organisé en microdomaines glycoprotéiques. La composition lipidique, *via* ces domaines, est capable non seulement

d'influencer la fluidité membranaire, mais également l'activité des protéines fixées à la membrane (Korade and Kenworthy, 2008). Deux types de radeaux lipidiques peuvent être impliqués dans la carcinogenèse. Les « Cer-rafts » représentent des zones enrichies en céramide, sphingomyéline, et protéines telles que FAS (ou APO-1, *Apoptosis antigen-1*), FASL (*FAS ligand*) et DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), dont le rôle principal est d'induire l'apoptose. Les « Chol-rafts », quant à eux, sont riches en cholestérol, sphingomyéline, gangliosides et protéines telles que la Cavéoline, CD44 et des membres de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. De manière intéressante, les « Chol-rafts » ont le potentiel de promouvoir la progression tumorale, l'angiogenèse et la dissémination métastatique (Patra, 2008). Dans les cellules tumorales prostatiques, le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) est par exemple plus actif et phosphorylé au sein des *rafts*, et la modulation des niveaux en cholestérol est associée à une variation de l'activité du récepteur (Zhuang et al., 2002; Freeman et al., 2007). La lignée tumorale prostatique LNCaP est caractérisée par une activation constitutive de la protéine AKT (PKB, *Protein Kinase B*). Dans ce cas également, son activation est directement liée à son état de phosphorylation au niveau des radeaux lipidiques, pour aller *in fine* induire l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire. Ainsi des souris immunodéficientes xénotreffées avec des LNCaP et nourries avec un régime riche en cholestérol présentent une progression tumorale accrue, contrairement à d'autres souris traitées avec des molécules hypocholestérolémiantes chez lesquelles l'inhibition de la croissance tumorale est directement liée à une diminution de la phosphorylation de AKT (Zhuang et al., 2005). Enfin, des souris TRAMP mimant la carcinogenèse prostatique nourries avec un régime riche en cholestérol développent une aggravation du phénotype tumoral (Llaverias et al., 2010), soit une augmentation du volume des tumeurs, de l'incidence et de l'apparition de métastases pulmonaires. Histologiquement, ces souris présentent une augmentation de la prolifération, de l'angiogenèse et de l'expression du récepteur aux HDLs SRB1 (*Scavenger receptor class B type I*).

(2) Cholestérol et promotion de la voie androgénique

Bien que 70 % des patients répondent à la thérapie de privation hormonale mise en place lors du traitement du cancer de la prostate, un échappement thérapeutique a lieu dans les 2 ou 3 ans suivants, aboutissant au développement de clones tumoraux résistants à la castration (Egan et al., 2014).

Pendant de nombreuses années il a été accepté que les tumeurs récurrentes réussissaient à survivre dans un environnement sans androgènes, comme attesté par les

mesures réalisées sur le sérum des patients. Désormais, la littérature montre que les niveaux en androgènes intra-tumoraux persistent, et ceci à des quantités suffisantes pour activer AR (Mostaghel and Nelson, 2008). La capacité des cellules tumorales prostatiques à synthétiser les androgènes lors du CRPC a ainsi été démontrée par la caractérisation de la surexpression des enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes, telles que CYP11A1 (*Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1*), CYP17A1 (*Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*), AKR1C1 (*Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C1*) ou encore SRD5A1 (*3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1*) (Montgomery et al., 2008a). Le précurseur commun des stéroïdes est le cholestérol. Comme décrit dans la partie précédente, le cholestérol est largement associé à la progression tumorale, et surtout enrichi dans les cancers, à l'instar du cancer de la prostate. Suite à la caractérisation de l'existence de la synthèse des androgènes dans la cellule tumorale prostatique, différents travaux ont eu pour but de savoir si le cholestérol pouvait avoir un lien spécifique avec l'émergence du CRPC. Ainsi, des données épidémiologiques récentes montrent que l'hypercholestérolémie est associée à une augmentation de la vitesse d'apparition du stade résistant à la castration (Jeon et al., 2016). De plus, l'utilisation de statines (inhibiteurs de la synthèse *de novo* du cholestérol) sur la lignée tumorale prostatique androgéno-résistante C4-2 entraîne une diminution de cibles androgéno-régulées telles que le PSA (Kim et al., 2014). Finalement, l'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol, le RO48-8071, inhibe la croissance de cellules prostatiques tumorales résistantes à la castration lors d'un protocole de xénogreffe dans des souris athymiques (Liang et al., 2016). Ainsi, une diminution du taux de cholestérol, ciblée directement dans la cellule tumorale altère la signalisation androgénique. Ces différentes informations, bien que principalement obtenues *in vitro*, suggèrent l'importance du métabolisme du cholestérol dans la cellule tumorale prostatique résistante à la castration.

(3) Cholestérol et promotion de la voie Hedgehog

Parmi les différentes voies développementales, la voie Hedgehog (Hh) est essentielle dans les processus de croissance cellulaire, de différenciation ou d'organogenèse lors de l'embryogenèse. Dans les tissus adultes, cette voie demeure impliquée dans le maintien d'une population de cellules indifférenciées nécessaire au renouvellement tissulaire (Varjosalo and Taipale, 2008). L'activation de la voie Hedgehog a été décrite lors de la progression tumorale, notamment lors de la carcinogenèse prostatique, et plus particulièrement dans les phases avancées de la maladie (Sanchez et al., 2004; Gonnissen et al., 2013; Xie et al., 2013). Cette activité est corrélée à une augmentation du score de Gleason et de la dissémination

métastatique (Sheng et al., 2004). De plus, un lien entre la voie SHH et l'androgéno-indépendance du cancer de la prostate est caractérisée (Azoulay et al., 2008; Efsthathiou et al., 2013; Ibuki et al., 2013).

Le cholestérol est capable de réguler la voie Hedgehog *via* une liaison covalente, caractérisant cette modification post-traductionnelle comme unique (Riobo, 2012). Après un clivage enzymatique, le fragment N-terminal du récepteur Hedgehog associé au cholestérol est alors palmitoylé, produisant une protéine hautement hydrophobe et active (Pepinsky et al., 1998). En plus de l'activation du récepteur Hedgehog, le cholestérol est nécessaire pour la transduction du signal. En effet, une inhibition pharmacologique de la synthèse de ce dernier entraîne un défaut de réponse de la voie à son ligand, de manière indépendante de la maturation du récepteur (Stottmann et al., 2011; Riobo, 2012). De plus, une augmentation des VLDL est associée à une meilleure survie des cellules endothéliales, extrêmement dépendantes de la signalisation Hedgehog (Queiroz et al., 2010) : cet élément suggère que la voie pourrait être fortement impliquée dans les processus angiogéniques.

C) Mécanismes d'enrichissement du cholestérol en contexte tumoral

L'implication du cholestérol et de ses intermédiaires dans la prolifération cellulaire et le devenir de la cellule tumorale est bien décrite, mais les mécanismes par lesquels les cellules et les tissus malins reprogramment la synthèse du cholestérol, son absorption et son efflux ne sont pas encore entièrement élucidés. Plusieurs pistes moléculaires ont été explorées afin d'expliquer son enrichissement lors de la tumorigenèse. L'homéostasie du cholestérol intracellulaire est dépendante de sa synthèse *de novo* et de sa capture. Ainsi, des données bibliographiques caractérisent une altération de ces deux composantes lors de la tumorigenèse.

L'inhibition de la HMGCR par des inhibiteurs spécifiques tels que les statines indiquent que la mobilisation de la voie du mévalonate est largement augmentée dans la cellule tumorale et nécessaire à sa survie (Mo and Elson, 2004; Clendening et al., 2010). Dans le but d'identifier les mécanismes sous-jacents, des études illustrent par exemple une abondance des précurseurs du mévalonate tels que l'Acétyl-CoA, et ceci suite à une augmentation de la glycolyse au sein de la cellule tumorale (Dang, 2012). L'expression de la HMGCR est également importante lors de la carcinogenèse. Ainsi dans le cancer du côlon, une accumulation des transcrits codant l'enzyme permet une augmentation marquée de la synthèse *de novo* du cholestérol (Caruso et al., 1999). La régulation transcriptionnelle de la HMGCR est en grande partie dépendante du facteur de transcription SREBP2 (*Sterol*

regulatory element-binding protein 2). Dans les lignées tumorales prostatiques PC3 et LNCaP, l'expression et l'activité de la HMGCR sont accrues suite à une activation constitutive de SREBP2 (Chen and Hughes-Fulford, 2001). En lien, l'administration de mévalonate à des souris immunodéficientes lors de xénogreffes favorise la croissance tumorale (Duncan et al., 2004). Ensemble, ces données valident l'importance de la régulation de la voie du mévalonate et de la synthèse *de novo* du cholestérol dans le métabolisme de la cellule tumorale.

On peut noter que la capacité de capture du cholestérol est également modifiée lors de la tumorigenèse. Lors de l'injection d'émulsions lipidiques radiomarquées à des patientes présentant un cancer du sein, la réalisation d'une mastectomie montre une quantité 4,5 fois plus importante de lipides dans le tissu tumoral en comparaison du tissu sain adjacent (Graziani et al., 2002). Cette observation a été expliquée par la perte des mécanismes de régulation du récepteur aux LDLs (LDLR, pour *Low density lipoprotein receptor*), et également mise en évidence dans différentes lignées tumorales prostatiques (Chen and Hughes-Fulford, 2001). Enfin, des données illustrent la surexpression de SRB1 (*Scavenger receptor class B type I*), un récepteur aux HDLs, dans les cellules tumorales. En effet, lors de la carcinogenèse prostatique, l'augmentation de l'expression de SRB1 est corrélée à une aggravation du score de Gleason (Schörghofer et al., 2015), suggérant que la cellule exploite également les HDLs afin de satisfaire ses besoins grandissant en cholestérol.

En conclusion, la littérature réalise désormais le lien entre l'augmentation de la biosynthèse et de l'import du cholestérol, et l'augmentation de l'agressivité tumorale. L'impact de ce dernier sur des processus tels que l'angiogenèse, la migration cellulaire, la synthèse des hormones stéroïdes ou encore la coalescence des radeaux lipidiques est également caractérisé. Cependant, les mécanismes initiateurs de l'augmentation des différentes composantes métaboliques qui aboutissent à son enrichissement sont moins décrits. De plus, la régulation de l'homéostasie du cholestérol en contexte pathologique pourrait être efficace. En effet l'inhibition de la voie du mévalonate, en utilisant notamment des statines, entraîne une diminution de la croissance et de la prolifération tumorales (Clendening et al., 2010), même si les bénéfices cliniques à long terme ne sont pas prouvés en raison d'effets secondaires indésirables touchant notamment le système nerveux (Thompson et al., 2016). Le ciblage du cholestérol en contexte tumoral représente donc une perspective grandissante. Pour cela, l'identification des différents acteurs métaboliques altérés lors de la carcinogenèse est essentielle.

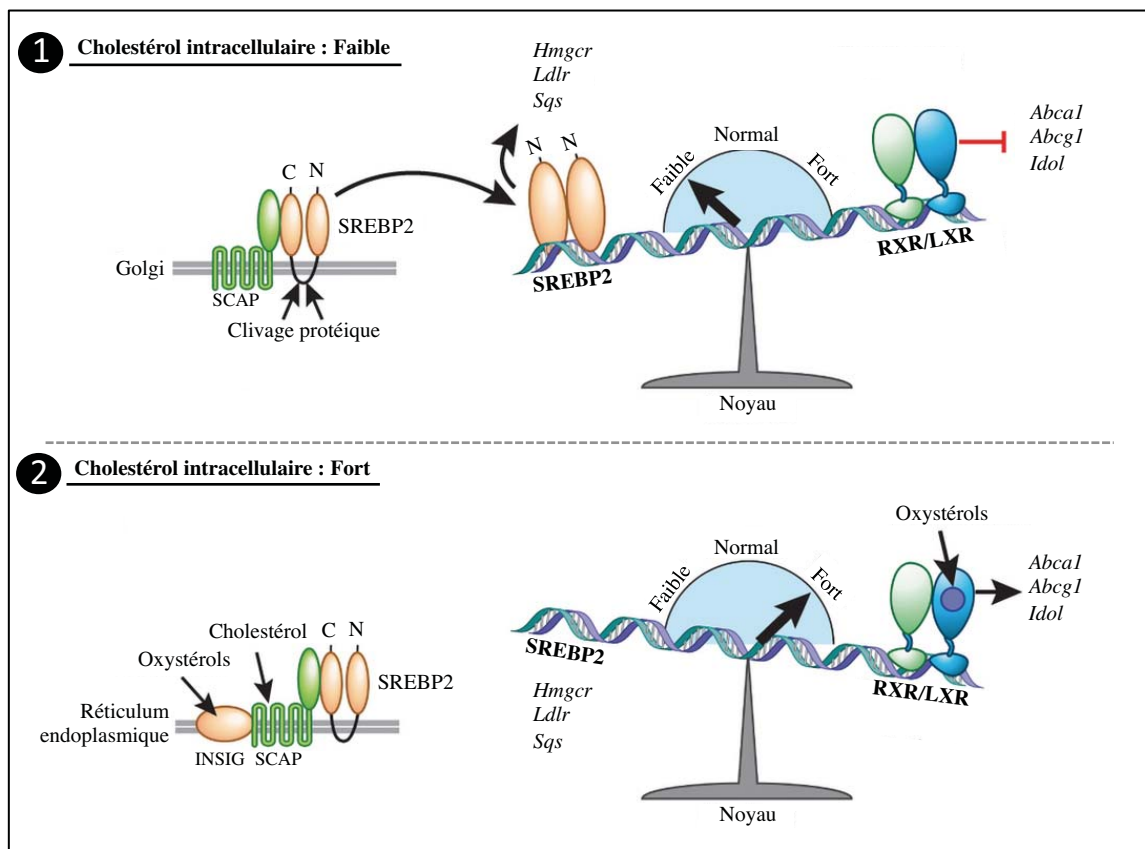


Figure 36 : Régulation coordonnée de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire par SREBP et les LXRs

Lors d'une diminution des niveaux en cholestérol intracellulaire (haut), les précurseurs de SREBP sont transportés par la protéine SCAP au sein du Golgi, où ils sont maturés par un clivage protéique. Le domaine amino-terminal, comprenant l'activité de facteur de transcription, dimérise et migre dans le noyau pour se fixer à des éléments de réponse spécifiques (SRE) et induire la transcription de gènes cibles impliqués dans la synthèse *de novo* et le captage du cholestérol. Le complexe LXR-RXR, quant à lui, recrute des complexes de corépresseurs, empêchant la transcription de gènes activant l'efflux du cholestérol. Dans le cas d'une augmentation du cholestérol intracellulaire (bas), les précurseurs de SREBP sont séquestrés dans le réticulum endoplasmique. Le cholestérol et le desmostérol entraînent en effet la rétention de SREBP en se liant à SCAP, tandis que les oxystérols favorisent cette même rétention en se liant à INSIG. Les oxystérols se lient aux LXRs, permettant la dissociation des corépresseurs et le recrutement de coactivateurs induisant la transcription des gènes cibles dans le but de diminuer les niveaux de cholestérol. *Modifié d'après Spann et Glass, 2013.*

4) Régulation de l'homéostasie du cholestérol : LXR et SREBP2

Schématiquement, deux types de facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol : SREBP2 (*Sterol regulatory element-binding protein 2*) et les LXRs (*Liver X receptors*). Ces deux voies majeures ont des effets opposés puisque SREBP2 joue un rôle dans l'augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol tandis que les LXRs empêchent l'entrée de cholestérol dans la cellule et favorise son efflux, et donc l'initiation du RCT (*Reverse Cholesterol Transport*) (**Figure 36**).

A) La voie SREBP2

(1) Généralités : la famille des SREBPs

Les SREBPs (*Sterol Response Element Binding Proteins*) appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH-Zip et activent une variété de gènes requis pour la synthèse et le stockage de cholestérol, d'acides gras, de triglycérides et de phospholipides (Brown and Goldstein, 1997; Horton and Shimomura, 1999; Horton et al., 2002). Chez les mammifères, il existe trois isoformes : SREBP-1a et SREBP-1c codées par le gène *Srebf-1*, et SREBP-2 codée par *Srebf-2* (Brown and Goldstein, 1997). Les facteurs de transcription SREBPs diffèrent dans leur spécificité tissulaire, leur sélectivité envers leurs gènes cibles et le potentiel relatif de leur domaine de transactivation. Alors que SREBP-1a est un activateur potentiel de tous les gènes sensibles aux SREBPs, SREBP-1c active préférentiellement la transcription de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras. La signalisation SREBP2, quant à elle, favorise l'augmentation des pools intracellulaires de cholestérol en induisant, *via* une activité transcriptionnelle, l'expression de gènes clés de la voie du mévalonate et donc la synthèse *de novo*, ainsi qu'en activant la capture du cholestérol depuis le milieu extérieur (Eberlé et al., 2004).

(2) Mécanisme d'action de SREBP2

Mécanistiquement, la protéine SREBP2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif lié à la membrane du réticulum endoplasmique (Hua et al., 1993; Duncan et al., 1997). Après sa traduction, SREBP2 se lie à SCAP (*SREBP cleavage activating protein*), une protéine transmembranaire chaperonne sensible aux niveaux de stérols présents dans la cellule (Yang et al., 2002). La libération du complexe SREBP2/SCAP du réticulum endoplasmique est contrôlée par la protéine INSIG (*Insulin Induced Gene*), qui se lie à SCAP en présence de hauts niveaux de cholestérol et empêche le complexe de migrer vers le Golgi *via* un

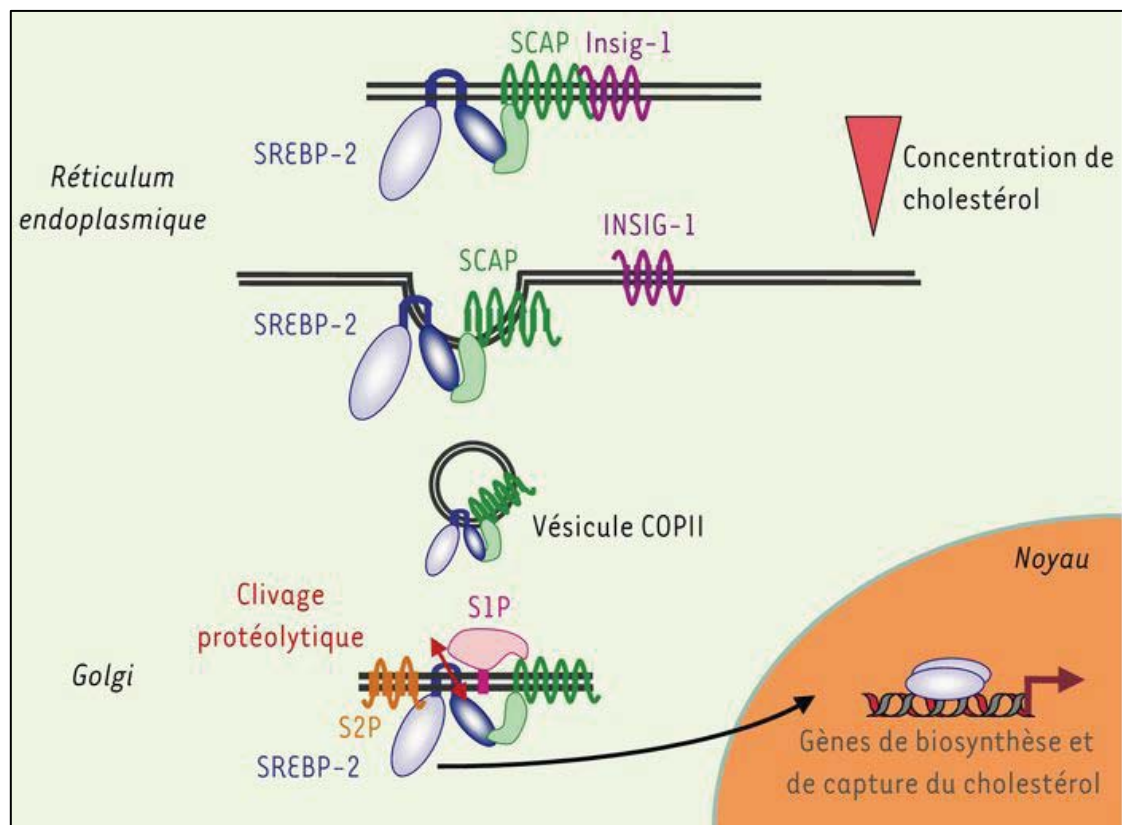


Figure 37 : Mécanisme d'action des SREPBs et régulation du cholestérol intracellulaire

En l'absence de stérols et dès sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, SREBP s'associe aux protéines SCAP. Ces dernières contactent les protéines COPII, permettant au complexe SREBP/SCAP de migrer vers l'appareil de Golgi dans des vésicules bordées de COPII. A ce niveau, SREBP est clivée en deux temps par les protéases S1P puis S2P, libérant le domaine N-terminal de la protéine. Ce dernier transloque dans le noyau et dimérise. Les dimères formés se fixent sur les SRE et activent la transcription des gènes cibles. Lorsque la concentration en stérols intracellulaire augmente, la fixation du cholestérol à SCAP ou des oxystérols à INSIG empêche la formation des complexes SCAP/COPII, séquestrant SREBP dans le réticulum endoplasmique. *D'après Foufelle et al., 2005.*

trafficking dépendant des vésicules COPII (*COat Protein II*) (Radhakrishnan et al., 2007; Sun et al., 2007). Quand le niveau de cholestérol intracellulaire se réduit, l'interaction entre SCAP et INSIG est rompue, permettant une autre interaction entre SCAP et COPII. SREBP2 est alors délivré au Golgi, où il est clivé par deux protéases membranaires S1P et S2P (*Site 1* et *Site 2 Protease*) au niveau de son domaine N-terminal (Goldstein et al., 2006). Les domaines libres vont ainsi dimériser et transloquer dans le noyau pour agir en tant que facteur de transcription, reconnaître leurs séquences consensus SRE (*Sterol Response Element*) et activer l'expression de gènes tels que la HMGCR ou le LDLR (Espenshade, 2006) (**Figure 37**).

(3) SREBP2 et carcinogenèse prostatique

D'ores et déjà, différentes études montrent toute l'importance de la régulation de SREBP2, et ainsi du cholestérol, dans le développement de la tumorigenèse prostatique. Certaines lignées tumorales perdent par exemple le mécanisme de régulation inhibant le clivage de SREBP2, entraînant une augmentation des niveaux intra-tumoraux de cholestérol et la synthèse de prostaglandines nécessaires à la croissance cellulaire (Chen and Hughes-Fulford, 2001). De plus, une autre étude suggère l'implication de SREBP2 dans la protection de la cellule tumorale face à la lipotoxicité, en prévenant les déficiences en désaturation des acides gras, préservant ainsi une balance entre les acides gras saturés et insaturés (Williams et al., 2013). L'utilisation d'antagonistes naturels de SREBP2 dans des cellules tumorales prostatiques est également corrélée à une diminution de la viabilité cellulaire, en relation directe avec le contenu de la cellule en cholestérol (Krycer et al., 2012). Un lien entre l'activité de SREBP2 et l'activité de la voie pro-tumorale PI3K/AKT a même été démontré. En effet, *in vitro* dans des cellules ovariennes et prostatiques, l'activation de la voie PI3K/AKT induit l'activité de SREBP2 et de ses gènes cibles, se traduisant par une augmentation du cholestérol intracellulaire et de l'agressivité tumorale (Du et al., 2006; Yue et al., 2014). De plus, une étude très récente met en évidence que l'activation de SREBP2 favorise la capacité métastatique de la cellule tumorale prostatique en induisant la transcription de l'oncogène c-Myc (Li et al., 2016). Ainsi, la surexpression de SREBP2 au sein de la lignée CWR22Rv1 active-t-elle les capacités migratoires et invasives de la cellule *in vitro* tandis que son invalidation lors d'un protocole de xénogreffe aboutit à une diminution de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique. Des analyses montrent enfin que l'activité de SREBP2 peut être corrélée à l'androgéno-indépendance. En effet, Ettinger *et al.* indiquent que lors de xénogreffes de cellules LNCaP, un protocole de castration est accompagné d'une diminution des niveaux de transcrits et protéiques de SREBP2 (Ettinger et

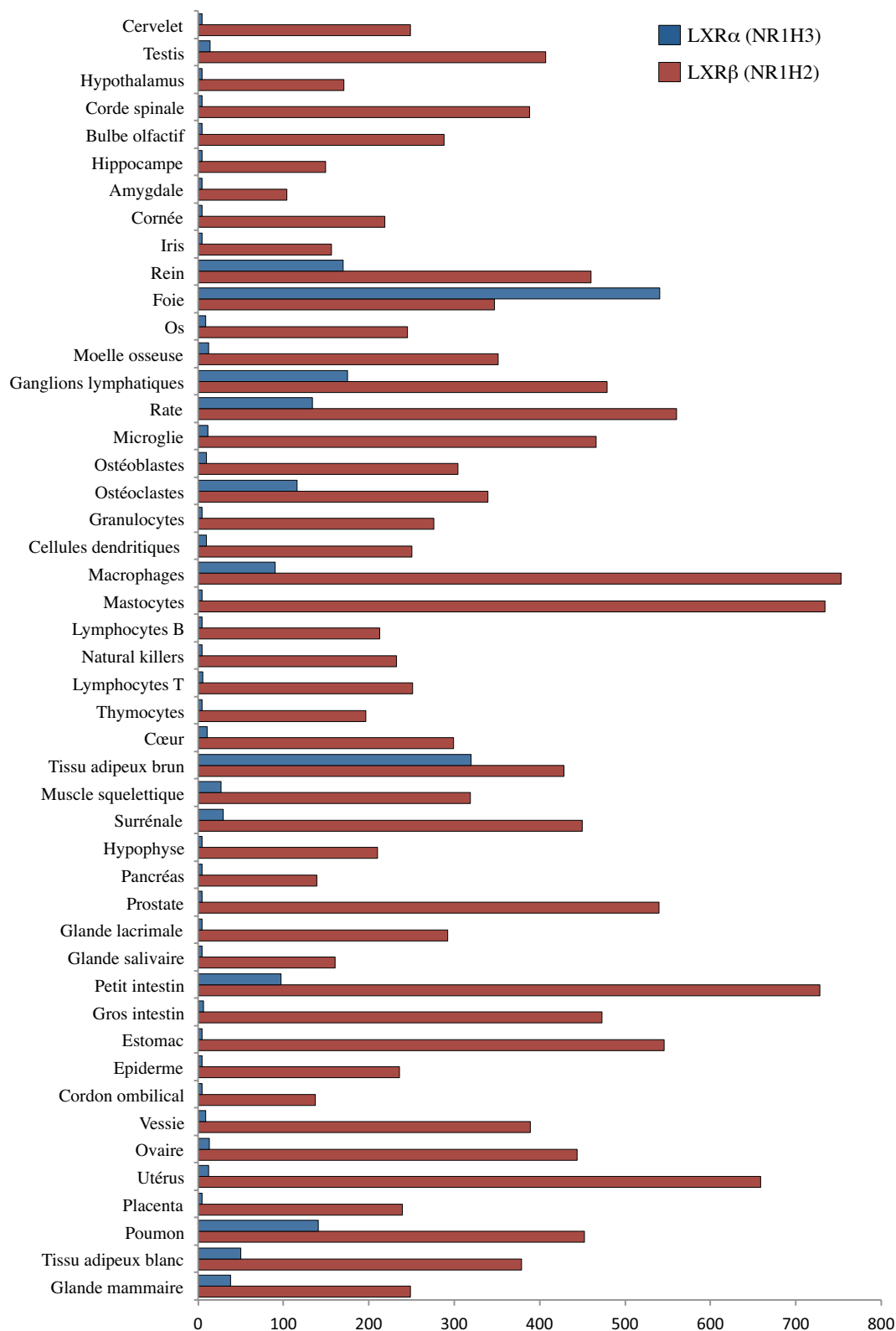


Figure 38 : Expression de *Lxrα* et *Lxrβ* chez la souris

Résumé du profil d'expression des deux isoformes des LXRs à partir de données d'analyses à haut débit extraites sur <http://www.biogps.org>. Consulté le 9/10/16.

al., 2004). Lors de l'émergence de la résistance à la castration, les auteurs constatent une augmentation du niveau protéique de SREBP2, associée à une accumulation de différents transcrits intervenant dans la voie du mévalonate. Ces données confirment l'importance de SREBP2 au sein de la progression tumorale et suggèrent une nouvelle fois une proximité entre l'émergence du CRPC et l'augmentation du cholestérol intracellulaire, *via* la modification de la voie du mévalonate.

B) Les LXRs

(1) Généralités

Les LXRs (*Liver X Receptors*) sont des facteurs de transcription activables par un ligand et qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils ont été identifiés en 1994 lors du ciblage d'une librairie d'ADNc hépatiques de rat (Apfel et al., 1994; Song et al., 1994). Faute d'identification de ligands, ils ont tout d'abord été classés dans la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Dans les années suivantes, l'identification de leurs ligands de type oxystérols, des dérivés oxydés du cholestérol, a permis de redéfinir les LXRs comme des récepteurs orphelins « adoptés ». Deux isoformes des LXRs ont été identifiées à ce jour : LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) issus de deux gènes distincts et localisés chez l'homme sur les chromosomes 11p11.2 et 19q13.3 et chez la souris sur les chromosomes 2 et 7 (Shinar et al., 1994; Song et al., 1994; Willy et al., 1995).

D'un point de vue mécanistique, les LXRs sont fixés constitutivement sur leurs éléments de réponse au niveau de l'ADN. En absence de ligand, un complexe de corépresseurs maintient la chromatine dans un état non-permissif, inhibant la transcription des gènes cibles. La fixation du ligand sur son récepteur induit l'initiation de la transcription. Ces récepteurs peuvent agir sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère avec le partenaire obligatoire RXR (*Retinoid X Receptor*).

Physiologiquement, les LXRs assurent différents rôles selon le tissu où ils sont exprimés (**Figure 38**). Toutefois, leur fonction générale consiste à réguler l'homéostasie des lipides, et plus particulièrement le métabolisme et le transport du cholestérol. D'autres études caractérisent une implication dans le métabolisme du glucose et la modulation de la réponse inflammatoire (Viennois et al., 2012).

(2) Structure et mécanisme d'action des LXRs

Chaque isoforme de LXR est constituée de quatre domaines fonctionnels (**Figure 39**) :

- Un domaine N-terminal (A/B), où une fonction activatrice AF1 (*Activating Fonction I*)

permet le recrutement des co-activateurs indépendamment de la présence du ligand.

- Un domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), ou domaine C, qui est composé d'un motif à deux doigts de zinc impliqué dans la reconnaissance des éléments de réponse et la formation de l'hétérodimère. Quatre sous-domaines sont définis au sein du DBD : la boîte P portée par le premier doigt de zinc et impliquée dans la reconnaissance du demi-site de l'élément de réponse dont la séquence canonique est AGA/GTCA (Aumais et al., 1996) ; la boîte D située au niveau du second doigt de zinc et définissant l'écartement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse sur l'ADN, ainsi que le caractère hétérodimérique des LXR ; l'extension carboxy-terminale (CTE), située en C-terminal du second doigt de zinc et permettant l'interface protéine/protéine et protéine/ADN ; le signal de localisation nucléaire (NLS) (**Figure 40**).

- Un domaine charnière (domaine D) reliant le DBD au LBD (*Ligand Binding Domain*) qui permet une rotation de 180° lorsque l'hétérodimère de récepteurs reconnaît des séquences particulières des éléments de réponse telles que les DR (*Direct Repeat*) ou les IR (*Inverted Repeat*). Les co-répresseurs tels que N-Cor (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) ou SMRT (*Silencing Mediator for RAR and Tr*) se fixent au niveau de ce domaine pour maintenir la transcription inactive (Chen and Evans, 1995; Hörlein et al., 1995).

- Le domaine de liaison au ligand (LBD, ou domaine E/F) en partie C-terminale est constitué d'une poche hydrophobe où le ligand peut se fixer. La présence d'une fonction activatrice (AF2) au niveau de l'hélice 12 permet le recrutement de co-activateurs en présence du ligand (Bourguet et al., 1995). En effet, l'arrivée du ligand entraîne un changement de position de l'hélice 12 qui ferme la poche hydrophobe et fait ressortir la fonction AF2. Enfin, les récepteurs nucléaires agissant sous forme de dimères sont associés au niveau de ce LBD (Mangelsdorf and Evans, 1995).

Les LXRs se lient de manière canonique à différentes isoformes du récepteur de l'acide rétinoïque *9-cis* RXR (Repa and Mangelsdorf, 2000; Tamura et al., 2000; Morello et al., 2005). Ainsi, l'hétérodimère LXR/RXR est-il constitutivement fixé au promoteur de ses gènes cibles au niveau des séquences promotrices LXRE (*LXR Response Element*) dont le motif le plus courant est le DR4 composé de deux séquences AGGTCA séparées par quatre nucléotides (Chawla et al., 2001). En absence de ligand, l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère est inhibée par des répresseurs. Après fixation du ligand, les modifications induites au niveau du domaine carboxy-terminal permettent le relargage des co-répresseurs et l'emprisonnement du ligand dans la poche hydrophobe, et renforce alors la fixation de co-

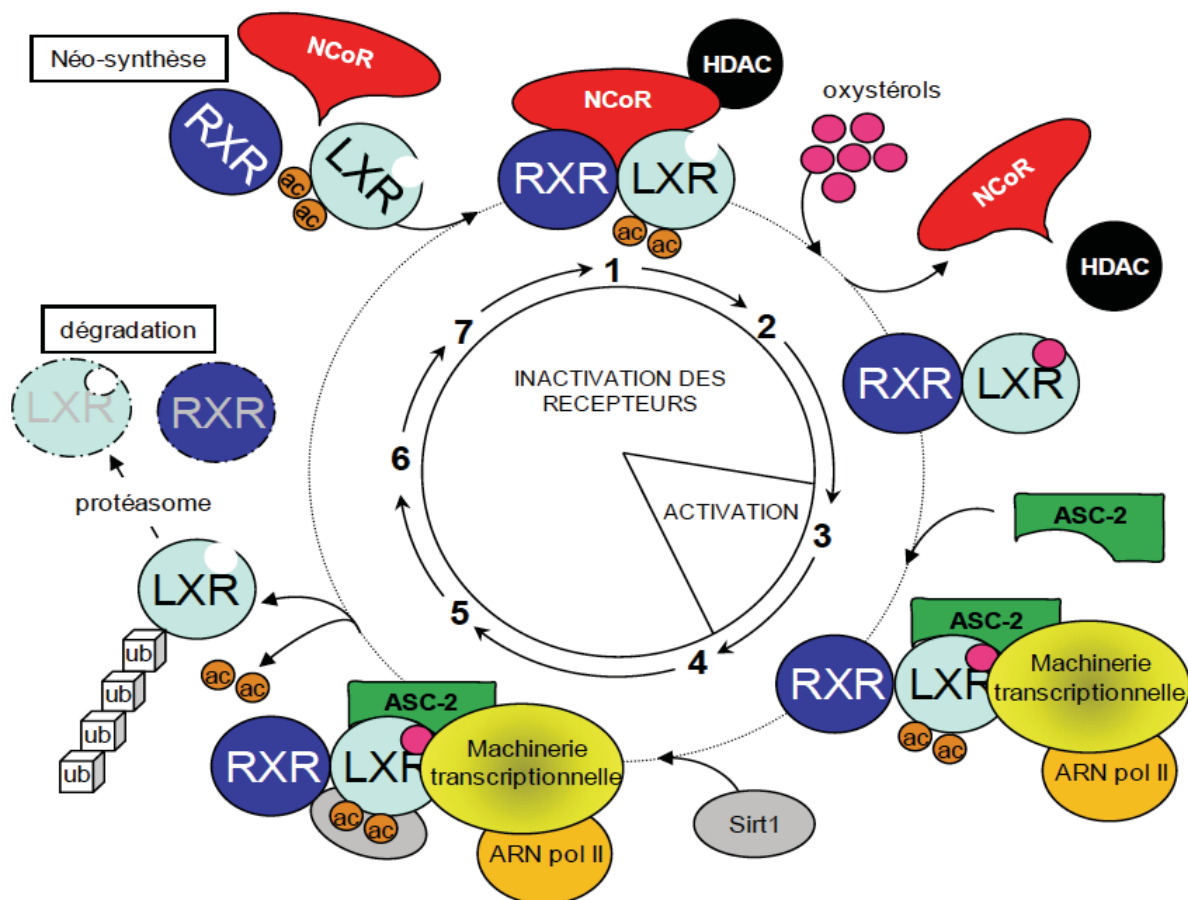


Figure 41 : Représentation schématique du cycle d'activation/inhibition de l'hétérodimère LXR/RXR

En absence de ligand, l'hétérodimère LXR/RXR est lié constitutivement à l'ADN avec des co-répresseurs (comme NCoR). La liaison des agonistes d'un ou des deux récepteurs induit le relargage des co-répresseurs et le recrutement d'une série de co-activateurs (par exemple, ASC-2) au niveau du domaine AF-2. La fixation des protéines de la machinerie transcriptionnelle et de l'ARN polymérase II augmente la transcription des gènes cibles. La sirtuine 1 (Sirt1) désacétyle LXR qui est alors ubiquitinylé et dirigé vers le protéasome. Ac : acétylation ; ASC-2 : *activating signal cointegrator-2* ; HDAC : *histone deacetylase* ; LXR : *liver X receptor* ; NCoR : *nuclear receptor corepressor* ; RXR : *retinoid X receptor* ; Sirt1: sirtuine 1 ; Ub: ubiquitine. D'après Viennois et al. 2011a.

activateurs pour favoriser l'état permissif de la chromatine. La machinerie transcriptionnelle est mise en place et la transcription des gènes cibles effectuée (**Figure 41**).

(3) Ligands des LXRs

(a) Ligands agonistes d'origine naturelle (les oxystérols)

Les oxystérols, ou hydroxycholestérols, sont des molécules d'origine biologique ou chimique produites par oxydation ou hydroxylation du cholestérol (Viennois et al., 2011). Deux sources d'oxystérols peuvent être considérées chez les mammifères : (i) endogène, par synthèse enzymatique ou chimique ; (ii) exogène, apportée par l'alimentation.

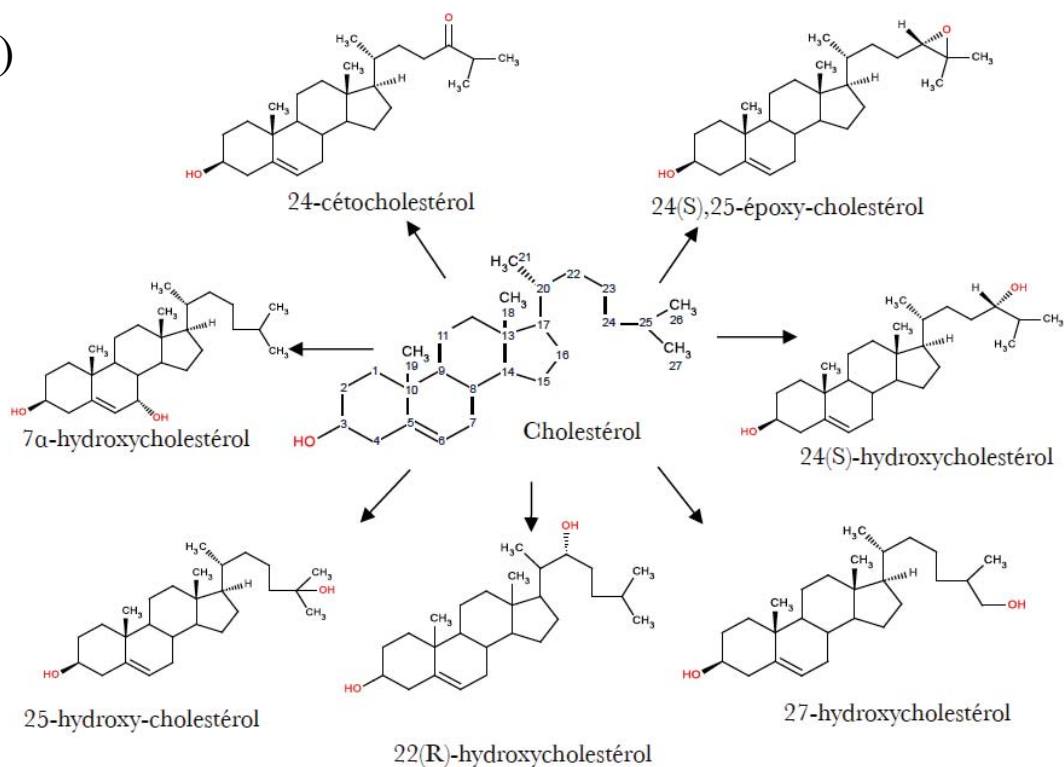
Les oxystérols sont obtenus de deux manières : passivement par l'attaque du cholestérol à l'aide d'espèces oxygénées réactives (7-céto-cholestérol et 7 β -hydroxy-cholestérol), ou par des réactions enzymatiques spécifiques (24(S)-hydroxy-cholestérol, 25-hydroxy-cholestérol, 22(R)-hydroxy-cholestérol et 27-hydroxy-cholestérol). La nature des oxystérols dépend de leur lieu de synthèse. En effet, le 22(R)-hydroxy-cholestérol est retrouvé préférentiellement dans les tissus stéroïdogènes, le 24(S)-hydroxy-cholestérol encore appelé cérébrostérol dans le cerveau et le plasma, le 24(S),25-époxy-cholestérol dans le foie et le 27-hydroxy-cholestérol dans les macrophages et le plasma (**Figure 42**).

Même si de nombreux oxystérols sont capables de lier d'autres récepteurs nucléaires tels que FXR (*Farneosid X Receptor*), certains composés présentent une affinité stricte envers les LXRs (Houck et al., 2004; Chen et al., 2007; Wang et al., 2010b). La première identification d'oxystérols ligands des LXRs a été réalisée par des expériences de double hybride à l'aide du LBD (*Ligand binding domain*) de LXR α et du DBD (*DNA binding domain*) de GAL-4 (*Galactose-responsive transcription factor 4*) (Janowski et al., 1996). Ainsi les 22(R)-hydroxy-cholestérol, 20(S)-hydroxy-cholestérol, 24(S)-hydroxy-cholestérol, 7 α -hydroxy-cholestérol et 27-hydroxy-cholestérol présentent une forte affinité pour LXR α (Janowski et al., 1996), alors que les 24-céto-cholestérol, 25-hydroxy-cholestérol et 24(S),25-époxy-cholestérol sont des activateurs de grande affinité pour les deux isoformes (Lehmann et al., 1997).

(b) Ligands agonistes d'origine synthétique

Le ligand le plus utilisé dans les études fondamentales sur les LXRs est le T0901317, bien que sa spécificité ne soit pas parfaite, puisqu'il est capable d'activer des récepteurs tels que PXR (*Pregnane X Receptor*) ou FXR à des concentrations élevées (Houck et al., 2004; Shenoy et al., 2004; Mitro et al., 2007b). Le GW3965, quant à lui, est considéré comme plus

A)



B)

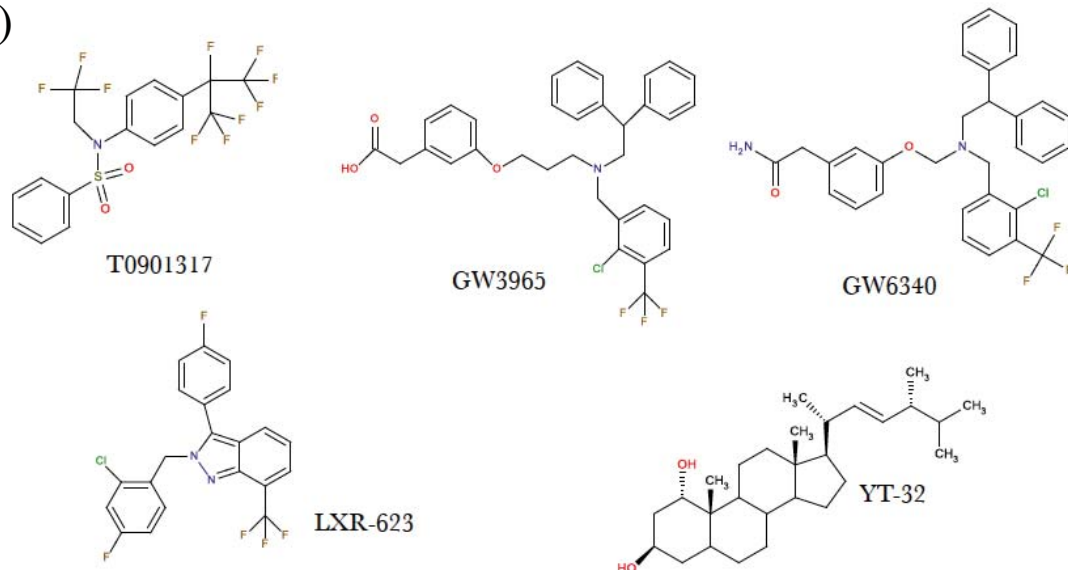


Figure 42 : Ligands agonistes naturels et synthétiques des LXRs

(A) Ligands agonistes naturels (oxystérols). La structure chimique du cholestérol est représentée et les atomes de carbone sont numérotés. Le nom de chaque oxystérol dépend de la position des groupements hydroxyles. (B) Ligands agonistes synthétiques. *D'après Viennois et al., 2012.*

spécifique et capable d'activer efficacement les deux isoformes des LXR_s à des doses moins importantes (Mitro et al., 2007b). Un autre composé proche du GW3965, le GW6340, activant les LXR_s spécifiquement dans l'intestin, en association avec l'induction des gènes cibles *Abca1*, *Abcg5*, *Abcg8* (Yasuda et al., 2010) (**Figure 42**). Finalement, le YT-32 induit sélectivement les transporteurs intestinaux ABC (*ATP-binding cassette*) sans activer l'expression des gènes de la lipogenèse hépatique. Contrairement à un traitement au T0901317, le YT-32 inhibe donc l'absorption du cholestérol alimentaire sans augmenter les taux de triglycérides plasmatiques (Kaneko et al., 2003).

Le rôle hypocholestérolémiant des LXR_s les caractérise comme des cibles thérapeutiques, notamment dans le traitement de pathologies telles que l'athérosclérose. La principale contrainte est de trouver un agoniste présentant très peu d'effets secondaires indésirables. En effet, en raison du rôle des LXR_s dans la synthèse des acides gras, la plupart des composés synthétiques actuels sont associés à des effets hypertriglycéridémiants. Il est donc nécessaire d'obtenir des molécules activant le récepteur spécifiquement dans les organes ciblés. Le premier agoniste des LXR_s en essai clinique de phase I est le LXR-623. Son administration à des volontaires sains a montré une activation des gènes cibles des LXR_s impliqués dans le transport inverse du cholestérol au niveau des macrophages sans induction de la synthèse des triglycérides. Ces résultats encourageants ont été cependant accompagnés d'effets secondaires indésirables au niveau du système nerveux central, rendant ce composé inutilisable chez l'homme (DiBlasio-Smith et al., 2008; Katz et al., 2009).

(c) Ligands antagonistes

Malgré la recherche croissante de ligands agonistes des LXR_s, il est intéressant de noter que des molécules antagonistes naturelles ou synthétiques des récepteurs ont également été identifiées. Ainsi le 22(S)-hydroxy-cholestérol est caractérisé comme un antagoniste compétitif des LXR_s, capable de déplacer des ligands connus du LBD sans induire d'activation des récepteurs. Des résultats montrent que ce composé diminue la lipogenèse et l'accumulation lipidique dans les tissus non adipeux, sans affecter le métabolisme du cholestérol (Hessvik et al., 2012). On peut également prendre en exemple la transformation des macrophages en cellules spumeuses, une étape essentielle des lésions athérosclérotiques, résultant d'une surcharge en cholestérol. Cette transformation débute par une endocytose de LDL oxydés (Collot-Teixeira et al., 2007), contenant notamment de grandes quantités de 7-céto-cholestérol et de 5 α ,6 α -époxy-cholestérol (Brown and Jessup, 1999). Ces molécules

représentent des composés naturels inhibiteurs des LXRs grâce à un défaut de recrutement de co-activateurs et dépendant du LBD : elles peuvent être contrées par des doses importantes d'agonistes.

(d) Régulation indépendante du ligand

D'autres modifications indépendantes de la fixation d'un ligand de type oxystérol au LBD des LXRs peuvent intervenir dans la mobilisation des récepteurs. Parmi elles, la littérature décrit notamment des modifications post-traductionnelles de la protéine telles que la phosphorylation, la sumoylation ou la désacétylation.

i) Phosphorylation des LXRs

La première donnée ayant mis en évidence l'importance de la phosphorylation dans l'activité des LXRs montre que l'utilisation de forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) sur une construction chimérique comportant le LBD de LXR α potentialise l'effet d'un traitement avec un agoniste (Huang et al., 1998). Une compréhension exacte du mécanisme sous-jacent reste en suspens mais une étude a identifié un résidu sérine phosphorylé en position 198 du LBD, au sein de la région charnière (Chen et al., 2006b). Plus récemment, une équipe a montré que LXR α représentait une cible de la PKA (*Protein Kinase A*), capable d'inhiber l'activation du récepteur lors d'un traitement agoniste *in vitro* et *in vivo* (Yamamoto et al., 2007). Cette régulation est expliquée par une diminution de la liaison entre RXR et LXR et une baisse du recrutement des co-activateurs.

ii) Sumoylation des LXRs

La sumoylation est une modification post-traductionnelle caractérisée par la liaison d'un groupement peptidique SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modified*). Elle est souvent répressive dans le cas d'un facteur de transcription (Hay, 2005b). Des études montrent que les LXRs constituent des cibles de la sumoylation, pouvant expliquer des effets paradoxaux non prédits dans le cadre de récepteurs nucléaires. Par exemple, les LXRs possèdent une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que *Inos* (*Inducible nitric oxide synthase*) (Joseph et al., 2003). Ghisletti *et al.* montrent ainsi que l'activation des LXRs par le GW3965 induit une sumoylation des récepteurs et une répression de la transcription de *Inos* dépendante du co-répresseur NCoR (Ghisletti et al., 2007). Cependant, le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas encore élucidé.

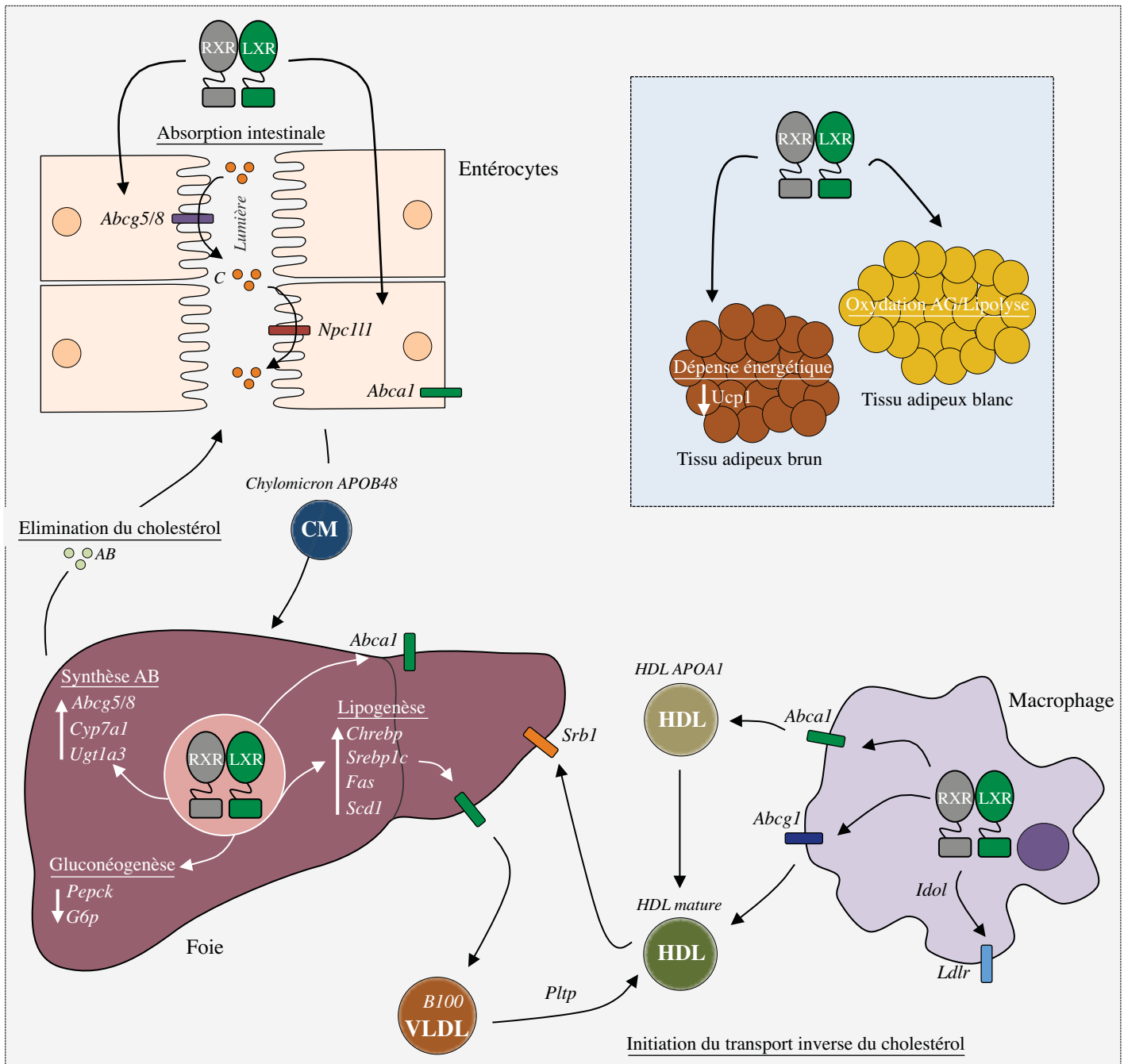


Figure 43 : Rôle des LXRs dans le métabolisme lipidique

Les LXRs régulent la lipogenèse hépatique via la biosynthèse des acides gras et des triglycérides (principalement grâce à LXR α) en induisant directement la transcription de facteurs lipogéniques tels que SREBP-1c (*Sterol regulatory element-binding protein 1c*), FASN (*Fatty acid synthase*) et SCD1 (*Stearoyl-CoA desaturase 1*). Les LXRs réduisent également l'expression d'enzymes impliquées dans la néoglucogenèse hépatique telles que la G6Pase (*Glucose 6-phosphatase*) et la PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*). Les récepteurs augmentent l'expression de transporteurs du cholestérol dans les macrophages (ABCA1 et ABCG1), initiant alors le transport inverse du cholestérol. Les LXRs induisent l'excrétion du cholestérol via ABCG8/G5 et leur conversion en acides biliaires grâce à la régulation de CYP7a1. Dans les intestins, les LXRs limitent l'absorption du cholestérol par l'activation de ABCG8/G5 et l'inhibition de NPC1L1. L'expression de IDOL, un régulateur négatif du LDLR, est induite par les LXRs, réduisant ainsi l'entrée de cholestérol dans la cellule. Bien que le rôle des récepteurs dans le tissu adipeux blanc (WAT) ne soit pas clair, des travaux récents indiquent une induction de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras au sein des adipocytes. Dans le tissu adipeux brun, les LXRs diminuent l'expression de UCP1 et la dépense énergétique. Réalisé d'après Jakobsson et al., 2012.

iii) Désacétylation des LXRs

Des résultats soutiennent un modèle théorique où la liaison de SIRT1 (*Sirtuin 1*), une déacétylase, suite à l'activation des LXRs, permettrait d'augmenter leur dégradation protéasomale afin de libérer le promoteur et le recrutement de nouveaux récepteurs : ce processus faciliterait l'entretien d'un cycle de transcription.

Ainsi, une étude a-t-elle montré que SIRT1 est capable d'interagir avec les deux isoformes des LXRs lors de leur fixation à l'ADN (Li et al., 2007). Suite à une activation des récepteurs à l'aide de 22(R)-hydroxy-cholestérol, l'acétylation est diminuée. De plus chez des souris invalidées pour SIRT1, la réponse des LXRs au T09013117 décroît et le transport inverse du cholestérol est dérégulé : ces expériences caractérisent l'acétylation comme un facteur important dans l'activité transcriptionnelle des LXRs. Finalement, l'étude indique que la liaison de SIRT1 à LXR α induit sa désacétylation et sa dégradation par le protéasome.

Ensemble, ces données montrent qu'au-delà d'un mode d'activation ligand-dépendant bien caractérisé, les LXRs font partie d'un maillage complexe de signalisations cellulaires, permettant parfois d'expliquer des effets en contradiction avec le mécanisme d'action associé à un récepteur nucléaire.

(4) Fonctions physiologiques régulées par les LXRs

L'identification des oxystérols comme ligands endogènes des LXRs suggère un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. En effet, le premier gène identifié comme régulé directement par les récepteurs a été *Cyp7a1* (*Cytochrome P450 cholesterol 7- α -hydroxylase*), une enzyme impliquée dans l'étape limitante de la synthèse des acides biliaires (Lehmann et al., 1997). D'autres études ont ensuite démontré que les LXRs étaient capables de réguler tout un cluster de gènes impliqués principalement dans le métabolisme et le transport du cholestérol. De plus, ils sont aujourd'hui considérés comme des « détecteurs » clés du niveau intracellulaire en stérols. Ils permettent alors plusieurs réponses mécaniques en cas de surcharge en cholestérol. Ces mécanismes incluent l'inhibition de la synthèse *de novo* du cholestérol, l'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol d'origine alimentaire et de son captage intracellulaire, la stimulation de son transport inverse, ainsi que sa sécrétion sous la forme d'acides biliaires (**Figure 43**).

(a) Le métabolisme du cholestérol

i) LXR α et synthèse de novo du cholestérol

Comme précédemment décrit, les facteurs de transcription appartenant à la famille SREBP (*Sterol response-element binding protein*) peuvent être déclinés sous trois isoformes : SREBP-1a qui régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol ; SREBP-1c stimulant les gènes lipogéniques ; SREBP-2 favorisant l'expression des enzymes de synthèse du cholestérol (Eberlé et al., 2004). Les souris invalidées pour LXR α présentent une augmentation de l'expression hépatique de SREBP-2 et de certains de ses gènes cibles, incluant par exemple *Hmgcs* (*Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*), *Hmgcr*, ou *Sqs* (*Squalene synthase*) (Peet et al., 1998). Une observation similaire a été faite au sein de souris mutantes pour LXR β , chez qui l'accumulation des enzymes impliquées dans la voie du mévalonate HMGCR (*HMG-CoA reductase*), SQS (*Squalene synthase*) et FPP (*Farnesyl diphosphate synthase*) est augmentée (Alberti et al., 2001). En accord, l'administration d'agonistes synthétiques des LXR α réduit l'expression hépatique de *Sqs* et de *Hmgcs* dans des souris sauvages (Schultz et al., 2000). Cependant, la diminution des gènes cholestérogéniques dans le foie en réponse à un régime riche en cholestérol n'est pas altérée dans les souris invalidées pour LXR α ou LXR β . Cette information indique que, suite à une augmentation importante des niveaux de stérols intracellulaires, la régulation de la synthèse *de novo* du cholestérol dépendante de SREBP2 reste prédominante (Peet et al., 1998; Alberti et al., 2001; Eberlé et al., 2004). Une dernière étude montre que LXR α régule négativement *Cyp51a1* (*lanosterol 14 α -demethylase*), codant une enzyme de la voie de biosynthèse du cholestérol, *via* la présence d'un LXRE identifié (Wang et al., 2008b).

ii) LXR α et absorption intestinale du cholestérol

ABCG5 et ABCG8, localisés également sur la membrane apicale des entérocytes, jouent un rôle fondamental dans l'absorption du cholestérol alimentaire (Wang, 2007). Leur expression est augmentée lors de l'activation des LXR α dans l'intestin murin ainsi que dans des cellules CaCo-2 dérivées d'entérocytes humains (Repa et al., 2002; Cavelier et al., 2006; Duval et al., 2006). Initialement, cet effet a été associé à l'expression de ABCA1 dans les entérocytes. Cependant, des expériences menées sur des souris invalidées soit pour *Abca1* soit pour *Abcg5/Abcg8* ont révélé que ces deux derniers gènes seulement étaient impliqués dans l'inhibition LXR α -dépendante de l'absorption du cholestérol alimentaire (Plösch et al., 2002; Yu et al., 2003).

NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1*) est un transporteur transmembranaire de stérols

localisé dans la membrane des entérocytes et des hépatocytes. Il représente par exemple la cible moléculaire de l'ézétimibe, un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie (Xie et al., 2012). De manière intéressante, son expression est diminuée en réponse à une activation des LXRs dans l'intestin de souris, ainsi que dans des cellules tumorales issues du cancer colorectal (Caco-2) (Duval et al., 2006).

iii) LXRs et captage du cholestérol

La majorité du cholestérol plasmatique est transportée dans les LDL qui sont assimilés par la voie du LDLR. Les LXRs jouent un rôle dans le captage du cholestérol par leur action sur le gène cible IDOL (*Inducible Degradator Of the LDLR*) (Zelcer et al., 2009). En effet, IDOL est une E3 ligase qui ubiquitinye LDLR au niveau de son domaine cytoplasmique, entraînant par conséquent sa dégradation protéasomale. Ainsi, un traitement avec des agonistes des LXRs dans des souris sauvages, contrairement aux souris *Lxrαβ^{-/-}*, entraîne une diminution de l'accumulation protéique du LDLR. De plus, une expression de IDOL médiée par l'utilisation d'un adénovirus dans le foie des souris invalidées permet la dégradation du LDLR, conduisant à une augmentation des LDL dans le plasma. L'axe LXR-IDOL-LDLR est donc défini comme une voie complémentaire à la voie des SREBPs pour la régulation du captage du cholestérol.

iv) LXRs et transport inverse du cholestérol

La découverte initiale montrant que LXRα est important dans la régulation de l'excrétion du cholestérol hépatique indiqua que les récepteurs pouvaient être également impliqués dans le transport inverse du cholestérol, *via* les HDL dirigés vers le foie (Peet et al., 1998).

L'efflux du cholestérol depuis la cellule représente la première étape de son transport inverse. Ce dernier est initié par les transporteurs ABCA1 et ABCG1, tous deux cibles directes des LXRs. ABCA1 transfère ainsi le cholestérol et les phospholipides depuis la membrane plasmique vers l'apolipoprotéine A-1 (APOA1). Ce transporteur est également important dans la formation des particules de HDL dans le foie. Par ailleurs, la fonction de ABCG1 est de transférer le cholestérol vers les HDL (Cavelier et al., 2006). Il a été démontré que LXRα et LXRβ favorisent l'expression de *Abca1* et *Abcg1* par l'intermédiaire de LXRE aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme (Costet et al., 2000; Repa et al., 2000b; Sabol et al., 2005). De nombreuses études ont également mis en évidence l'augmentation des niveaux de ABCA1 et ABCG1 suite à un traitement avec des agonistes naturels des LXRs

dans de multiples lignées cellulaires telles que les macrophages, les fibroblastes, les cellules CaCo-2, les hépatocytes primaires, les cellules adipocytaires 3T3-L1 ainsi que dans les cellules HepG2 (Schwartz et al., 2000; Muscat et al., 2002; Sparrow et al., 2002; Kotokorpi et al., 2007; Mitro et al., 2007a; Zhao et al., 2008). De plus, Naik *et al.* ont montré que l'administration de GW3965 à des souris pré-injectées avec des macrophages contenant du cholestérol radiomarqué, favorisait l'excrétion du traceur, apportant la preuve directe que l'activation des récepteurs favorisait le transport inverse du cholestérol *in vivo*. Des résultats similaires plus récents ont fourni les mêmes résultats avec l'utilisation d'autres agonistes tels que le T0901317 (Naik et al., 2006; Calpe-Berdiel et al., 2008; Zanotti et al., 2008).

Dans des macrophages humains, des agonistes des LXRs sont également capables d'augmenter la disponibilité du cholestérol pour les accepteurs extracellulaires *via* l'augmentation de l'expression des gènes *Niemann-Pick C*, qui contrôlent ici son trafic depuis le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique (Rigamonti et al., 2005).

Un autre gène impliqué dans l'homéostasie du cholestérol et directement régulé par les LXRs est *ApoE* (*Apolipoprotein E*), notamment nécessaire à l'incorporation du cholestérol dans les HDL. APOE peut également constituer un accepteur extracellulaire pour le cholestérol pris en charge par ABCA1 (Wouters et al., 2005). Les souris invalidées pour *ApoE* développent de l'athérosclérose. Afin d'expliquer ce phénotype, Laffitte *et al.* montrent par exemple que les LXRs activent l'expression de *ApoE* dans le tissu adipeux et les macrophages, par une interaction directe avec des LXRE. Ainsi, les récepteurs stimulent le transport inverse du cholestérol non seulement en favorisant l'expression des transporteurs ABC mais aussi en augmentant la disponibilité des accepteurs du cholestérol extracellulaire tels que APOE (Laffitte et al., 2001). En accord avec ces différentes données, l'administration d'agonistes synthétiques des LXRs augmente la concentration des HDL plasmatiques chez les rongeurs (Miao et al., 2004; Singh et al., 2005; Sato et al., 2008).

Enfin l'activation des LXRs régule l'expression de *Pltp* (*Phospholipid Transfer Protein*) au niveau du foie et des macrophages. La PLTP facilite d'une part le transfert de phospholipides et de cholestérol depuis des lipoprotéines riches en triglycérides dans les HDL, et d'autre part la conversion des HDL en pré- β -HDL accepteurs de cholestérol périphérique. L'augmentation de l'expression de la PLTP en réponse à l'activation des LXRs stimule donc l'efflux du cholestérol macrophagique. Cet effet est perdu dans des souris mutantes pour la *Pltp* (Cao et al., 2002).

v) *LXRs et excrétion du cholestérol hépatique*

La voie d'élimination principale du cholestérol de l'organisme passe par la sécrétion et la synthèse d'acides biliaires. Cette synthèse débute par la 7- α -hydroxylation du cholestérol *via* l'enzyme CYP7A1, en faisant une cible de choix pour la régulation de son métabolisme. Le rôle physiologique des LXRs dans la régulation du métabolisme hépatique du cholestérol a été clairement démontré en utilisant des souris invalidées pour *Lxra* ou *Lxr β* nourries avec un régime riche en cholestérol (Peet et al., 1998). En comparaison d'animaux sauvages, résistants au régime, les souris *Lxra*^{-/-} présentent une accumulation importante de cholestérol intra-hépatique, trouble associé à une hépatomégalie et à une augmentation des taux circulants de cholestérol. Ce phénotype a été expliqué par une perte de la réponse de CYP7A1 (*via* une diminution de la transcription) et une capacité moindre à la synthèse et à la sécrétion d'acides biliaires. La présence de LXR β ne permet pas de compenser le phénotype développé chez les individus, dû au fait que le LXRE identifié au sein du promoteur de CYP7A1 répond plus fortement à LXR α . Ainsi, les souris invalidées pour l'isoforme β ne présentent pas de troubles hépatiques sévères et s'adaptent sans problème à un régime riche en cholestérol (Alberti et al., 2001). Chez l'homme, le promoteur de *Cyp7a1* n'est pas induit par LXR α , expliquant peut-être une plus grande sensibilité aux régimes hypercholestérolémiant (Chiang et al., 2001; Goodwin et al., 2003).

Les LXRs favorisent également l'excrétion hépatique du cholestérol en induisant la transcription des gènes cibles *Abcg5* et *Abcg8* (*ATP-binding cassette transporters*). Ces transporteurs sont exprimés dans les membranes des hépatocytes, où ils conduisent le cholestérol vers la bile. Ainsi, un traitement à l'aide de T0901317 dans des souris invalidées pour *Abcg5* et *Abcg8* est incapable d'accroître l'élimination du cholestérol dans les sécrétions biliaires (Repa et al., 2002; Yu et al., 2002, 2003).

Enfin, LXR α est impliqué dans le catabolisme des acides biliaires, *via* la mobilisation de l'enzyme UGT1A3 (*UDP Glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A3*), très active dans la glucurono-conjugaison des acides biliaires et leur élimination sous forme de métabolites urinaires. Par ce mécanisme, LXR α facilite l'élimination définitive du cholestérol sous forme d'acides biliaires glucuronidés (Barbier et al., 2009).

(b) Autres fonctions physiologiques des LXRs

i) *Métabolisme des acides gras et métabolisme glucidique*

En plus du métabolisme du cholestérol, les LXRs régulent la biosynthèse des acides gras. Ce processus est largement gouverné par SREBP-1c, activant toutes les enzymes de la

voie métabolique, telles que *Acc* (*Acetyl-CoA carboxylase*), *Fasn* (*Fatty acid synthase*), ou encore *Scd* (*Stearoyl-CoA desaturase*) (Eberlé et al., 2004). Peet *et al.* ont été les premiers à montrer que les souris invalidées pour LXR α étaient caractérisées par une plus faible expression de SREBP-1c et de ses gènes cibles (Peet et al., 1998). Ces résultats ont été confirmés dans les souris invalidées pour les deux isoformes des LXRs, où une diminution des triglycérides plasmatiques et hépatiques est constatée (Schultz et al., 2000; Schuster et al., 2002; Kalaany et al., 2005). De plus, les souris *Lxr β ^{-/-}* conservent une expression normale de SREBP-1c dans le foie, indiquant que l'isoforme α est indispensable dans cette régulation (Repa et al., 2000a; Alberti et al., 2001). En accord avec ces résultats, l'administration de T0901317 favorise l'accumulation de SREBP-1c, ACC, FAS ou SCD1 dans des souris sauvages uniquement. Ce mécanisme provoque une accumulation de triglycérides au niveau hépatique, et *in fine* une stéatose (Chu et al., 2006; Quinet et al., 2006). Chu et Miyazaki ont de plus démontré que SCD-1 est cruciale pour médier les effets lipogéniques des LXRs. En effet, un déficit de SCD-1 prévient une hypertriglycémie chez des souris sauvages traitées avec du T0901317 (Chu et al., 2006). L'importance de SREBP-1c dans la stimulation de la lipogenèse hépatique par les LXRs a été définitivement confirmée par l'utilisation de souris *Srebp1c^{-/-}* traitées avec du T0901317. Dans le foie de ces animaux, la réponse transcriptionnelle d'une majorité des gènes de la lipogenèse lors de l'activation des LXRs est absente et l'accumulation de triglycérides hépatiques réduite (Liang et al., 2002).

ChREBP (*Carbohydrate response element binding protein*) est un facteur de transcription sensible au glucose qui favorise l'expression des gènes lipogéniques, promouvant alors la conversion hépatique des excès carbohydatés en lipides. L'administration de T0901317 chez des souris sauvages favorise l'expression de ChREBP et de ses gènes cibles, démontrant le rôle des LXRs dans le processus. Deux LXRE fonctionnels ont été identifiés dans les régions promotrices, aussi bien activés par la forme α que β . De plus, dans des souris invalidées pour *Chrebp* et traitées au T0901317, la stimulation induite en temps normal par les LXRs sur la lipogenèse hépatique est atténuée (Cha and Repa, 2007).

Les LXRs exercent aussi un rôle hypoglycémiant *via* l'inhibition de gènes de la gluconéogenèse tels que *Pck* (*Phospho-Enol-Pyruvate-CarboxyKinase*), *Fbp* (*Fructose-1,6-biphosphatase*), *G6p* (*Glucose-6-Phosphatase*) et l'induction du transporteur du glucose *Glut4* (*GLUcose Transporter 4*), stimulant ainsi l'entrée du glucose dans les adipocytes (Laffitte et al., 2003).

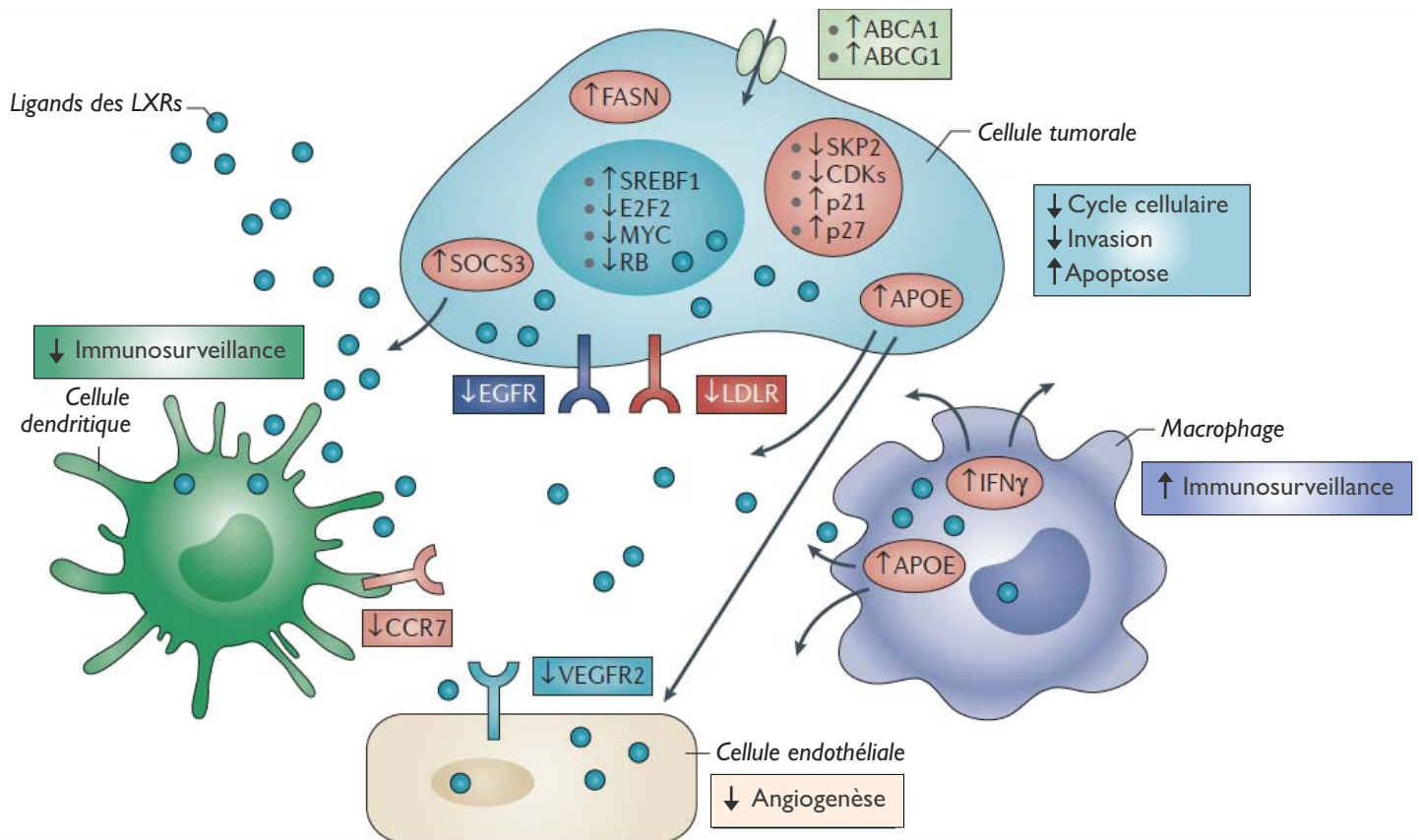


Figure 44 : Modèle composite illustrant les mécanismes d'actions des LXRs et de leurs ligands dans la cellule tumorale

Les différentes voies dérégulées dans la cellule tumorale sont représentées. Le modèle intègre également des acteurs moléculaires clés impliqués dans la régulation du micro-environnement tumoral, tels que le système immunitaire (cellules dendritiques et macrophages) ou les cellules endothéliales. ABCA1, *ATP-binding cassette sub-family A member 1*; APOE, *Apolipoprotein E*; CCR7, *C-C chemokine receptor type 7*; CDKs, *Cyclin-dependent Kinases*; EGFR, *Epidermal growth factor receptor*; FASN, *Fatty acid synthase*; IFN- γ , *Interferon-gamma*; LDLR, *Low density lipoprotein receptor*; LXR, *Liver X receptors*; SKP2, *S-phase kinase-associated protein 2*; SOCS3, *Suppressor of cytokine signalling 3*; VEGFR2, *Vascular endothelial growth factor receptor 2*. Modifié d'après Lin et al., 2015.

ii) L'immunité

L'action anti-inflammatoire des LXR_s a été largement décrite dans les macrophages, où l'utilisation de l'agoniste GW3965 provoque une diminution de l'expression de médiateurs inflammatoires tels que iNOS (*Nitric Oxide Synthase*), COX-2 (*CycloOxygénase-2*) et IL-6 (*InterLeukine-6*) en réponse à une infection bactérienne ou à des lipopolysaccharides (Joseph et al., 2003). De même, la cytokine pro-inflammatoire Ostéopontine est inhibée en réponse à une activation des LXR_s dans les macrophages en culture ou en modèles murins (Ogawa et al., 2005). Des interactions entre les LXR_s et la signalisation TLR (*Toll- Like Receptor*) ont été décrites. En effet, une diminution de l'activité des récepteurs sur la transcription de gènes cibles tels que *Abca1* est observée suite à l'activation de TLR3 et TLR4 lors d'une infection microbienne. Le métabolisme du cholestérol est ainsi modifié dans les macrophages, favorisant leur transformation en cellules spumeuses (Castrillo et al., 2003; Fontaine et al., 2008). En lien, l'activation des LXR_s par le GW3965 entraîne une régression des lésions athérosclérotiques chez des animaux modèles de cette pathologie, démontrant un effet anti-athérogène des récepteurs (Joseph et al., 2002). Enfin, une étude récente met en évidence un contrôle de la maturation et de la migration des cellules dendritiques par les LXR_s (effecteurs importants de la réponse immunitaire innée), *via* la régulation du récepteur aux chimiokines CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) (Villablanca et al., 2010).

(5) LXR_s et progression tumorale

Depuis l'identification en 1942 de l'enrichissement des niveaux de cholestérol dans les tumeurs solides (Swyer, 1942) et plus particulièrement les tumeurs prostatiques, un large panel de travaux a caractérisé le lien étroit existant entre le métabolisme lipidique et la progression de la pathologie tumorale. La proximité entre les couples LXR/cholestérol et cholestérol/cancer incite à étudier le rôle des LXR_s dans la carcinogenèse. Dans ce but, les premiers travaux entrepris ont permis d'associer les récepteurs à la régulation du cycle cellulaire (Fukuchi et al., 2004). Depuis, les fonctions des LXR_s et leur potentiel thérapeutique ont été caractérisés dans une variété de cancers. Ces fonctions sont notamment impliquées dans la régulation du métabolisme des stérols, du micro-environnement tumoral, des signalisations hormonales et de la différenciation cellulaire (**Figure 44**).

(a) LXR_s et inhibition du cycle cellulaire

Le rôle des LXR_s dans la régulation du cycle cellulaire de la tumeur prostatique constitue l'une des premières informations reliant l'activité des récepteurs à la diminution de

la prolifération de la cellule tumorale. Le mécanisme moléculaire a de plus été identifié. Ainsi dans des cellules LNCaP issues du cancer de la prostate, Fukuchi *et al.* montrent-ils que l'activation des LXR_s avec l'agoniste synthétique T0901317 diminue le pourcentage de cellules en phase S et active l'expression de la protéine p27^{KIP1} (Fukuchi et al., 2004). Cette dernière est un inhibiteur de la transition G1/S et sa disponibilité est principalement dépendante de la protéine SKP2 (*S-Phase Kinase-Associated Protein*), une E3-ubiquitine ligase s'associant à p27^{KIP1} pour cibler sa dégradation au protéasome. Le traitement à l'aide du T0901317 entraîne donc une diminution de l'expression de SKP2, stabilisant les niveaux protéiques de p27^{KIP1}. Une interférence ARN dirigée contre p27^{KIP1} bloque l'effet du T0901317 sur le retard de prolifération cellulaire, montrant le rôle central que p27^{KIP1} joue dans le mécanisme. Finalement lors de xénogreffes de cellules LNCaP, le traitement des souris à l'aide du T0901317 inhibe la croissance tumorale. Dans l'étude, les auteurs montrent que ce rôle n'est pas seulement applicable à la tumeur prostatique, puisque l'activation des LXR_s inhibe également la prolifération de lignées cellulaires issues du cancer du sein. De ce fait, l'expression rétrovirale des LXR_s dans des cellules mammaires MDA-MB435S, normalement insensibles au T0901317 et exprimant faiblement les récepteurs, entraîne une augmentation de l'accumulation protéique de p27^{KIP1}.

Ces dernières années, la fonction des LXR_s vis-à-vis du cycle cellulaire a pu être transposée à un large éventail de pathologies cancéreuses. Dans le cancer des ovaires, l'utilisation de ligands agonistes des LXR_s active l'expression de p27^{KIP1} et de p21^{CIP1}, appartenant à la même famille et altère la croissance cellulaire en induisant l'apoptose (Rough et al., 2010). De façon similaire, l'activation des LXR_s dans des cellules tumorales du côlon est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et des niveaux protéiques de SKP2 (Vedin et al., 2013). Une seconde étude indique que dans ce cancer, les LXR_s inhibent également l'activité de la voie WNT/β-caténine, qui garantit notamment la pluripotence cellulaire lors de la tumorigenèse (Uno et al., 2009). Une expérience de co-immunoprécipitation montre une liaison directe et inhibitrice des LXR_s au domaine Armadillo de la β-caténine. Ce domaine étant indispensable à la transduction du signal, les résultats mettent en évidence une diminution de différents gènes cibles de la voie, tels que *Myc*, *Mmp7* ou *Bmp4*, et une diminution de la prolifération cellulaire. De manière intéressante, la prolifération des cellules T leucémiques est inhibée par un traitement à l'aide d'agonistes des LXR_s, *via* des mécanismes également dépendants de p27^{KIP1}. Dans la même étude, les traitements induisent une apoptose de cellules B leucémiques (Geyeregger et al., 2009). Finalement, l'activation des LXR_s dans des cellules tumorales pancréatiques interfère

avec la prolifération cellulaire (Candelaria et al., 2014). Les auteurs indiquent que le traitement entraîne une diminution de l'expression du récepteur à l'EGF (*Epidermal growth factor*), apportant peut-être un lien fonctionnel entre les LXR_s et la régulation de protéines du cycle cellulaire telles que p27^{KIP1}.

(b) LXR_s et régulation des gènes métaboliques

La fonction physiologique principale des LXR_s est de réguler l'homéostasie lipidique *via* le ciblage de différents acteurs métaboliques. L'activation des récepteurs est, à travers l'expression de certains de ces acteurs, directement associée à l'inhibition de la progression tumorale.

L'altération de l'expression des transporteurs du cholestérol ABCA1 et ABCG1 (*ATP binding cassette A1/G1*) est par exemple corrélée à une augmentation de la prolifération de la cellule tumorale prostatique. Ainsi, les travaux de notre équipe ont déjà pu montrer qu'un traitement avec des agonistes des LXR_s, tels que le T0901317, entraîne une déplétion du cholestérol membranaire au niveau des radeaux lipidiques des cellules tumorales LNCaP (Pommier et al., 2010). Ce mécanisme est principalement dépendant de l'expression du gène cible des LXR_s *ABCG1*, et donc de l'activation du transport inverse du cholestérol hors de la cellule. Ce phénomène est associé à une diminution du contenu en cholestérol intracellulaire, interférant avec la coalescence des radeaux lipidiques. Ceci aboutit à une altération de la voie de survie cellulaire PI3K/AKT dont l'activité est initiée au niveau membranaire, et à une augmentation de l'apoptose. Le traitement des cellules avec du cholestérol exogène permet logiquement d'abolir les effets du T0901317. De manière similaire dans des cellules tumorales MCF-7 issues du cancer du sein, l'activation des LXR_s à l'aide de T0901317 et de 22(R)-hydroxy-cholestérol entraîne une déplétion du cholestérol intracellulaire associée à une augmentation de l'apoptose (El Roz et al., 2012). Les mécanismes sous-jacents n'ont pas été décrits mais illustrent encore l'importance de la régulation du cholestérol intracellulaire par les LXR_s dans la cellule tumorale.

Les effets anti-prolifératifs dépendant des LXR_s ont également été associés à l'expression d'acteurs impliqués dans la lipogenèse, tels que FASN (*Fatty acid synthase*). Par exemple, l'étude de Kim *et al.* montre un arrêt du cycle cellulaire à la suite de traitements avec les agonistes des LXR_s T0901317 et GW3965 dans des cellules prostatiques RWPE1 (Kim et al., 2010). Ceci est corrélé à l'accumulation de triglycérides dans la cellule. En lien, la suppression de FASN par interférence ARN contrecarre partiellement les effets

antiprolifératifs observés. Les résultats suggèrent une implication de l'activité lipogénique dépendante des LXRs dans la régulation du cycle cellulaire.

Les effets des LXRs sur les cellules de glioblastome impliquent également des cibles métaboliques. La mutation du récepteur à l'EGF (*Epidermal growth factor*) est un événement récurrent dans cette pathologie et favorise la progression tumorale. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont cependant mal identifiés. Une étude indique que l'agressivité tumorale chez des patients mutés pour l'EGFR est positivement corrélée à l'activation de l'axe PI3K/SREBP-1, induisant l'expression du récepteur aux LDLs (LDLR). De manière intéressante, l'activation des LXRs à l'aide de GW3965 *in vivo* dans un modèle murin de glioblastome entraîne une diminution de l'accumulation protéique du LDLR (Guo et al., 2011). La dégradation de celui-ci est en effet dépendante de l'expression du gène cible des LXRs *Idol*, une E3-ubiquitine ligase. En lien, l'administration du GW3965 aux souris diminue la croissance tumorale et suggère un potentiel thérapeutique des LXRs dans le traitement de la maladie.

Finalement, APOE (*Apolipoprotein E*) est une cible des LXRs qui est nécessaire à l'incorporation du cholestérol dans les HDLs. Cette protéine a été impliquée dans la suppression des métastases dérivées du mélanome de manière LXR-dépendante. Pencheva *et al.* ont ainsi montré que l'expression de LXR β est ubiquiste dans de multiples lignées cellulaires dérivées de patients et qu'un traitement avec des agonistes des LXRs inhibe l'invasion cellulaire *in vitro* (Pencheva et al., 2014). De plus, l'administration orale de ces agonistes supprime la croissance cellulaire de xénogreffes et diminue le réseau vasculaire de la tumeur et le nombre de métastases pulmonaires. Ce phénotype a principalement été relié à la régulation du gène *ApoE* par LXR β , car l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre APOE ou de souris invalidées pour le gène est capable de contrer l'effet anti-tumoral des LXRs.

(c) LXRs, immunité tumorale et micro-environnement

Les tumeurs peuvent échapper au système immunitaire par des mécanismes conditionnant leur micro-environnement. Parmi les différents moyens mis en place par la cellule tumorale pour y parvenir, la modulation de certaines voies métaboliques a été caractérisée. Cependant, les études ne montrent pas si le métabolisme des stérols induit lui aussi des effets immunosuppresseurs. Les fonctions des LXRs sur l'immunité incitent à évaluer leur potentiel vis-à-vis de l'immunosurveillance et de l'immunité tumorale.

Comme décrit précédemment, Villablanca *et al.* ont par exemple montré que les LXRs

pouvaient inhiber la maturation et la migration des cellules dendritiques au niveau des organes lymphoïdes, principalement en diminuant l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*), (Villablanca et al., 2010). Ainsi, les résultats indiquent-ils que la cellule tumorale relargue des agonistes des LXRs, inhibant l'expression de CCR7 dans les cellules dendritiques en cours de maturation. Cet événement permet à la tumeur d'échapper à l'immuno-surveillance. En lien, l'altération de l'activité des LXRs dans la tumeur restaure la réponse anti-tumorale dépendante des cellules dendritiques.

De façon opposée, des traitements à l'aide d'agonistes des LXRs induisent l'expression de l'interféron- γ par les macrophages, augmentant la survie d'animaux développant des tumeurs (Wang et al., 2014). Les LXRs stimulent donc également l'immuno-surveillance. En effet, Wang *et al.* caractérisent la présence de LXREs dans les régions promotrices du gène codant l'interféron- γ . *In vivo*, un traitement au T0901317 chez des souris sauvages augmente les taux circulants de l'interféron- γ , ainsi que son expression dans les ganglions et les poumons. Fonctionnellement, l'administration de T0901317 inhibe la croissance tumorale lors de greffes de carcinomes pulmonaires. Ces effets protecteurs sont en partie perdus dans des animaux invalidés pour l'interféron- γ , démontrant son rôle de médiateur dans l'effet obtenu après l'activation des LXRs. L'implication des LXRs dans l'immuno-surveillance est donc très complexe. Les réponses pourraient par exemple différer selon l'origine de la cellule tumorale, le profil de mutations qu'elle peut accumuler, ou la nature des métabolites du cholestérol produits.

Le compartiment endothélial constitue un paramètre important du micro-environnement tumoral, puisqu'il conditionne notamment la dissémination de la cellule cancéreuse. La voie du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) est une signalisation clé impliquée dans la régulation de l'endothélium. En effet, la liaison d'un ligand VEGF à son récepteur membranaire à activité tyrosine kinase favorise par exemple la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la migration, et la prolifération cellulaire, afin d'optimiser la genèse de l'arbre vasculaire (Ferrara et al., 2003). Le lien entre les LXRs et la voie du VEGF est directement dépendant de la capacité des récepteurs à modifier le contenu intracellulaire en cholestérol. En effet, l'activation du VEGFR est facilitée par la coalescence des radeaux lipidiques (Noghero et al., 2012). Ainsi, un traitement au T0901317 sur des cellules endothéliales inhibe-t-il l'expression de marqueurs impliqués dans la migration, la tubulogenèse, ou la prolifération, et ce en lien direct avec une altération de la structure des *rafts*. Les auteurs observent donc une diminution de la phosphorylation du récepteur au VEGF, associée à une mauvaise réimplantation de cellules endothéliales, traitées *ex vivo* avec

des ligands des LXR α s, dans le réseau vasculaire des souris. Enfin, ils indiquent que la qualité d'une greffe de carcinome pulmonaire chez la souris nude est altérée lors d'un traitement au T0901317, en raison d'une diminution de la structure vasculaire.

Finalement, Pencheva *et al.* montrent que l'action anti-tumorale des LXR α s dans le mélanome *via* l'induction d'APOE est également relayée par les cellules stromales. En effet, une inactivation de LXR β spécifiquement dans le stroma rend inefficace le rôle anti-tumoral des LXR α s après traitement, soulignant un rôle capital de l'isoforme β dans ce compartiment (Pencheva et al., 2014). Cette caractéristique a également été mise en évidence dans les tumeurs mammaires, où les agonistes des LXR α s induisent la sécrétion d'APOE par les macrophages, inhibant la prolifération cellulaire et activant l'apoptose (El Roz et al., 2013).

(d) LXR α s et régulation des signalisations hormonales

L'action des LXR α s sur le métabolisme hormonal et leur activité dans les cancers hormono-dépendants questionnent quant à un autre mécanisme d'action durant la progression tumorale. Des études récentes font par exemple le lien entre les LXR α s et la voie des androgènes. En effet, les LXR α s sont capables d'interférer avec la signalisation androgénique principalement en induisant l'expression d'une enzyme impliquée dans le catabolisme des androgènes, SULT2A1 (*Sulfotransferase 2a1*) (Lee et al., 2008). Les sulfotransférases sont importantes dans l'élimination des androgènes et catalysent l'ajout d'un groupement sulfonyl à l'hormone, l'empêchant de se lier à AR. Les auteurs montrent qu'une activation pharmacologique des LXR α s chez la souris induit l'expression de *Sult2a1*, réduisant *in fine* l'activité de la signalisation androgénique. L'activation des LXR α s inhibe également l'expression d'une enzyme stéroïde sulfatase au sein de la prostate, prévenant la conversion locale d'androgènes sulfonés en métabolites actifs. Enfin *in vitro*, une activation pharmacologique des LXR α s inhibe la prolifération de lignées tumorales prostatiques d'une manière SULT2A1-dépendante (Lee et al., 2008).

Des résultats similaires ont été obtenus dans le cadre de la signalisation estrogénique. En effet, l'activation pharmacologique des LXR α s chez la souris induit l'accumulation de l'enzyme du catabolisme estrogénique SULT1E1 (*Sulfotransferase 1e1*) dans le foie. Ce mécanisme inhibe par exemple la prolifération de l'épithélium utérin, dont la croissance est dépendante des oestrogènes (Gong et al., 2007). L'activation des récepteurs inhibe également la croissance de cellules tumorales mammaires en xénogreffe et est corrélée à l'augmentation de l'expression de SULT1E1. De plus, la délétion du gène *Sult1e1* chez la souris abolit l'effet des LXR α s sur le catabolisme estrogénique. Une seconde étude montre que l'activation des

LXR α dans des cellules tumorales mammaires ER $^{+}$ (*Estrogen receptor*) inhibe l'accumulation transcriptionnelle et protéique de l'isoforme ER α (Vedin et al., 2009). Les LXR α interfèrent donc avec une voie majeure de la progression tumorale dans le cancer du sein.

Ces résultats illustrent de nouvelles interactions entre les signalisations hormonales et les LXR α . Ces derniers pourraient alors contribuer au traitement et à la prévention des cancers hormono-dépendants tels que le cancer de la prostate.

(e) LXR α , différenciation cellulaire et potentiel invasif tumoral

Dans une cellule, le passage d'un état épithélial à un phénotype mésenchymateux entraîne une augmentation des capacités invasives, notamment *via* l'acquisition de nouvelles propriétés adhésives et migratrices. Comme décrit précédemment dans l'introduction, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) constitue un événement clé de cette transformation. L'augmentation de l'EMT durant la carcinogenèse est donc associée à une aggravation de la progression tumorale (Nauseef and Henry, 2011). Parmi les acteurs moléculaires favorisant ce processus, on retrouve notamment la voie du TGF β , qui est de surcroît déterminante dans la progression des phases tardives du cancer de la prostate (Cao and Kyprianou, 2015). Ainsi, la littérature suggère-t-elle l'implication des LXR α dans l'inhibition de l'EMT, et ces résultats sont-ils également corrélés à une modification de la signalisation du TGF β . En 2002, Mo *et al.* ont été les premiers à montrer une interaction directe entre les LXR α et le récepteur 1 au TGF β . En effet dans des cellules endothéliales *in vitro*, le domaine cytoplasmique du TGF β R1 est capable de se lier à LXR α . Cette liaison, conduisant dans un premier temps à la phosphorylation de LXR α , aboutit au final à une inactivation indépendante de la transcription du TGF β R1 (Mo et al., 2002). Dans un second temps, la bibliographie indique que les souris invalidées pour les deux isoformes des LXR α présentent, au sein de la prostate ventrale, une augmentation des SMADs phosphorylées, témoignant de l'activation de la voie du TGF β . Cette observation est corrélée à une accumulation du facteur de transcription SNAI, impliqué dans la promotion de l'EMT (Kim et al., 2009). Très récemment, Carthy *et al.* ont mis en évidence un rôle des LXR α dans la plasticité épithéliale des fibroblastes et des cellules tumorales HCC (*Hepatocellular carcinoma*) issues de l'hépatocarcinome (Carthy et al., 2016). L'activation pharmacologique des LXR α inhibe la transition des fibroblastes vers un phénotype myofibroblastique et la progression des cellules HCC vers un phénotype mésenchymateux. Les auteurs expliquent ces résultats principalement par l'existence d'une inhibition de la voie du TGF β par LXR α .

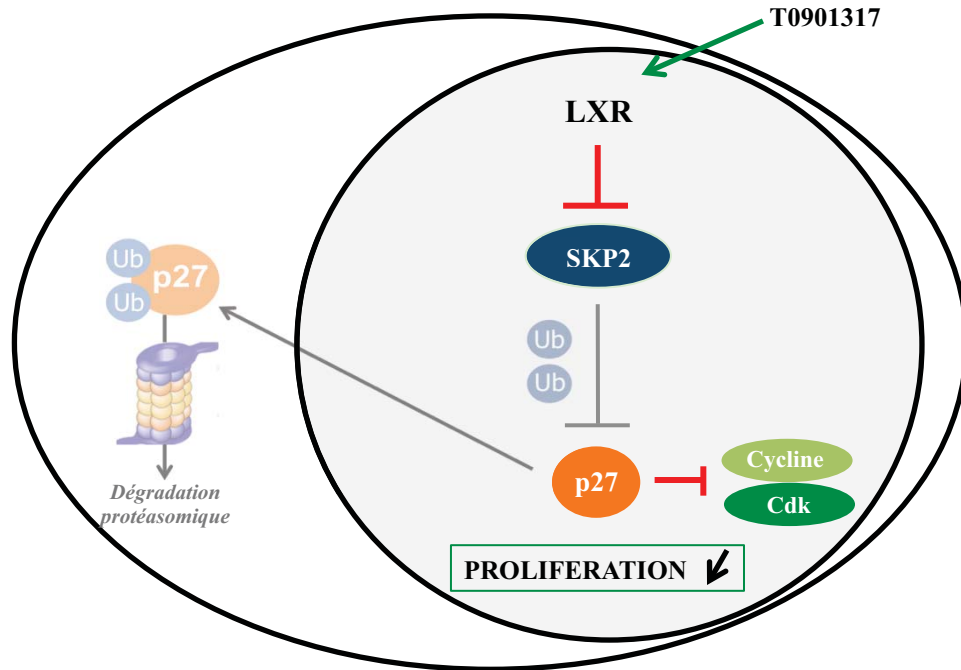
Même si le mécanisme moléculaire exact n'est pas encore élucidé, ces travaux illustrent le rôle protecteur des LXRs vis-à-vis de l'EMT *in vitro*.

Ensemble, les données bibliographiques définissent un lien entre les LXRs et la plasticité cellulaire, caractérisant donc une nouvelle fonction dépendante des récepteurs à explorer dans le cadre de la pathologie tumorale.

Pour conclure, les LXRs font l'objet d'études fournies depuis leur découverte. La disponibilité de différents ligands naturels et synthétiques favorise la réalisation d'études mécanistiques et de recherches translationnelles. Un certain nombre d'évidences relie ces récepteurs aux pathologies tumorales, notamment celles manquant de thérapies efficaces. L'accumulation des différents travaux réalisés depuis une vingtaine d'années illustre déjà les LXRs comme des récepteurs aux fonctions complexes et multiples au sein du cancer. L'utilisation de souris invalidées pour les LXRs, en combinaison avec des modèles génétiques de tumorigenèse, est fondamentale afin de continuer à résoudre les questions concernant leur rôle dans la tumeur et le micro-environnement tumoral.

PROJET DE
RECHERCHE

INHIBITION DE LA PROLIFERATION



ACTIVATION DE L'APOPTOSE

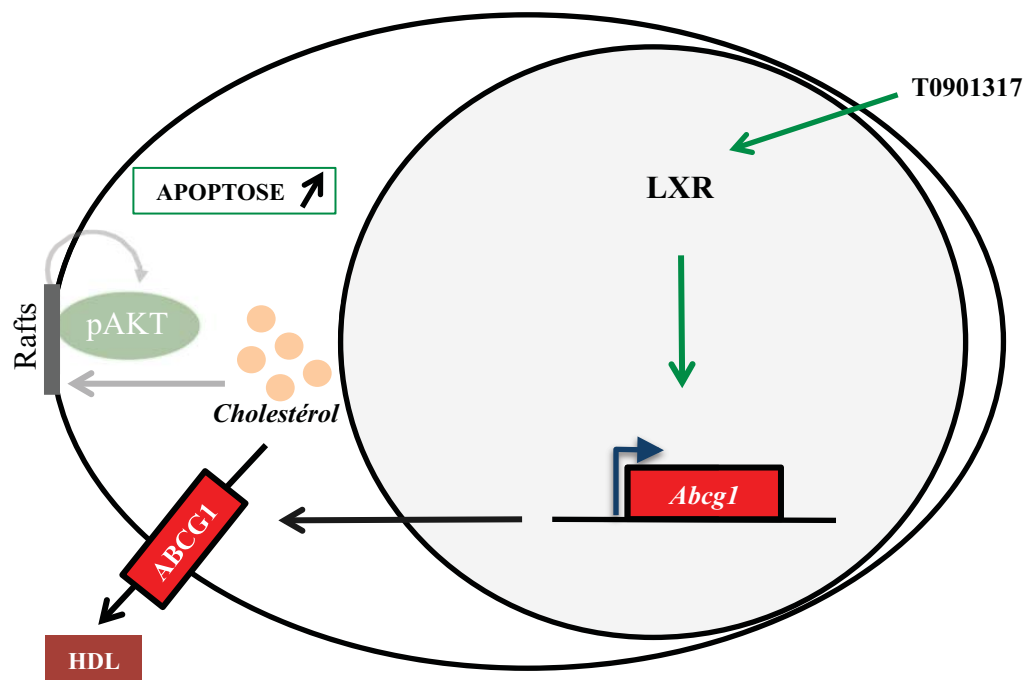


Figure 45 : Les LXR sont des acteurs modulant la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales prostatiques *ex vivo*

(A) Dans des modèles cellulaires d'adénocarcinome prostatique (LNCaP), les LXRs sont capables de diminuer la prolifération cellulaire, notamment en régulant la dégradation de p27KIP1, dépendante de SKP2. (B) Les LXRs ont un rôle pro-apoptotique par l'intermédiaire d'une diminution du taux de cholestérol membranaire, responsable d'une forte répression de la voie de survie cellulaire PI3K/AKT, dépendante des rafts. *Modifié d'après Fukuchi et al., 2004 (A) ; Pommier et al., 2010 (B).*

Le cancer de la prostate est un adénocarcinome d'origine épithéliale. En France, il représente le premier cancer diagnostiqué et la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme. Son incidence (125 cas pour 100 000 en 2011) ne cesse d'augmenter ces dernières décennies (+ 8,5% entre 2000 et 2005) (Siegel et al., 2013). Chez les patients, la privation androgénique demeure la thérapie de choix et se manifeste par une apoptose cellulaire rapide dans la prostate tumorale et une régression de l'agressivité au sein des sites primaires et secondaires, mais un phénomène de résistance à la castration (CRPC) conduit à une croissance incontrôlable de la maladie par les traitements anti-hormonaux (Belot et al., 2008). L'identification des altérations génétiques et des processus majeurs impliqués dans le contrôle et la promotion de la maladie est donc capitale afin de mettre en place des thérapies alternatives.

Concernant l'étiologie complexe de cette maladie, des études épidémiologiques ont permis de relier le cholestérol au développement tumoral. Ainsi, les tumeurs solides sont-elles caractérisées par une quantité anormalement importante de cholestérol (White, 1909; Swyer, 1942). L'élévation du cholestérol sanguin est associée à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate, et plus particulièrement un cancer dit « de haut-grade » (Pelton et al., 2012). Enfin, l'utilisation de molécules visant à réduire les taux de cholestérol sur de longues périodes, comme les statines (inhibiteurs de la synthèse *de novo* du cholestérol), est corrélée à une diminution du risque de développer une forme agressive de cancer de la prostate (Graaf et al., 2004; Shannon et al., 2005). Même si les fonctions moléculaires et les mécanismes d'enrichissement exacts du cholestérol dans les tumeurs restent à élucider, les données de la littérature convergent vers un rôle dans la progression du cancer : le cholestérol peut alors être considéré comme un indicateur pertinent de l'agressivité de la maladie.

Les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β sont identifiés comme d'importants « senseurs » et régulateurs du métabolisme du cholestérol. L'utilisation d'agonistes pharmacologiques des LXRs sur des cellules tumorales prostatiques humaines en culture entraîne des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques. Ces propriétés sont associées à l'augmentation de la quantité des transporteurs ABCA1 et ABCG1 permettant l'efflux de cholestérol (Fukuchi et al., 2004; Pommier et al., 2010). *In vivo*, l'administration orale de T0901317 à des souris immunodéficientes xénotreffées avec des cellules LNCaP ralentit la croissance des tumeurs (Pommier et al., 2010) (**Figure 45**). Par ailleurs, il est possible d'inhiber la phosphorylation d'AKT dans les radeaux lipidiques des cellules LNCaP en activant les LXRs (Pommier et al., 2010). L'ajout de cholestérol exogène annule ces effets,

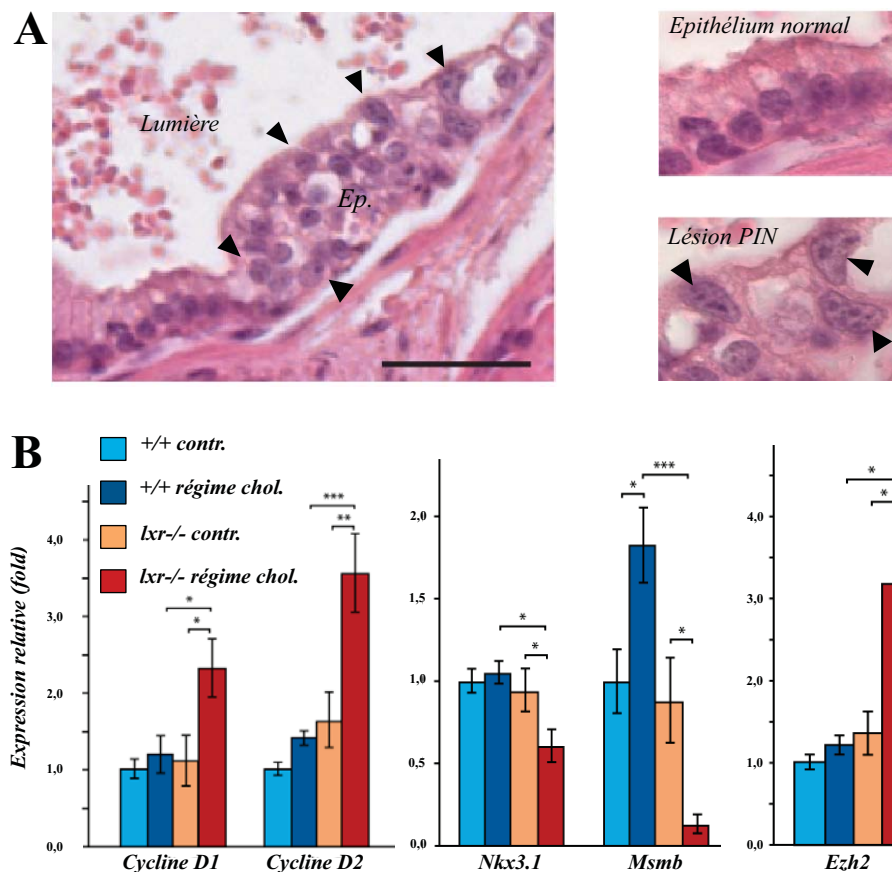


Figure 46 : Les LXRs protègent de la néoplasie intra-épithéliale prostatique chez la souris *Lxra* β ^{-/-}

(A) Coupes histologiques de lobes prostatiques dorsaux de souris sauvages (+/+) et *Lxra* β ^{-/-} (5 mois) nourries avec un régime contrôle (contr.) ou riche en cholestérol (régime chol.). La structure histologique a été analysée après coloration Hématoxyline-Eosine (HE). Les tissus des individus nourris avec le régime présentent des cellules avec un large noyau et un nucléole proéminent, typique d'un stade de néoplasie intra-épithéliale (PIN) (têtes de flèche) (Barre d'échelle = 50 μ m). (B) Des analyses par qPCR montrent une corrélation de l'apparition de PIN avec l'accumulation des transcrits des gènes *Cyclin D1/D2* et du marqueur d'agressivité tumorale *Ezh2*, associée à la baisse du niveau des transcrits des gènes suppresseurs de tumeurs *Nkx3.1* et *Msmb*. La normalisation est réalisée par le gène *36b4*. Test t de Student, *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001. Ep : Epithélium. D'après Pommier et al., 2013.

démontrant que le cholestérol est un modulateur clé dans ce processus. Notre équipe a de plus illustré le rôle des LXRs dans l'initiation de la physiopathologie prostatique. En effet, l'ablation génomique des récepteurs, associée à un stress métabolique, entraîne l'émergence de lésions néoplasiques prostatiques (Pommier et al., 2013). Ce phénotype est corrélé à l'augmentation des transcrits des *cyclines D1* et *D2* et du marqueur d'agressivité *Ezh2*, ainsi qu'à l'altération de l'expression des suppresseurs de tumeurs *Nkx3.1* et *Msmb* (*Beta-microseminoprotein*) (**Figure 46**). L'ensemble de ces données suggère que les LXRs sont des acteurs modulant la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales prostatiques, et qu'ils protègent l'épithélium prostatique de l'apparition de lésions néoplasiques. De manière intéressante, des études réalisées dans d'autres types de cancers, tels que le mélanome, ont montré que les LXRs étaient également capables de diminuer la capacité métastatique de la cellule tumorale (Pencheva et al., 2014) (**Figure 47**). La caractérisation de l'implication des récepteurs dans la progression du cancer de la prostate *in vivo* est donc capitale.

En se basant sur ces différents constats, nous avons décidé d'étudier le rôle des LXRs *in vivo* dans un modèle murin récapitulant les différentes étapes de l'adénocarcinome prostatique. Ce travail de recherche s'organise autour de trois questions majeures regroupées au sein de deux articles en cours de soumission : **i) Quel est le statut du métabolisme du cholestérol dans un modèle murin de cancer de la prostate invalidé pour le suppresseur de tumeur *Pten* ? ; ii) Quel est l'impact de la modulation du statut des LXRs sur les capacités métastatiques des cellules tumorales dans le modèle *Pten*^{-/-} ? ; iii) Les LXRs sont-ils capables d'inhiber des voies pro-métastatiques au sein de la tumeur prostatique ?**

I) Quel est le statut du métabolisme du cholestérol dans un modèle murin de cancer de la prostate invalidé pour le suppresseur de tumeur *Pten* (Article 1) ?

Comme décrit précédemment, les données de la littérature caractérisent un enrichissement du cholestérol en contexte tumoral, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont très peu décrits. Afin d'analyser plus précisément les processus expliquant une élévation de ces métabolites dans la cellule tumorale prostatique *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser les souris *PBcre4 x PtenloxP/loxP* (*Pten*^{-/-}) (Wang et al., 2003), puisque PTEN est retrouvé muté dans 60 % des tumeurs prostatiques. Ces animaux présentent une inactivation du gène suppresseur de tumeur *Pten* spécifiquement au sein de l'épithélium prostatique et

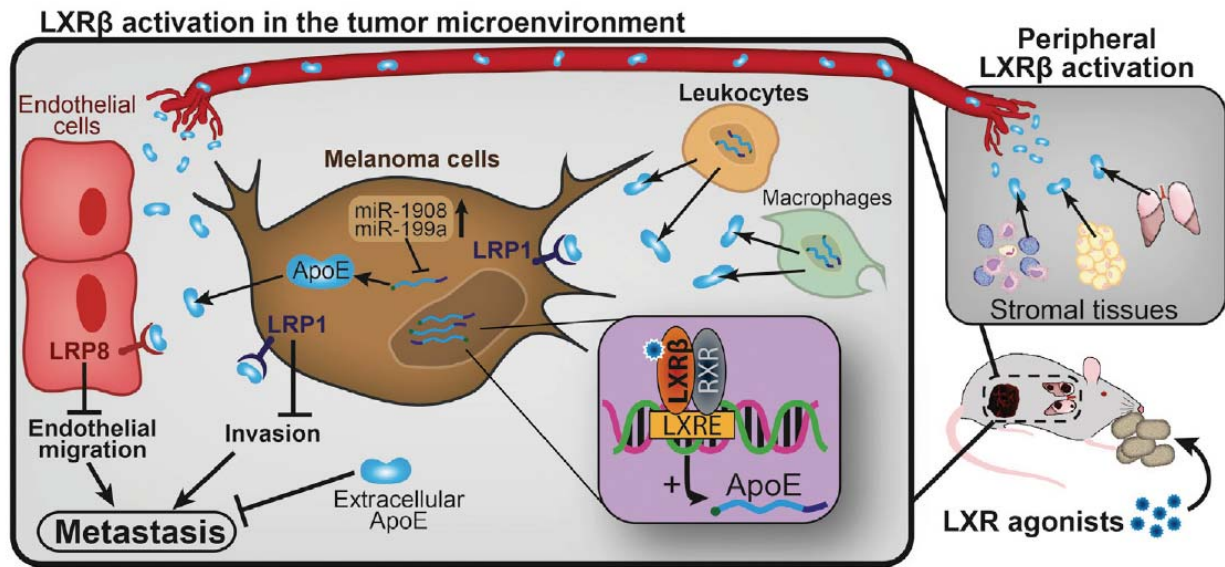


Figure 47 : Inhibition de la progression du mélanome par activation de LXRβ

Les auteurs apportent la preuve que les LXRs représentent des cibles clés dans le traitement du mélanome. Une administration orale de différents agonistes des récepteurs supprime l'angiogenèse, la progression tumorale et les métastases. Des expérimentations moléculaires et génétiques indiquent que ces effets sont spécifiques de l'isoforme β et médiés par l'activation transcriptionnelle de *ApoE* (*Apolipoprotein E*) au sein de la tumeur et du stroma. L'activation des LXRs inhibe fortement la croissance tumorale et les métastases dans différentes lignées tumorales de mélanome. Le ciblage de LXRβ prolonge efficacement la survie des animaux et empêche la progression des métastases établies. *Figure extraite de Pencheva et al., 2014.*

constituent le modèle transgénique le plus proche de la pathologie humaine. Les résultats obtenus montrent une accumulation des niveaux intraprostatiques de cholestérol lors de la perte de PTEN, expliquée par une augmentation de la synthèse *de novo*. Cet événement est plus précisément dépendant de l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT et de son action sur la maturation protéique de SREBP2. Ces analyses ont donc permis de caractériser la mise en place d'une cascade PI3K/AKT-SREBP2-Cholestérol à la suite de la perte du suppresseur de tumeur PTEN. Autrement dit, l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT dans la cellule épithéliale prostatique des souris *Pten*^{-/-} entraîne une augmentation de l'activité du facteur de transcription SREBP2 et donc la synthèse *de novo* du cholestérol.

II) Quel est l'impact de la modulation du statut des LXRs sur les capacités métastatiques des cellules tumorales dans le modèle *Pten*^{-/-} (Article 1) ?

Les résultats obtenus précédemment nous ont conduits à évaluer le rôle des LXRs dans des phases avancées de la carcinogenèse prostatique. En effet, chez les souris *Pten*^{-/-}, nous avons pu associer de manière directe l'élévation de la quantité de cholestérol intra-prostatique à l'augmentation de différents agonistes des LXRs, entraînant une activation des récepteurs. La seconde étape était de comprendre l'impact de l'activation des LXRs sur la croissance de la tumeur prostatique. Les fonctions pro-apoptotiques et anti-prolifératives démontrées *in vitro* dans la littérature suggèrent un rôle de « gatekeeper ». Ainsi, nous avons décidé de comparer la cinétique et l'agressivité de la carcinogenèse prostatique entre des souris uniquement invalidées pour *Pten* et un autre modèle à la fois invalidé pour *Pten* et pour *Lxrα* et β . La perte des LXRs en contexte mutant pour *Pten* entraîne alors une nette accélération de la progression tumorale dans le site primaire, caractérisée par la hausse d'expression de marqueurs du cycle cellulaire, du nombre de carcinomes invasifs et de marqueurs de mauvais pronostic tels que EZH2 (*Enhancer of zest homolog 2*), la Clusterine, ou encore SPP1 (*Secreted Phosphoprotein 1*). Le phénotype des souris est caractérisé par une dissémination systématique dans les ganglions lymphatiques et les poumons, aboutissant à une diminution du taux de survie. Ainsi, ce projet démontre-t-il pour la première fois que la mobilisation des LXRs lors de la carcinogenèse prostatique est impliquée dans les mécanismes limitant la progression tumorale.

III) Les LXR sont-ils capables d'inhiber des voies pro-métastatiques au sein de la tumeur prostatique ? (Article 2) ?

Ces travaux impliquent de comprendre de quelle manière les LXRs sont capables de réguler la dissémination métastatique. Parmi les différentes pistes envisagées, mon projet s'est focalisé sur le lien entre les récepteurs LXRs et la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, l'analyse des souris *Ptenlxr^{-/-}* a montré une augmentation très importante de l'accumulation des différents marqueurs clés de l'EMT dans la prostate. Ces résultats peuvent en partie expliquer la hausse de l'agressivité intra-prostatique et surtout la fréquence des métastases chez ces animaux. L'inhibition des processus d'EMT par les LXRs a pu être confirmée dans un premier temps *in vitro* en activant les récepteurs à l'aide d'agonistes spécifiques. Inversement, l'inhibition forcée de l'activité des LXRs dans les lignées tumorales prostatiques utilisées (PC3, DU145) est associée à une expression importante des différents marqueurs moléculaires de l'EMT. Dans l'optique de rechercher un lien fonctionnel entre les LXRs et l'EMT, nous nous sommes intéressés à la voie du TGF β . Comme décrit en introduction, cette signalisation favorise, notamment lors de la tumorigenèse prostatique, des processus tels que la transition épithélio-mésenchymateuse (Cao and Kyprianou, 2015). Ainsi, Mo *et al.* ont démontré une interaction entre le récepteur du TGF β et LXR β aboutissant à l'inactivation du TGF β R1 (Mo et al., 2002). En effet, les auteurs indiquent que le domaine cytoplasmique du TGF β R1 se lie à LXR β *in vitro* et *in vivo* au sein de la cellule endothéliale murine, aboutissant à une diminution de l'activité de la voie du TGF β . En lien, les souris invalidées pour les deux isoformes des LXRs présentent une augmentation de l'activité de la signalisation du TGF β , illustrée par l'accumulation des SMADs phosphorylées (Kim et al., 2009). Ainsi, l'utilisation d'un anticorps neutralisant (MAB1835, RnD Systems) contre les ligands de la voie du TGF β inhibe efficacement l'EMT chez les souris *Ptenlxr^{-/-}*, mais diminue surtout la fréquence et l'étendue des métastases pulmonaires. Un axe fonctionnel où les LXRs inhibent l'EMT par l'intermédiaire de la voie du TGF β a finalement été validé *in vitro*, en utilisant des stratégies combinant l'utilisation d'agonistes des LXRs et d'un dominant positif du récepteur du TGF β , ou des siRNA contre les LXRs en présence d'un dominant négatif du récepteur du TGF β .

Nos travaux identifient donc pour la première fois, *in vivo* au sein du cancer de la prostate, un mécanisme moléculaire dépendant des LXRs inhibant la dissémination métastatique.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Liver X Receptors constrain tumor development and metastasis dissemination in PTEN-deficient prostate cancer.

Présentation du contexte scientifique

La reprogrammation métabolique de la cellule tumorale prostatique est un événement nécessaire en réponse à ses besoins énergétiques croissants (Schulze and Harris, 2012). Dans le cas des tumeurs prostatiques, une dérégulation du métabolisme lipidique est observée, plus particulièrement du cholestérol. Cet aspect est conforté par les données de la littérature indiquant que le cholestérol est associé depuis de nombreuses années au degré d'agressivité des tumeurs (Swyer, 1942; Pelton et al., 2012; Shafique et al., 2012). Les adaptations métaboliques au sein de la cellule tumorale prostatique peuvent donc être représentatives de l'agressivité du cancer.

L'étude des molécules qui interagissent et/ou régulent l'homéostasie du cholestérol représente donc une perspective intéressante. Les LXRs, par la nature de leurs ligands de type oxystérols, sont capables de jauger les quantités intracellulaires de cholestérol. L'implication des LXRs dans la physiopathologie prostatique a déjà été démontrée par notre équipe. En effet, l'invalidation des récepteurs, associée à un stress métabolique, entraîne l'émergence de lésions néoplasiques prostatiques (Pommier et al., 2013). Par ailleurs, l'activation des LXRs dans des lignées tumorales prostatiques, telles que les cellules LNCaP, inhibe la prolifération en perturbant la coalescence des radeaux lipidiques. Ce phénomène altère par conséquent l'activité de voies de signalisation initiées à la membrane telles que la voie PI3K/AKT (Pommier et al., 2010). Cependant, la question du rôle des LXRs durant les phases tardives de la carcinogenèse prostatique, et plus particulièrement la dissémination métastatique, n'a jamais été posée.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser des souris invalidées pour le suppresseur de tumeur *Pten* spécifiquement au sein de l'épithélium prostatique, entraînant alors une activation constitutive de la voie PI3K/AKT (Wang et al., 2003). L'utilisation de ces animaux confère deux avantages : i) peu de métastases sont développées, laissant supposer l'existence de mécanismes protecteurs et permettant une étude d'aggravation phénotypique ;

ii) la perte de *Pten* a déjà été mise en lien avec une altération des niveaux de cholestérol *in vitro* sur différentes lignées tumorales prostatiques (Yue et al., 2014).

Trois questions ont été posées :

1) L'homéostasie du cholestérol intra-prostatique des souris *Pten*^{-/-} est-elle altérée ?

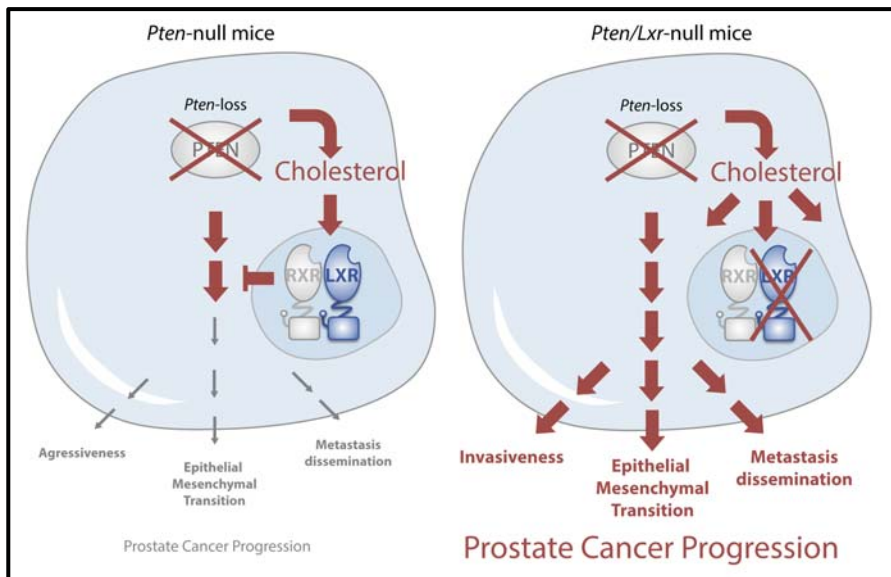
2) L'activité des LXRs est-elle modifiée lors des stades avancés de la carcinogenèse ?

3) Les récepteurs LXRs sont-ils impliqués dans le processus de dissémination métastatique du cancer de la prostate ?

Article 1

Liver X Receptors constrain tumor development and metastasis dissemination in PTEN-deficient prostate cancer.

Graphical Abstract



Authors

Anthony ALIOUI, Julie DUFOUR,... ,
Jean-Marc A. LOBACCARO, Noam
ZELCER and Silvère BARON

Correspondence

Baron Silvère
Lobaccaro Jean-Marc A.

In Brief

Alioui et al. examine crosstalk between PTEN and Liver X Receptors in prostatic carcinoma. PTEN-loss enhances activity of these nuclear receptors in prostatic tumor. This represents a defensive mechanism in face of tumor development. Genetic ablation of LXRs in PTEN-null carcinoma results in a dramatic increase of tumor invasiveness and metastatic dissemination.

Highlights

- PTEN-loss enhances LXR target gene program expression in human PCa.
- Lxr ablation in *Pten*-mutant mice results in the progression of PCa in metastatic state.
- PTEN-loss results in cholesterol de novo synthesis increase leading to generate LXR ligands in prostatic tumor cells.

SUBMITTED...

Article 1

Liver X Receptors constrain tumor development and metastasis dissemination in PTEN-deficient prostate cancer.

Anthony ALIOU^{1,2,3,4}, Julie DUFOUR^{1,2,3,4}, Valerio LEONI⁵, Anke LOREGGER⁶, Martina MOETON⁶, David VOLLE^{1,2,3,4}, Jean---Marc A. LOBACCARO^{1,2,3,4}, Noam ZELCER⁶ and Silvère BARON^{1,2,3,4}

¹Clermont université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F63000 CLERMONT-FERRAND, France

²CNRS, UMR 6293, GReD, F-63178 AUBIERE, France

³INSERM, UMR 1103, GReD, F-63178 AUBIERE, France

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

⁵Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital of Varese, AST_Settelaghi, VARESE, Italy,

⁶Department of Medical Biochemistry, Academic Medical Center, AMSTERDAM, 1105 AZ, The Netherlands

Corresponding authors: Baron Silvère PhD., and Lobaccaro Jean-Marc A. PhD.,

SUMMARY

Advanced prostate cancer (PCa) is a clinical challenge as this state of the disease lacks of curative therapeutic. We exploited mouse models to decipher mechanisms able to constrain cancer evolution in response to genetic alteration that occurs in PCa, namely loss of PTEN. Careful analysis of transcriptomic signature of Pten-loss in prostate mouse carcinomas reveals activation of the LXR target gene signature. LXR deletion in a Pten-null context in mouse prostate results in an increase of PCa invasiveness and metastatic dissemination. PTEN deletion governs LXR transcriptional activity through deregulation of cholesterol de novo synthesis that leads to the accumulation of LXR ligands. According to these observations, pharmacological inhibition of cholesterol biosynthesis using statins abolishes LXR target gene expression in response to PTEN-loss. LXR deletion triggers an increased in the epithelial mesenchymal transition process and matrix metalloproteinase accumulations that could explain metastatic spreading. Such mobilization of LXR activity is found in human PCa with PTEN-loss. This work promotes LXRs as relevant therapeutic targets.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequently diagnosed cancers in Western countries and the second leading cause of cancer death in men (Siegel et al., 2015). Clinical management of this cancer is complex especially in the metastatic state of the disease. Therefore, to develop effective therapeutic strategies to treat PCa and to prevent metastatic dissemination a better understanding

of metastasis and resistance mechanisms in PCa is necessary. Cancer cells adapt their metabolic program, most notably by strongly increasing biosynthesis of key cell components in order to fuel rapid growth (Schulze and Harris, 2012). Accordingly, the metabolism of cholesterol, which provides an important building block for cellular membranes, is subject to reprogramming in cancer cells. As such, therapeutic targeting of members of the nuclear receptors transcription factor family that are able to bind

Significance

Cancer transformation is associated with various metabolic adaptations. Among them, cholesterol and derivatives accumulation emerge as key molecules that drive cancer progression towards invasiveness and metastatic dissemination. Using transgenic mouse models invalidated for both *Pten* in prostate gland and *Lxra/β*, we provide a useful model in which deregulation of cholesterol homeostasis leads to the development of metastatic PCa. By deciphering the phenotype of these mice, we explore the molecular mechanisms that rely genetic alteration such as loss of PTEN, cholesterol metabolic pathway and promotion of PCa. Our investigations underline that targeting LXR agonism could cooperate with PI3K pathway inhibition strategy and represent a promising therapeutic approach to fight against advanced PCa.

sterols and regulate cholesterol metabolism is of interest. Amongst these, the liver X receptors (LXRs) represent pivotal sensors of the cellular sterol status owing to their ability to bind oxysterols, oxidized cholesterol derivatives, which are of particular importance in the prostate (De Boussac et al., 2013). Reflecting their role in prostate physiology, both LXR isoforms (NR1H3, LXR α and NR1H2, LXR β) have been shown to protect prostatic epithelium from neoplasia in response to a high cholesterol diet (Pommier et al., 2013).

The loss of PTEN, and as a result alterations in the PI3K/AKT pathway, is the most frequently observed mutation in PCa (Taylor et al., 2010), but the link between this event and cholesterol metabolism has been largely overlooked. A recent study identified cholesterol ester accumulation induced by PTEN-loss, which correlated with an increase of Pca aggressiveness (Yue et al., 2014). Despite the high frequency of PTEN deletion in PCa, a mouse model with prostate intraepithelial specific deletion (*Pten*^{pc-/-}) recapitulates the establishment and progression of the human disease, but exhibits minimally invasive and metastatic features (Chen et al., 2005; Ma et al., 2005; Trotman et al., 2003; Wang et al., 2003). This suggests the existence of other genetic factors that limit the metastatic capacity of PCa in the face of *Pten*-loss, as recently demonstrated for *Smad4* in *Pten*^{pc-/-} mice (Ding et al., 2011).

Herein we demonstrate that LXRs act as potent tumor suppressors of PTEN-dependent carcinogenesis in the prostate. LXR ablation in *Pten*^{pc-/-} mice results in aggressive prostatic lesions and systemic metastasis. Our findings provide strong evidence that LXRs in vivo constrain prostatic adenocarcinoma in response to metabolic reprogramming of sterol metabolism by cancer cells.

RESULTS

LXRs act as suppressors of *Pten*-null prostate tumor progression

We have previously reported that LXRs negatively control prostate intraepithelial neoplasia (PIN) in vivo (Pommier et al., 2013). However, PIN represents an early stage of Pca and we were therefore interested to extend our studies to the role of LXRs in prostatic adenocarcinoma. To evaluate activation of the LXR-controlled transcriptional program in prostate tumors we determined the expression of a canonical set of LXR target genes in prostates derived from control (*Pten*^{pc/L β}) and prostate specific *Pten*-null (*Pten*^{pc-/-}) mice. Consistent with an earlier transcriptomic study, we find substantial increased accumulation of the established LXR target ABCA1 (Wang et al., 2003), as well as of FASN and APOE in prostates from *Pten*^{pc-/-} (Figure 1A,B). Importantly, dysregulated LXR signaling in these mice is LXR-dependent as it is lost in *Pten*^{pc-/-}*Lxra* β ^{-/-} mice (Figure 1B, S1A,B). The effect of *Pten*-loss on LXR is not limited to ABCA1, FASN and APOE, as we find that other LXR-regulated genes display aberrant expression (Figure 1C, S1C). These changes do not represent global deregulation of metabolic gene expression, as a panel of other important metabolic genes remain unchanged (Figure 1D), and is also not the result of alterations in the expression levels of *Lxra* and/or *Lxr* β in mouse prostates (Figure 1E). To investigate the role played by LXRs in prostate carcinogenesis, we next studied the impact of their deletion in vivo in the context of *Pten*^{pc-/-} mice.

Macroscopic analyses of prostates revealed that loss of *Lxrs* resulted in a strong increase in gland size (Figure 1F,) and weight (Figure 1G). Importantly, *Lxra* β ^{-/-} control littermates did not exhibit any prostate phenotype, demonstrating the loss of *Lxrs* is not intrinsically a carcinogenic event (Figure S1D-F). Consistent with the prostatic phenotype, *Pten*^{pc-/-}*Lxra* β ^{-/-} mice have substantially decreased survival as compared to *Pten*^{pc-/-} mice (Figure 1H). The $\pm 35\%$ decreased life span in these mice was unexpected and prompted us to evaluate the occurrence of metastasis, which have been previously reported to be uncommon in *Pten*^{pc-/-} mice. Interestingly, pathological analysis of distant organs showed a high frequency of metastatic spread (Figure 1I, J, S1G), as evident from the presence of CK18- and PCSA- positive nodules in *Pten*^{pc-/-}*Lxra* β ^{-/-} mouse lungs and lymph nodes (Figure 1K). These observations stand in stark contrast to what we observed in *Pten*^{pc-/-} mice, which rarely develop metastasis before one year of age. Taken together these results provide strong in vivo evidence that genetic activation of LXRs, as observed in PTEN-deficient prostate cancer, represents a potent tumor-suppressive mechanism that constrains cancer progression and dissemination.

PTEN deletion governs LXR transcriptional activity through PI3K/AKT transduction pathway

To investigate the mechanism linking PTEN and LXRs we took advantage of the availability of cell lines derived directly from mouse prostate, MPECs (Mouse Prostatic Epithelial Cells), we previously described (Dufour et al., 2013) (Figure S2A,B). Expression of LXR target-genes was increased in the absence of PTEN in MPECs (Figure 2A,B, S2C), thus underlying a functional link between PTEN deletion and LXR activity in tumor epithelial cells. To extend this observation to the human setting we investigated PTEN - negative cell lines derived from human prostate cancer. First, we used LNCaP cells that have been genetically engineered to express a Doxycycline inducible PTEN-GFP fusion protein (LNCaP-PTEN) (van Duijn et al., 2010). Remarkably, induction of this construct leads to a marked concomitant decrease in ABCA1 protein in these cells (Figure 2C,D, S2D). This effect is not limited to ABCA1 as additional LXR-regulated genes responded similarly (Figure 2E). To test if the effect of PTEN on LXR signaling depends on its intrinsic phosphatase activity we transfected LNCaP cells with expression constructs encoding either wild-type or catalytically inactive PTEN (PTEN C124A). Whereas expression of wild-type PTEN decreased LXR-regulated gene levels, the catalytic mutant failed to do so (Figure 2F, S2E). Accordingly, mutant PTEN was unable to decrease the level of APOE and FASN protein in these cells (Figure 2G). Similar results were obtained using PC3 cells, a second PTEN-negative cell line (Figure S2F-H). Collectively, these results demonstrate that PTEN's intrinsic phosphatase activity is an important determinant of LXR signaling. As this activity is recognized to control PI3K/AKT signaling (Tamura et al., 1998), we reasoned that this pathway may link PTEN and LXR. Consistent with this idea, LNCaP and PC3 cells treated with two different PI3K inhibitors, Wortmannin and LY294002, exhibited decreased expression of LXR target genes (Figure 2H,I, S3A-D). To further substantiate the role of PI3K/AKT in regulating LXR signaling, we made use of a dominant negative AKT construct. Similar to the PI3K inhibitors, this genetic

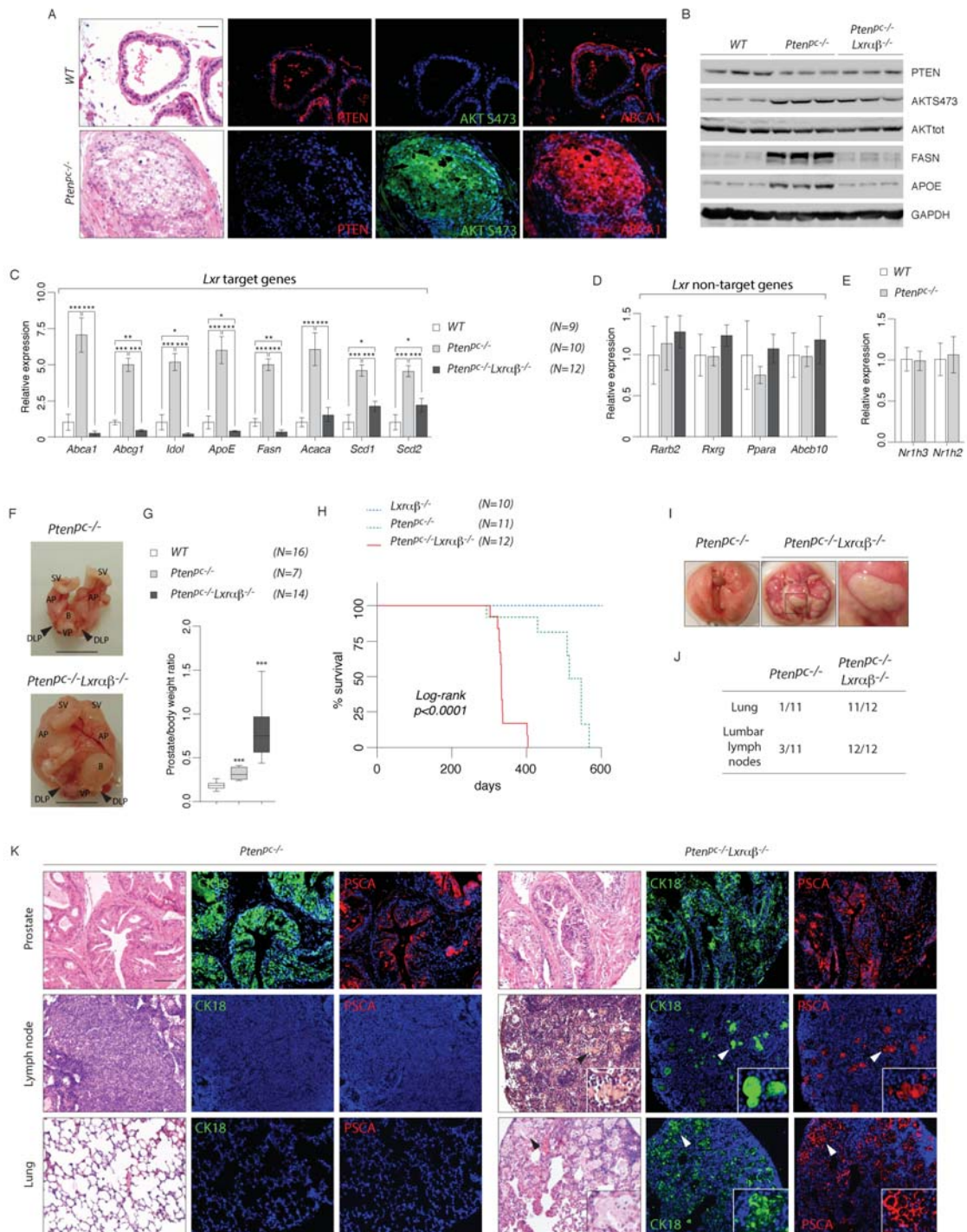


Figure 1. LXRs Constrain PTEN-Loss Carcinogenesis

(A) HE-stained sections and immunohistochemistry against PTEN, AKTS473 and ABCA1 and (B) western blot analysis of PTEN, AKTS473, AKT, FASN, APOE and GAPDH of wild type (WT), *PtenPC-/-* and *PtenPC-/-Lxraβ-/-* mouse prostate tissues from 6-months old animals. Scale bar, 100μm. (C-E) Relative expression of LXR target genes, non-LXR target gene panel, *Lxra* (Nr1h3) and *Lxrb* (Nr1h2) in wild type (WT), *PtenPC-/-* and *PtenPC-/-Lxraβ-/-* mouse prostates. (F) Gross anatomy of representative prostates at 6-months of age. Seminal vesicles (SV), bladder (B), anterior prostate lobe (AP), dorso-lateral prostate lobe (DLP) and ventral lobe (VP). Scale bar, 1 cm. (G) Relative weight of prostates wild type (WT), *PtenPC-/-*, *PtenPC-/-Lxraβ-/-* (N=10/16). (H) Kaplan-Meier cumulative survival analysis showing significant decrease ($p<0.0001$) in lifespan in the *PtenPC-/-Lxraβ-/-* compared to *PtenPC-/-* group. (I) Gross anatomy of lungs from 6-months *PtenPC-/-* vs *PtenPC-/-Lxraβ-/-* mice. (J) Recapitulative table of metastatic phenotypes in *PtenPC-/-* and *PtenPC-/-Lxraβ-/-* animals. (K) HE-stained sections and immunofluorescence detection of primary tumor site (prostate), lumbar lymph nodes and lung of *PtenPC-/-* and *PtenPC-/-Lxraβ-/-* mice using specific (CK18/PCSA) prostatic markers. High-magnification depicting cell arrangement within the host tissue. Scale bar, 100μm. All data are represented as mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. See also Figure S1

manipulation decreased expression of LXR target genes in LNCaP and PC3 cells (Figure 2J, S3E-G). Reciprocally, we reasoned that forced activation of the PI3K/AKT pathway in PTEN positive cells should overcome the inhibitory activation of this pathway. We therefore transfected PTEN-positive DU145 cells with a constitutively active form of AKT (MyrAKT), or of the PI3K catalytic subunit p110 (p110CAAX). Increasing PI3K/AKT pathway lead to increased activation of LXR signaling (Figure 2K,L, S3H). Thus, using a combination of pharmacologic and genetic approaches we demonstrate that PTEN, acting via the PI3K/AKT pathway, controls LXR signaling.

To show that PTEN controls LXR signaling by directly modulating transcriptional activity we introduced an LXRE-driven reporter gene in wild-type MEFs transfected with MyrAKT expression vector to mimic PTEN-loss. In line with our earlier observations in DU145 cells, introducing MyrAKT expression increases the reporter signal (Figure 2M, S3I). LXRs have been previously reported to act as tumor suppressors in melanoma, in which LXR β seems to be the prominent LXR isoform (Pencheva et al., 2014). Unlike melanoma, in prostate tumors both LXR isoforms are expressed at relatively equal levels and functionally redundant (Pommier et al., 2013). To address the question of isoforms redundancy, we studied MEFs from single and double LXR knock-out mouse strains as well (Figure 2M). We observed that only loss of both LXR isoforms render the cells insensitive to constitutive activation of the PI3K/AKT pathway. Several potential molecular mechanisms may underlie modulation of LXR activity. One plausible possibility is that activation of PTEN prevents production of endogenous LXR ligands, and that when activated absence of these ligands attenuates LXR signaling. To test this idea we inhibited PI3K using Wortmannin and LY294002 in *Pten*^{-/-} MPECs. Inhibition resulted in a decrease of *Abca1* and *Fasn* expressions. However, expression of these genes could be fully restored by treating these cells further with the synthetic LXR ligand T0901317 in an LXR-dependent manner (Figure 2N, S3J,K). Taken together, these findings suggest that PTEN expression influences LXR signaling in prostate cancer through a PI3K/AKT-dependent pathway and that this may impinge on tumor sterol metabolism and generation of endogenous LXR ligands.

PTEN modifies LXR activity in the prostate through deregulation of cholesterol de novo synthesis

We next sought out to determine how PTEN and PI3K/AKT deregulation could modulate LXR activity in PCa. Based on our experiments with synthetic LXR ligands we postulated that this might be mediated by the production of endogenous LXR ligands (e.g. oxysterols). To test this, we determined the hydroxycholesterol species present in prostate from wild type and *Pten*^{pc-/-} mice. We observed that the levels of 24(S)-hydroxycholesterol and 7 α -hydroxycholesterol, both established LXR ligands (Janowski et al., 1999), were significantly increased in *Pten*^{pc-/-} prostates (Figure 3A). In order to confirm that PTEN governs the production of endogenous LXR ligands, we induced PTEN expression in LNCaP doxycycline-inducible cells, which resulted in a decrease in ABCA1 protein (Figure 3B). However, when these cells were further treated with T0901317, a synthetic LXR ligand, level of *Abca1*, as well as others LXR target genes, was fully restored (Figure 3B,C). This finding comforts the results obtained on MPECs and showed that intrinsic LXR signaling remains intact in PTEN positive cells, but that

ligand availability may be the limiting factor. Consistent with these findings, T0901317 also abolished repression of LXR signaling by PI3K inhibitors in LNCaP and PC3 cells (Figure S4A,B). Increased oxysterols in *Pten*^{pc-/-} prostates may point towards increased de novo cholesterol synthesis, as previously proposed in human-derived prostate cell lines (Brusselmans et al., 2007; Krycer and Brown, 2013; Zhuang et al., 2005). Therefore, we determined the expression of genes in the SREBP2-regulated cholesterol synthesis pathway. Our analysis revealed a marked increase in expression of SREBP2-regulated genes and of *SREBP2* itself (Figure 3D). Furthermore, the levels of cholesterol biosynthesis intermediates were also elevated, as well as the level of cholesterol (Figure 3E). Notably, we also detected marked elevation of desmosterol, a potent endogenous LXR ligand (Spann et al., 2012). We reasoned that if enhanced cholesterol synthesis in PTEN-null tumors drives LXR signaling then this process should be sensitive to inhibition by statins that block HMGCoA reductase, a rate-limiting step in the cholesterol biosynthesis pathway. As expected, simvastatin treatment increased expression of *HMGCR* in LNCaP cells (Figure 3F). Reciprocally, simvastatin repressed both *ABCA1* and *FASN* expression in LNCaP cells (Figure 3F, S4C), as well as in PC3 cells (Figure S4D). Repression of the LXR pathway by statins could be completely overcome by T0901317 treatment (Figure 3F, S4C,D), consistent with the idea that de novo synthesis is responsible for production of endogenous LXR-ligands in face of PTEN-loss. To conclusively demonstrate that reduced endogenous LXR ligands production in PTEN-null cells is the underlying cause for decreased LXR signaling, we blocked *HMGCR* with simvastatin and supplemented the medium with a high concentration of mevalonate, the product of *HMGCR* activity. Supplying mevalonate overcomes that statin-induced block of the mevalonate pathway at the level of *HMGCR*, thus restoring flux across this pathway and fully rescuing expression of *ABCA1* (Figure 3G). Restoration of *ABCA1* and *FASN* expression by exogenous mevalonate was dose-dependent (Figure 3H) and was mirrored by a corresponding decline in *HMGCR* expression. Thus having established that altered production of endogenous ligands underlies the effect of PTEN on LXRs, we reasoned that SREBP2, the master transcriptional regulator of cholesterol synthesis, is sensitive to the cellular PTEN status. To follow the SREBP2-regulated pathway we monitored the processing SREBP2 into the transcriptional active "mature" form, and the levels of the SREBP2 canonical targets, *HMGCR* and *SQLE*. Pharmacological inhibition of PI3K in LNCaP cells markedly decreased SREBP2 processing, and the protein levels of *HMGCR* and *SQLE* (Figure 3I). Similar results were obtained in PC3 cells using PI3K inhibitors (Figure S4E) and by overexpression of a dominant negative AKT expression construct (Figure S4F). Interestingly, restoration of de novo synthesis by exogenous mevalonate in LNCaP cells in the face of PI3K inhibition, not only increased *ABCA1*, but also the levels of another LXR target *APOE* (Figure 3J). Cumulatively, these experiments support the idea that the PI3K pathway controls LXR signaling by governing production of endogenous ligand. To test this idea in vivo, we administered simvastatin orally to *Pten*^{pc-/-} mice. This treatment suppressed expression of both *Fasn* and *Abca1* and corresponding protein abundance in prostate samples (Figure 4K,L). As expected, the repressive effect of simvastatin on *Abca1* and *Fasn* expression levels is blunted in MPECs derived from *Pten*^{pc-/-}*Lxra* β ^{-/-} (Figure 4M, S4G). We therefore conclude that PTEN inactivation in prostatic cells results in increased cholesterol de novo

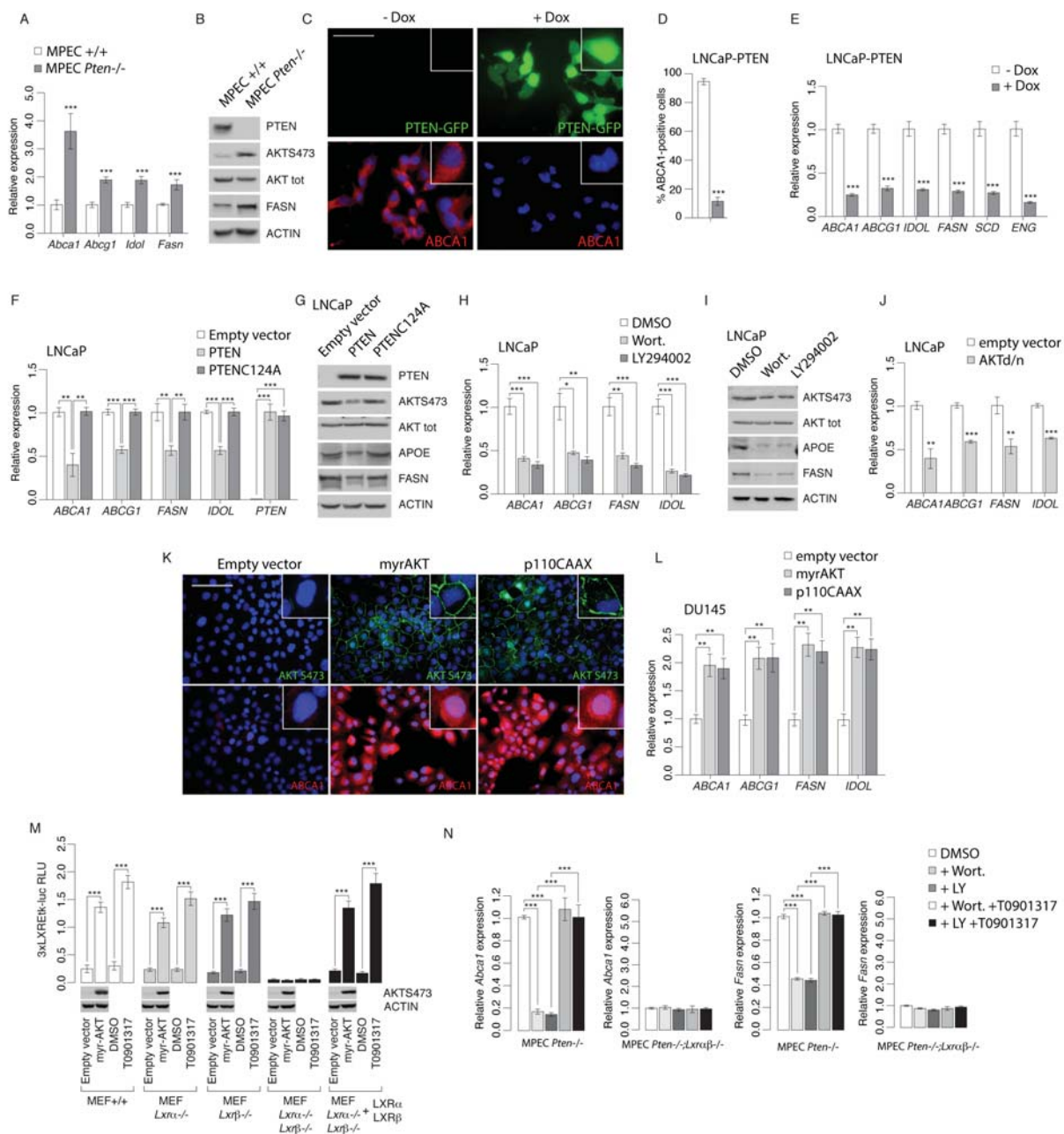


Figure 2. PTEN-Status Controls LXR Activities in PCa Cells Through PI3K/AKT Pathway

(A) Relative expression levels of *Abca1*, *Abcg1*, *Idol*, *Fasn*, and (B) PTEN, AKTS473, AKT, FASN and β -ACTIN protein accumulation levels in MPEC wild-type (+/+) and *Pten*^{-/-}. (C) Immunofluorescence of PTEN-GFP and ABCA1 in LNCaP-PTEN inducible cell line treated with DMSO or Doxycycline (25µM) ($\pm$ Dox). (D) Quantitative measurement of ABCA1-positive cells has been performed. Scale bar: 100µm (E) Relative expression of LXR target genes in LNCaP-PTEN inducible cell line treated with DMSO or Doxycycline (25µM). (F,G) Relative gene expression analysis and protein accumulation of LXR targets in LNCaP cells transfected with PTEN and PTENC124A expression construct vs. empty vector. (H,I) Relative expression and protein accumulations of LXR targets in LNCaP cells treated with PI3K inhibitors Wortmannin (0.5µM) or LY294002 (20µM). (J) Relative accumulation of ABCA1, ABCG1, FASN and IDOL in LNCaP cells transfected with AKTdn (dominant-negative) expression vector. (K) Immunofluorescence against AKTS473 and ABCA1 in DU145 transfected with myrAKT or p110CAAX (dominant-positive) expression vectors. Scale bar: 100µm (L) Relative accumulation of ABCA1, ABCG1, FASN and IDOL in DU145 transfected with myrAKT or p110CAAX expression vectors. (M) Luciferase activity measurement in MEF +/+, *Lxra*^{-/-}, *Lxr*^{-/-} or *Lxra*^{-/-}; *Lxr*^{-/-} transfected with 3xLXREk-Luc reporter construct and expression vector encoding myrAKT. T0901317 (1µM) treatment has been performed as a control. MEF *Lxra*^{-/-} were rescued using *Lxra* and *Lxr* β expression vectors. (N) *Abca1* and *Fasn* relative expression in MPEC from *Pten*^{pc/-} and *Pten*^{pc/-}; *Lxra*^{-/-} mice treated with Wortmannin (0.5µM), LY294002 (20µM) and/or T0901317 (1µM). All data are represented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. See also Figure S2 and S3.

synthesis and as a result production of endogenous LXR ligands, which alter the tumor sterol balance.

LXRs control tumor aggressiveness and metastatic spread

The dramatic growth of *Pten*^{pc-/-} adenocarcinomas when LXRs were genetically ablated motivated us to examine how LXRs may control carcinogenic aggressiveness. At the microscopic level, comparison of prostates from *Pten*^{pc-/-} and *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} mice revealed a significant increase in the frequency of invasive carcinoma (Figure 4A,B, S5A). Furthermore, using SMA-breakdown (Smooth Muscle Actin) staining as a proxy for tumor barrier loss confirms enhanced tumor invasiveness in *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} prostates (Figure 4C). In line with the increased aggressiveness, Ki67-positive staining increased with LXR ablation compared to controls (Figure 4D,E, S5B). Concomitantly, a panel of molecular tumor indicators, involved in cell cycle control and prostatic homeostasis, exhibited clear dysregulation in *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} prostates (Figure 4F).

As aforementioned, *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} mice develop metastatic disease, rarely observed in *Pten*^{pc-/-}. Metastasis evolution of PCa is the result of cell identity changes that permit the “escaping” tumor cell to survive during the migration, intravasation and extravasation processes. Among these changes, epithelial-mesenchymal transition (EMT) is crucial. Comparison of the EMT markers *Zeb1*, *Twist1*, *Twist2*, *Snai1* and *Vimentin* between *Pten*^{pc-/-} vs. *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} revealed that loss of LXRs resulted in enhanced expression of these markers, indicative of a prominent shift in cell identity (Figure 4G-I). Further consistent with the EMT phenotypic shift in *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} prostate tumors, we observed an inverted ratio between *Ncad* and *Ecad* (Figure S5C). Another well-established determinant that supports tumor aggressiveness is the overexpression of matrix metalloproteinases (MMPs), which allow cells to efficiently degrade the surrounding matrix and migrate. Accordingly, we found enhanced expression of *Mmp1*, *Mmp2*, *Mmp7* and *Mmp9* (Figure 4J) and significant accumulation of MMP9 protein in *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} prostates (Figure 4K). In contrast, expression of *Timp2*, an endogenous inhibitor of MMPs, was decreased (Figure 4J). Furthermore, immunostaining of *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} lungs with metastasis exhibited MMP9 accumulation at the interface between metastatic cells and the pulmonary matrix (Figure 4L).

Our results clearly demonstrate that LXRs can constrain PCa and the spread of metastasis in vivo. Yet this does not address whether this is a cell autonomous phenotype resulting from the loss of PTEN and LXRs, or is dependent on the tumor microenvironment. Since in our experiments we used global LXR-null mice we evaluated metastatic dissemination of implanted prostate tumors from *Pten*^{pc-/-} and *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} in immunodeficient mice (Figure 5A). Similar to what we had observed in the global LXR null mice, *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} implants exhibited a higher proliferation rate than *Pten*^{pc-/-} implants (Figure 5B). Importantly, metastatic dissemination to peripheral organs was only observed in mice with *Pten*^{pc-/-}*Lxra*^{β-/-} implants (Figure 5C,D). As such, our results support the contention that the tumor-suppressive activity of LXRs in PCa is cell autonomous and is the result of altered cellular cholesterol metabolism. Our conclusions thus far are based on studies of mouse models and PCa-derived human and rodent cell lines. To establish the relevance of our findings regarding the molecular network connecting PTEN to LXR activation in human PCa we interrogated public datasets of prostate

cancer collections. OncoPrint analyses from various PCa libraries underscore an inverse relationship between PTEN downregulation and upregulation of the LXR transcriptional program, particularly in metastatic PCa (Figure 5E, S6A). Consistent with this observation, heatmap (Figure 5F) and enrichment profiling (GSEA) of gene sets sensitive to PTEN loss (Figure 5G) also revealed an inverse correlation between expression of LXR target genes and PTEN status. In conclusion, our study provides evidence from mouse models, PCa-derived cells and human PCa samples, for the existence of a functional PTEN-LXR axis in PCa, which governs tumor development, progression, and aggressiveness.

DISCUSSION

Management of advanced PCa requires a better understanding of the molecular mechanisms influencing development, progression, and eventual metastasis in order to identify tractable therapeutic targets. The most important aspect of our work is the finding of a functional interaction between PTEN and LXRs. Specifically, we demonstrated that PTEN-loss, the most frequent genetic alteration observed in PCa, is associated with increased activation of the LXR transcriptional pathway. Accordingly, in vivo combined ablation of both Lxr isoforms and Pten in mouse prostates led to a dramatic increase of prostate carcinoma invasiveness and associated metastatic dissemination. These findings highlight the crucial significance of LXRs during prostate carcinogenesis. The molecular mechanism sustaining this deregulation involves enhanced activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. Altered signaling of this pathway leads to aberrant LXR activation as a result of excessive production and accumulation of their endogenous ligands. Accordingly, reducing flux across the mevalonate pathway by blocking cholesterol de novo synthesis decreases LXR target gene expression. Taken together, our study identifies LXR signaling as an important determinant of PCa in the setting of PTEN loss owing to their ability to suppress tumor invasiveness and dissemination.

Altered cholesterol metabolism is emerging as a metabolic signature of cancer cells. Already in 1942 accumulation of cholesterol was reported in adenomas of enlarged prostates (Swyer, 1942). This finding has been overlooked for a long time and viewed as a secondary metabolic adaptation of PCa tumors. This point of view has been recently challenged in numerous publications and notably, accumulation of cholesterol esters in lipid droplets induced by PTEN-loss is now recognized as a hallmark of PCa aggressiveness (Yue et al., 2014). Accordingly, manipulations that result in depletion of cholesterol-ester storage result in reduced PCa invasiveness, also highlighting the importance of cellular mobilization of cholesterol as a powerful driver of tumor aggressiveness. In line with this idea metabolomic analysis of PCa metastasis revealed significant accumulation of cholesterol that was also associated with high levels of LDLR (Thysell et al., 2010). These findings delineate the association between cholesterol accumulation and metastatic processes, as we also report herein. The molecular mechanisms governing tumor cholesterol homeostasis in PCa are, however, less clear. In parallel, autonomous cell capability to ensure cholesterol de novo synthesis in response to PTEN-loss prompts us to redrawing paradigm of the “classical” cholesterol homeostasis regulation. Indeed, PCa cells exhibit an increase in both expression and cleavage of

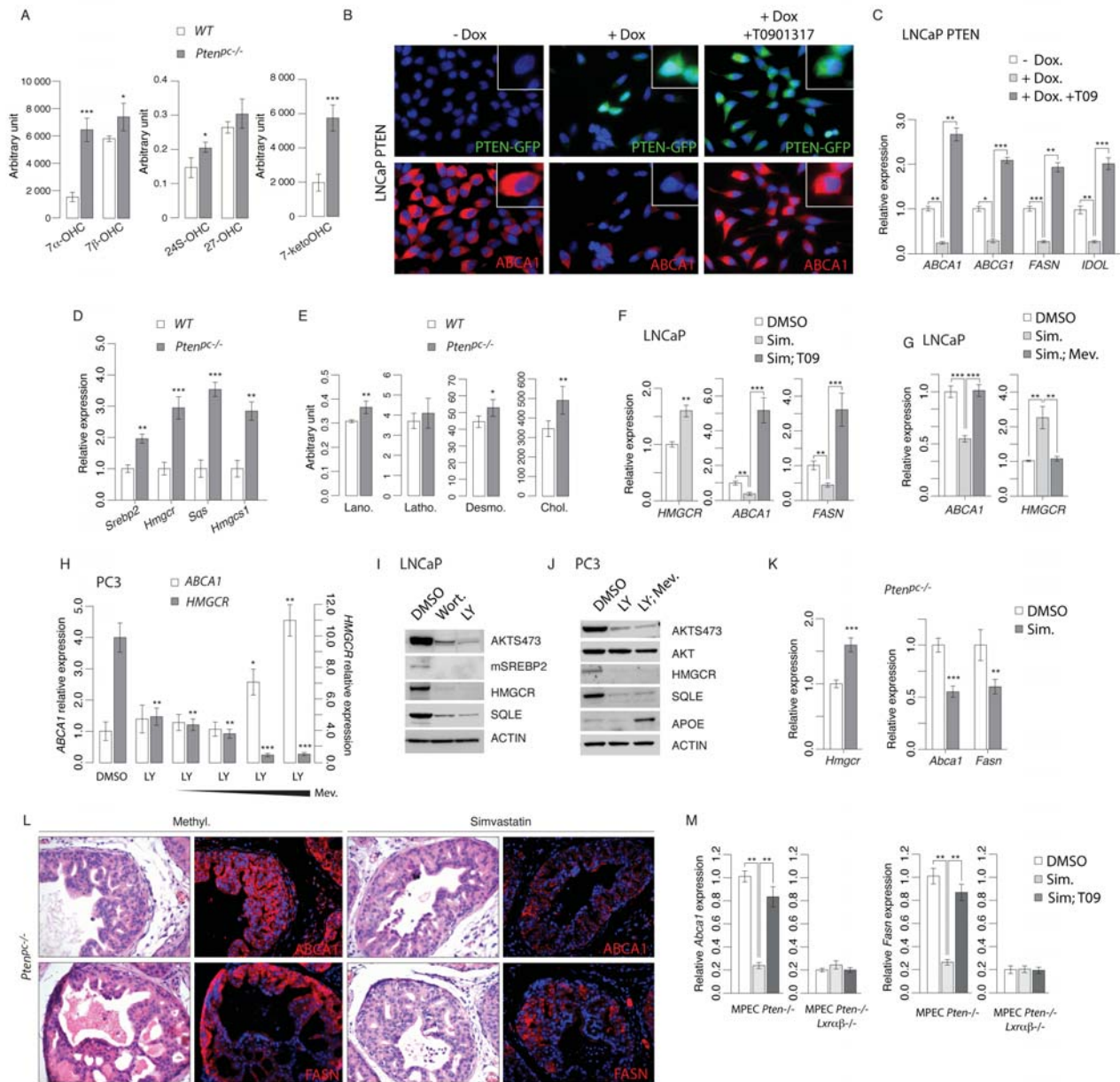


Figure 3. PTEN-loss Results in Endogenous LXR Ligands Accumulation Through Cholesterol de novo Synthesis

(A) Levels of 7 α -OHC, 7 β -OHC, 24(S)-OHC, 27-OHC and 7keto-OHC in prostatic samples from wild type (WT) (N=4) and $Pten^{PC-/-}$ mice (N=5). (B,C) Immunofluorescence of PTEN-GFP and ABCA1 proteins and relative expression of LXR target genes in LNCaP-PTEN inducible cell line treated with DMSO or doxycycline (25 μ M) with or without T0901317 (1 μ M). (D) Relative accumulation of *Srebp2*, *Hmgcr*, *Sqs* and *Hmgcs1* transcripts in prostate of wild type (WT) and $Pten^{PC-/-}$ mice (N=10 per group). (E) Accumulation of cholesterol precursors, lanosterol (Lano.), lathosterol (Latho.), desmosterol (Desmo.) and cholesterol (Chol.) in prostatic samples from wild type (WT) (N=4) and $Pten^{PC-/-}$ mice (N=5). (F) qPCR analysis of HMGCR, ABCA1 and FASN expression in LNCaP cells treated with Simvastatin (2.5 μ M) (Sim.) alone or with T0901317 supplementation (1 μ M) (T09). (G) qPCR analysis of HMGCR, ABCA1 and FASN expression in LNCaP-PTEN cells in presence of doxycycline (25 μ M) treated with Simvastatin (2.5 μ M) alone or with mevalonate (500 μ M) (Mev.). (H) qPCR analysis of HMGCR, ABCA1 and FASN expression in PC3 cells treated with LY294002 (20 μ M) alone or with increasing amounts of mevalonate (100 μ M, 500 μ M, 1mM, 10mM). (I) Western blot analysis of SREBP2 cleaved form, HMGCR and SQLE respective accumulation in LNCaP cell line. AKTS473 is used to confirm Wortmannin and LY294002 treatment efficiency and β -ACTIN as a loading control. (J) Western blot analysis of HMGCR, SQLE and APOE in PC3 cells treated with LY294002 (20 μ M) alone or in combination with mevalonate (500 μ M). AKTS473 and AKT are used to confirm Wortmannin and LY294002 treatment efficiency and β -ACTIN as a loading control. (K) Relative expression of *Hmgcr*, *Abca1* and *Fasn* on prostate samples from wild type (WT) mice and $Pten^{PC-/-}$ mice treated with vehicle or Simvastatin (40mg/kg). (L) Immunofluorescence detection of FASN and ABCA1 on prostate samples from wild type (WT) and $Pten^{PC-/-}$ mice treated with vehicle or Simvastatin (40mg/kg). (M) qPCR analysis of *Abca1* and *Fasn* expression on MPEC $Pten^{-/-}$ or $Pten^{-/-}$ $Lxra\beta^{-/-}$ treated with simvastatin alone (2.5 μ M) or in combination with T0901317 (1 μ M). All data are represented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. See also Figure S4.

SREBP2 with a concomitant accumulation of hydroxycholesterol species. Basically, sterol accumulation within the cell is known to block SREBP2 cleavage, which represents a regulation feedback mechanism to ensure cholesterol homeostasis. Investigations conducted on LNCaP and PC3 cell lines showed that sterol sensing and regulation of SREBP2 cleavage is strongly impaired, breaking feedback loop mechanism. This concept is consistent with the accumulation of cholesterol observed in clinical prostate cancers (Krycer et al., 2009). To explain such uncoupling regulation, AKT has been shown to control ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP, a critical process to trigger SREBP processing by Site-1 and Site-2 proteases thus resulting in formation of active SREBP transcription factors (Du et al., 2006). We could postulate that constitutive activation of AKT induced by PTEN-loss leads to unregulated-SREBP2 cleavage and bypasses sterol inhibition. Moreover, downstream AKT, mTORC1 has been identified as a master regulator of SREBP activities. RNA interference against mTORC1 as well as rapamycin (mTORC1 inhibitor) block SREBP nuclear accumulation and SREBP target gene expressions (Porstmann et al., 2008). Additionally, the increased capabilities of PTEN-mutant cells to store the excess of cholesterol into lipid droplets by up-regulating ACAT1 esterification activity participate to limit free cholesterol accumulation and the blocking of SREBP2-dependent mechanism (Yue et al., 2014). Together, these findings propose a mechanism explaining that, even with an accumulation of cholesterol or derivatives, cancer cell is still able to maintain cholesterol de novo synthesis and uptake fully active in order to supply crucial cell fueling in cholesterol to ensure basic function such as membrane building, fatty acid esterification, etc.

In this setting of enhanced SREBP2 activation and cholesterol production, LXRs could represent a defense mechanism to limit cellular cholesterol accumulation and to suppress tumor progression. Under these conditions, LXRs will be strongly activated and promote cholesterol efflux (Costet et al., 2000) and limit further accretion of lipoprotein-derived cholesterol. Interestingly, a similar idea was put forward to explain how LXR β may limit dissemination of melanoma (Pencheva et al., 2014). In our study we showed that LXR endogenous ligand accumulation in response to PTEN-loss results in suppression of invasion and metastatic spreading of PCa. Whether this is dependent on a specific LXR-regulated gene, or a result of the combinatorial effect of LXR activation remains at present unknown. It is interesting to note that in melanoma, induction of ApoE expression both in tumor and stromal cells seems to explain, at least in part, the effect of LXR activation (Pencheva et al., 2014). Next to its role in transporting cholesterol, ApoE can also bind LRP1 and LRP8 on tumor and endothelial cells, respectively, and thus constrain cancer cell invasion and endothelial recruitment. Whether this underlies the effect of LXRs in PCa remains to be studied. However, other LXR target genes may also underlie the suppressive activity of LXRs during prostate carcinogenesis. For example, induction of the cholesterol efflux transporter ABCG1 by LXR agonists has been shown to attenuate signaling pathways emanating from lipid-rafts, and specifically the PI3K pathway in LNCaP cells (Pommier et al., 2010). Thus, loss of LXRs in vivo may result in enhanced pro-oncogenic signaling from lipid rafts to facilitate cancer promotion. Clearly, identification of the bona fide LXR target gene(s) able to constrain PTEN-driven

carcinogenesis is an important issue. This could allow to better understand how cholesterol homeostasis is linked to the control of carcinogenic process and provide new target(s) for alternative therapeutic strategies to treat advanced PCa.

Despite compelling evidence for their antitumor activity (Chuu et al., 2006; De Boussac et al., 2013; Pommier et al., 2013, 2010), the roles of LXRs in tumor in general, and specifically in PCa are not sufficiently well defined. Although we clearly point out that LXR control intrinsic invasiveness properties of prostate tumor cells using implant grafting on athymic mouse model, one can expect that LXRs may also play an important role in the tumor microenvironment. In the setting of breast cancer, Villablanca et al. have reported that LXR α activation impairs dendritic cell recruitment through inhibition of CCR7 that led to a blunted antitumor response by immune cells (Villablanca et al., 2010). This observation is supported by a study that reported that 27-OHC, an established LXR ligand, activates LXR and promotes metastatic dissemination in breast cancer (Nelson et al., 2013). Interestingly this effect on dendritic cells is not observed in vivo in colon cancer (Lo Sasso et al., 2013), clearly demonstrating that the role of LXRs in cancer are likely to be tumor-type-specific.

Our results also show that LXR activation is associated with the control of EMT in *Pten*-mutant tumor cells. These observations are in concordance with accumulation of SNAIL and over-activation of TGF β signaling in *Lxra* $\beta^{-/-}$ mouse prostate as reported by Kim et al. (Kim et al., 2009). Together with PTEN mutation, in vivo genetic ablation of LXRs leads to increased EMT and thus facilitates progression of prostatic carcinoma towards metastasis. Nevertheless, how LXRs control gene expression involved in the EMT process remains unclear. As discussed above, this could be a result of altered lipid-raft-derived signaling. Supporting this contention, cholesterol treatment could increase accumulation of TGF β receptors in rafts and enhance their down stream signaling (Chen et al., 2008). Conversely, cholesterol lowering/depleting agents may change the binding ratio of TGF β to TGF β -RII and -RI that represent a crucial balance to properly activate downstream signaling. Indeed, cholesterol decrease redirects resident membrane-associated receptors to non-lipid raft areas that lead to decrease their activities. While speculative, lack of LXRs may induces an increase of cholesterol accumulation in lipid rafts, stimulate TGF β and downstream Smad signaling and enhance EMT. Modification of lipid-raft signaling in absence of LXR could hence interfere with TGF β transduction pathway and explain increased expression and accumulation of EMT markers in *Pten*^{PCa} *Lxra* $\beta^{-/-}$ prostate samples.

Collectively, our results highlight LXRs as potent tumor-suppressors in PCa and as a key determinant of prostate carcinogenesis and metastatic spread. Their effect is maintained by a marked metabolic shift in *Pten*-null PCa cancer cells involving enhanced cholesterol biosynthesis. These findings support the development of therapeutic strategies that target cholesterol metabolism, next to currently established treatment modalities that target androgen receptor signaling. Given their ability to limit metastatic spread, combining hormonal treatment agents with LXR ligands could represent a promising approach to treat metastatic PCa.

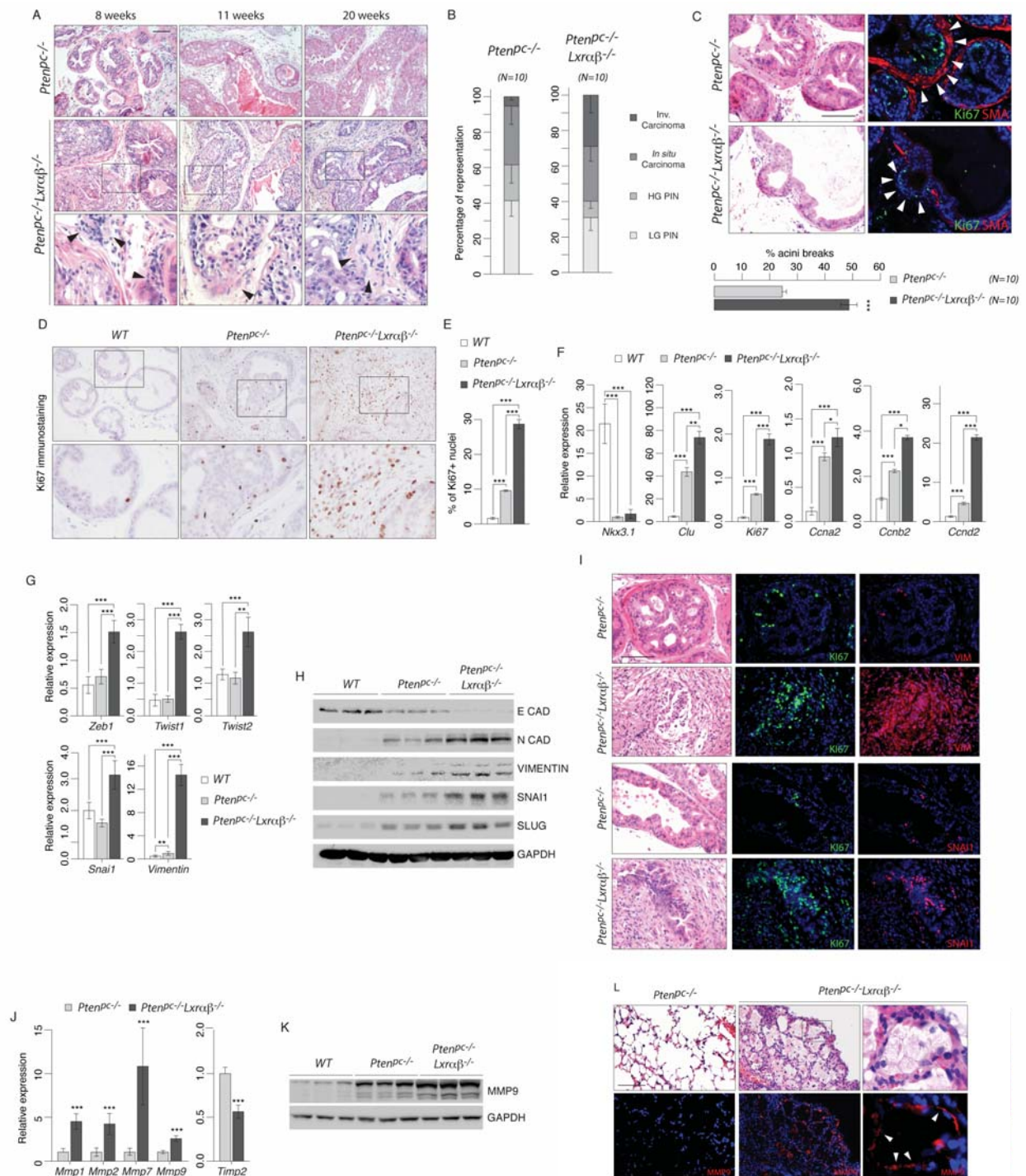


Figure 4. LXR Ablation in *Pten*-Mutant Mice Leads to Cancer Progression and Metastasis Dissemination

(A) HE-stained sections of representative dorsal prostate (DP) at 8, 11 and 20 weeks. Scale bar, 100μm. (B) Histological evaluation of dorsal lobe lesions, Low-Grade PIN, High-Grade PIN, In situ Carcinoma or Invasive Carcinoma. Three distant sections from each mouse (N=10 per group) were scored. (C) Ki67 and SMA immunofluorescence performed on *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} prostate specimens. Acini breaks have been quantified using following criteria: discontinuous SMA staining and presence of Ki67-positive staining in surrounding stromal compartment. (D) Representative Ki67 immunohistochemistry on prostatic tissues from each genotypes. (E) Quantification of Ki67-positive staining (N=8 per group). (F) Relative expression of *Nkx3.1*, *Clu*, *Ki67*, *Ccna2*, *Ccnb2* and *Ccnd2* in prostate from wild type (WT), *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} mice. (G,H) Relative expression and protein accumulation of EMT markers, *Zeb1*, *Twist1/2*, *Snai1*, and *Vimentin* in prostate from wild type (WT), *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} mice. (I) Immunofluorescence staining against EMT markers VIMENTIN and SNAI, together with Ki67 on prostatic sections from *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} mice. (J) Relative expression analysis of metalloproteinase genes *Mmp1*, *Mmp2*, *Mmp7*, *Mmp9* and negative regulator *Timp2* in prostate from wild type (WT), *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} mice (N=10 per group). (K) MMP9 protein accumulation in prostate from wild type (WT), *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} mice. (L) Histological and immunofluorescence staining for MMP9 in lung from *Pten*^{PC-/-} and *Pten*^{PC-/-}*Lxraβ*^{-/-} mice. All data are represented as mean ± SEM. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. See also Figure S5.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal experiments

All mouse studies were conducted according to standard handle and care in agreement with the local ethic committee. For simplicity, *PB-cre4^{+/+};Pten^{loxP/loxP}* are referred as *wild type* (WT) and *PB-cre4^{T/+};Pten^{loxP/loxP}* as *Pten^{pc/-}*. *Pten^{pc/-}* mice were provided by NCI mouse repository (Lesche et al., 2002; Wang et al., 2003; Wu et al., 2001). *Lxra^{-/-};Lxrβ^{-/-}* mice were obtained from Dr. David Mangeldorf Lab. *Pten^{loxP/loxP};PB-cre^{T/+};Lxra^{-/-};Lxrβ^{-/-}* were named *Pten^{pc/-};Lxraβ^{-/-}* and obtained by breeding the two latest transgenic strains. *Pten^{loxP/loxP};PB-cre^{+/+};Lxra^{-/-};Lxrβ^{-/-}* control littermates as referred as *Lxraβ^{-/-}* in the manuscript. For simvastatin treatment experiments, mice were gavaged with methylcellulose or simvastatin (Sigma-Aldrich) at 40mg/Kg three times a week during one month. For subrenal grafting experiments, 2 months-old athymic nu/nu mice (Charles River) were used. Dorsal prostates of *Pten^{pc/-}* and *Pten^{pc/-};Lxraβ^{-/-}* aged of 6 months were collected, and then freshly grafted under the renal capsule of anesthetized male nude mice. After prostate implantation and kidney repositioning, mice were sutured on skin and muscle planes. Prostatic grafts were collected 1 month later. Lung and lumbar lymph nodes were analyzed for metastasis development by hematoxylin/eosin coloration and immunohistochemistry.

Reagents

T0901317 ligand was purchased from Cayman Chemical (71810). Simvastatin (S6196) and Doxycycline (D9891) were purchased from Sigma-Aldrich, Wortmannin (#9951) and LY294002 (#9901) from Cell Signaling Technology. Most of the reagents were used in the cell culture diluted in DMSO (Sigma-Aldrich). Primary and secondary antibodies used in immunoassay and western blot are listed in Supplemental Experimental Procedures.

Cell culture, treatments, and transfection

All cell lines were cultured at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. LNCaP and PC-3 cells were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen), and DU145 and MEFs in DMEM medium (Invitrogen), containing penicillin/streptomycin (100 mg/ml), and supplemented with 10 % fetal bovine serum (Biowest). LNCaP-PTEN cell line stably transfected with TET-ON vector (van Duijn et al., 2010) was cultured in RPMI-1640 medium containing penicillin/streptomycin (100 mg/ml), supplemented with 5 % tetracyclin-free fetal bovine serum (Biowest), neomycin (800 µg/ml), zeocin (200 µg/ml). Transfections were performed using jetPRIME (PolyPlus transfection) according to manufacturer informations in 10 % fetal bovine serum-supplemented medium. Treatments were performed in 2 % Lipoprotein deficient serum (LPDS) during 24 hours. pCMV6-HA-myrAKT and pCMV6-HA-AKTd/n were kindly provided by Dr. Nahed N Ahmed (Ahmed et al., 1997). pcDNA3-p110CAAX was kindly provided by Dr. Julian Downward (Rodriguez-Viciano et al., 1996). pGFP-PTEN and pGFP-PTEN C124A vectors were obtained from Addgene (Tamura et al., 1998). pCMXmLXRα and pCMX-mLXRβ have been kindly provided by David Mangeldorf (Willy et al., 1995). Quantifications or representative pictures represent, at least, three independent experiments. See Supplemental Experimental Procedures.

Immunohistochemistry

Animal tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin according to a standard protocol. For immunohistochemistry, paraffin sections were dewaxed, rehydrated, unmasked using 0.1M citrate buffer (pH 6.0) and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber. Detections were performed alternatively using the NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories) or Alexa 488 conjugated anti-mouse IgG/Alexa 555 conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen). Cell nuclei were stained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). For immunofluorescence experiments, cells were seeded onto glass

coverslips. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-Triton X-100 0.1% buffer. Saturation was performed using PBS BSA 1%-SVF 1% blocking solution, and incubated with respective primary antibodies. Detection was conducted using secondary antibody Alexa 488 or 555 conjugated with anti-mouse or rabbit IgG (Invitrogen). See Supplemental Experimental Procedures.

Human dataset analysis

Box plots and heatmap were performed using Oncomine portal (www.oncomine.org). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) has been used with a list of 24 genes (e.g. genes with functionally characterized LXRE in human promoter sequence). Analysis was performed using <http://www.broadinstitute.org> platform with GSEA software v2.2.2 (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005). When more than one probe are available in the dataset, the probe with maximum signal was used. See Supplemental Experimental Procedures.

Data analysis

Values are expressed as means ± SEM. Statistical comparisons were performed using a twotailed Student's t test or ANOVA as indicating in figure legends. Significance of Kaplan-Meier cumulative survival analysis was determined using Mantel-Cox log-rank test. Throughout all figures, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001. Significance was considered at p < 0.05.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures, Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

S.B. designed and S.B., A.A., J.D., performed the in vivo experiments. A.A. and J.D. performed the experiments. S.B. supervised experiments. S.B. performed computational analysis. A.A., A.L. and M.M. performed investigations on cholesterol de novo synthesis. V.L. performed oxysterol analysis. J.M.A.L. contributed as senior author. S.B., A.A., D.V., N.Z. and J.M.A.L. contributed to the writing of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

S.B. designed and S.B., A.A., J.D., performed the in vivo experiments. A.A. and J.D. performed the experiments. S.B. supervised experiments. S.B. performed computational analysis. A.A., A.L. and M.M. performed investigations on cholesterol de novo synthesis. V.L. performed oxysterol analysis. J.M.A.L. contributed as senior author. S.B., A.A., D.V., N.Z. and J.M.A.L. contributed to the writing of the manuscript

REFERENCES

- Brusselmans, K., Timmermans, L., Van de Sande, T., Van Veldhoven, P.P., Guan, G., Shechter, I., Claessens, F., Verhoeven, G., Swinnen, J.V., 2007. Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 282, 18777–18785. doi:10.1074/jbc.M611763200
- Chen, C.-L., Huang, S.S., Huang, J.S., 2008. Cholesterol modulates cellular TGF-beta responsiveness by altering TGF-beta binding to TGF-beta receptors. *J. Cell. Physiol.* 215, 223–233. doi:10.1002/jcp.21303
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730. doi:10.1038/nature03918
- Chuu, C., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Fukuchi, J., Chen, R.-Y., Liao, S., 2006. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP

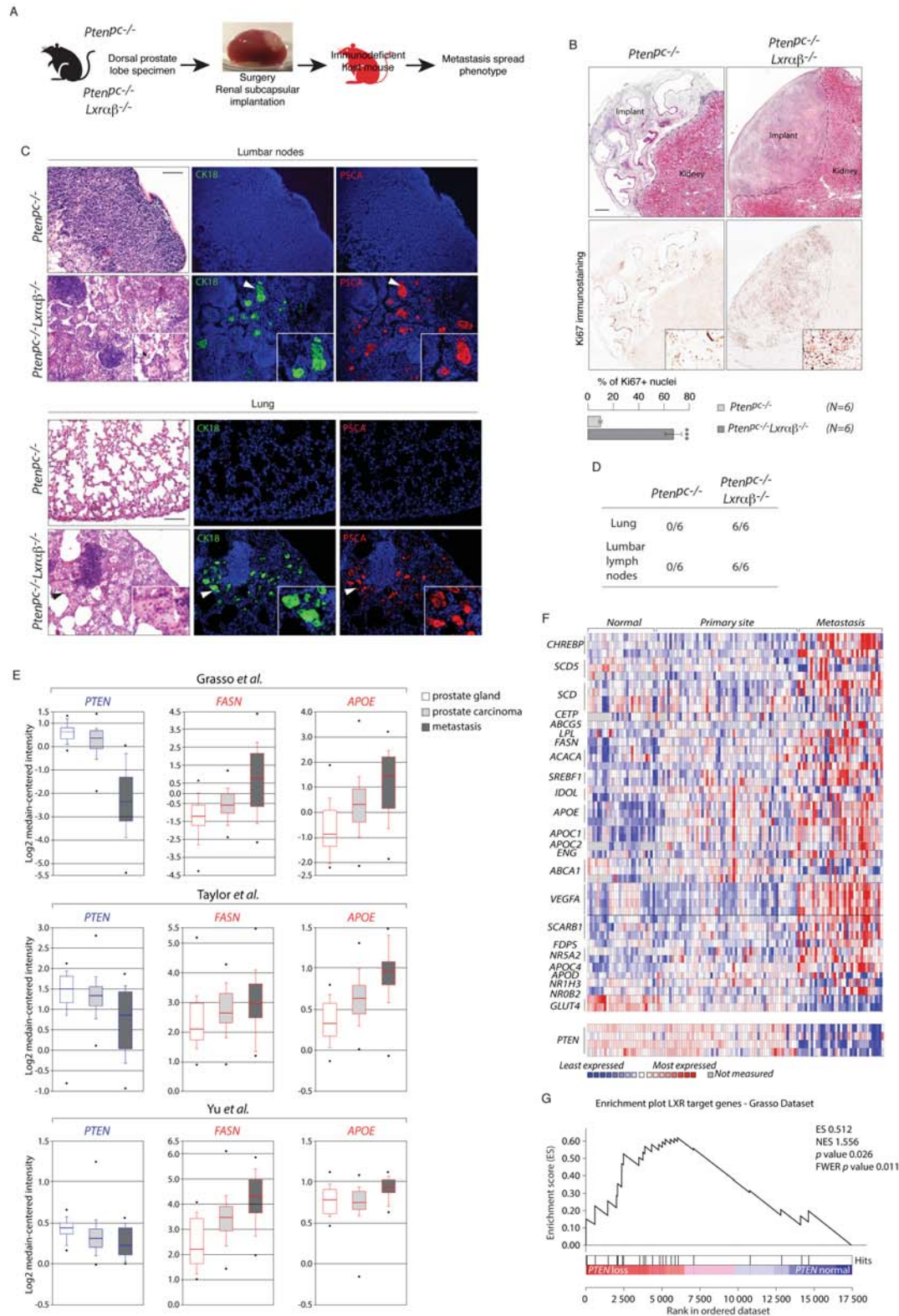


Figure 5. LXRs Control Invasiveness of Tumor Cells and Represent a Marker of Metastatic Outcome in Human PCA

(A) Description for renal subcapsular implantation of prostate specimen from *Pten^{PC-/-}* and *Pten^{PC-/-}Lxraβ^{-/-}* mice in nude host-mice. (B) Representative histological features (HE) and Ki67 staining of implant after 1-month growth. Quantification of Ki67 positive cells from *Pten^{PC-/-}* (N=6) and *Pten^{PC-/-}Lxraβ^{-/-}* (N=6) grafts. (C) Evaluation of metastatic dissemination in lumbar lymph nodes and lungs using prostatic markers CK18 and PSMA in grafted nude mice (N=6 per group). (D) Recapitulative table of metastatic phenotype in lungs and lumbar lymph nodes of grafted mice. (E) Oncomine boxed plot of *PTEN*, *FASN* and *APOE* expression levels between human prostate gland, prostate carcinoma and metastasis in various human datasets (Grasso et al., 2012; Taylor et al., 2010; Yu et al., 2004). (F) Heatmap of LXR target gene signature and *PTEN* expression in Grasso et al. Dataset (Grasso et al., 2012). (G) GSEA of LXR target gene signature based on *PTEN* status. All data are represented as mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. See also Figure S6.

- prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res.* 66, 6482–6486. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0632
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., Tall, A.R., 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 28240–28245. doi:10.1074/jbc.M003337200
- De Boussac, H., Alioui, A., Viennois, E., Dufour, J., Trousson, A., Vega, A., Guy, L., Volle, D.H., Lobaccaro, J.-M.A., Baron, S., 2013. Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1029–1038. doi:10.1517/14728222.2013.820708
- Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G.C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S.R., Labrot, E.S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A.H., Scott, K.L., Signoretti, S., Bardeesy, N., Wang, Y.A., Hill, D.E., Golub, T.R., Stampfer, M.J., Wong, W.H., Loda, M., Mucci, L., Chin, L., DePinho, R.A., 2011. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470, 269–273. doi:10.1038/nature09677
- Dufour, J., Pommier, A., Alves, G., De Boussac, H., Lours-Calet, C., Volle, D.H., Lobaccaro, J.-M.A., Baron, S., 2013. Lack of liver X receptors leads to cell proliferation in a model of mouse dorsal prostate epithelial cell. *PLoS One* 8, e58876. doi:10.1371/journal.pone.0058876
- Dufour, J., Pommier, A., Alves, G., De Boussac, H., Lours-Calet, C., Volle, D.H., Lobaccaro, J.-M.A., Baron, S., 2013. Lack of liver X receptors leads to cell proliferation in a model of mouse dorsal prostate epithelial cell. *PLoS One* 8, e58876. doi:10.1371/journal.pone.0058876
- Du, X., Kristiana, I., Wong, J., Brown, A.J., 2006. Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Mol. Biol. Cell* 17, 2735–2745. doi:10.1091/mbc.E05-11-1094
- Grasso, C.S., Wu, Y.-M., Robinson, D.R., Cao, X., Dhanasekaran, S.M., Khan, A.P., Quist, M.J., Jing, X., Lonigro, R.J., Brenner, J.C., Asangani, I.A., Ateeq, B., Chun, S.Y., Siddiqui, J., Sam, L., Anstett, M., Mehra, R., Prensner, J.R., Palanisamy, N., Ryslik, G.A., Vandin, F., Raphael, B.J., Kunju, L.P., Rhodes, D.R., Pienta, K.J., Chinnaiyan, A.M., Tomlins, S.A., 2012. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487, 239–243. doi:10.1038/nature11125
- Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., Mangelsdorf, D.J., 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 266–271.
- Kim, H.-J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., Gustafsson, J.-A., 2009. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 558–563. doi:10.1073/pnas.0811295106
- Krycer, J.R., Brown, A.J., 2013. Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 219–229. doi:10.1016/j.bbcan.2013.01.002
- Krycer, J.R., Kristiana, I., Brown, A.J., 2009. Cholesterol homeostasis in two commonly used human prostate cancer cell-lines, LNCaP and PC-3. *PLoS One* 4, e8496. doi:10.1371/journal.pone.0008496
- Lesche, R., Groszer, M., Gao, J., Wang, Y., Messing, A., Sun, H., Liu, X., Wu, H., 2002. Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genes. N. Y. N* 2000 32, 148–149.
- Lo Sasso, G., Bovenga, F., Murzilli, S., Salvatore, L., Di Tullio, G., Martelli, N., D'Orazio, A., Rainaldi, S., Vacca, M., Mangia, A., Palasciano, G., Moschetta, A., 2013. Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. *Gastroenterology* 144, 1497–1507, 1507.e1–13. doi:10.1053/j.gastro.2013.02.005
- Ma, X., Ziel-van der Made, A.C., Autar, B., van der Korput, H.A., Vermeij, M., van Duijn, P., Cleutjens, K.B., de Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A., van der Kwast, T.H., Trapman, J., 2005. Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res.* 65, 5730–5739. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4519
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D., Groop, L.C., 2003. PGC-1α-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273. doi:10.1038/ng1180
- Nelson, E.R., Wardell, S.E., Jasper, J.S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M.K., Carver, N.J., Pillai, R.V., Sullivan, P.M., Sondhi, V., Umetani, M., Geradts, J., McDonnell, D.P., 2013. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* 342, 1094–1098. doi:10.1126/science.1241908
- Pencheva, N., Buss, C.G., Posada, J., Merghoub, T., Tavazoie, S.F., 2014. Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation. *Cell* 156, 986–1001. doi:10.1016/j.cell.2014.01.038
- Pommier, A.J.C., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., Baron, S., Lobaccaro, J.M.A., 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 2712–2723. doi:10.1038/onc.2010.30
- Pommier, A.J.C., Dufour, J., Alves, G., Viennois, E., De Boussac, H., Trousson, A., Volle, D.H., Caira, F., Val, P., Arnaud, P., Lobaccaro, J.-M.A., Baron, S., 2013. Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* 9, e1003483. doi:10.1371/journal.pgen.1003483
- Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L., Schulze, A., 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 8, 224–236. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.007
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D., Downward, J., 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15, 2442–2451.
- Schulze, A., Harris, A.L., 2012. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 491, 364–373. doi:10.1038/nature11706
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2015. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 5–29. doi:10.3322/caac.21254
- Spann, N.J., Garmire, L.X., McDonald, J.G., Myers, D.S., Milne, S.B., Shibata, N., Reichart, D., Fox, J.N., Shaked, I., Heudobler, D., Raetz, C.R.H., Wang, E.W., Kelly, S.L., Sullards, M.C., Murphy, R.C., Merrill, A.H., Brown, H.A., Dennis, E.A., Li, A.C., Ley, K., Tsimikas, S., Fahy, E., Subramaniam, S., Quehenberger, O., Russell, D.W., Glass, C.K., 2012. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* 151, 138–152. doi:10.1016/j.cell.2012.06.054
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
- Swyer, G.I.M., 1942. The Cholesterol Content of Normal and Enlarged Prostates. *Cancer Res.* 2, 372–375.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., Yamada, K.M., 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280, 1614–1617.
- Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, J.E., Wilson, M.,

Socci, N.D., Lash, A.E., Heguy, A., Eastham, J.A., Scher, H.I., Reuter, V.E., Scardino, P.T., Sander, C., Sawyers, C.L., Gerald, W.L., 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11–22. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026

Thysell, E., Surowiec, I., Hörnberg, E., Crnalic, S., Widmark, A., Johansson, A.I., Stattin, P., Bergh, A., Moritz, T., Antti, H., Wikström, P., 2010. Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. *PLoS One* 5, e14175. doi:10.1371/journal.pone.0014175

Trotman, L.C., Niki, M., Dotan, Z.A., Koutcher, J.A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A.S., Roy-Burman, P., Greenberg, N.M., Van Dyke, T., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 2003. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol.* 1, E59. doi:10.1371/journal.pbio.0000059

van Duijn, P.W., Ziel-van der Made, A.C.J., van der Korput, J. a. G., Trapman, J., 2010. PTEN-mediated G1 cell-cycle arrest in LNCaP prostate cancer cells is associated with altered expression of cell-cycle regulators. *The Prostate* 70, 135–146. doi:10.1002/pros.21045

Villablanca, E.J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzone, M., Valentinis, B., Bregni, M., Prinetti, A., Steffensen, K.R., Sonnino, S., Gustafsson, J.-A., Doglioni, C., Bordinon, C., Traversari, C., Russo, V., 2010. Tumormediated liver X receptor- α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat. Med.* 16, 98–105. doi:10.1038/nm.2074

Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., Liu, X., Wu, H., 2003. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4, 209–221.

Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033–1045.

Wu, X., Wu, J., Huang, J., Powell, W.C., Zhang, J., Matusik, R.J., Sangiorgi, F.O., Maxson, R.E., Sucov, H.M., Roy-Burman, P., 2001. Generation of a prostate epithelial cell-specific Cre transgenic mouse model for tissue-specific gene ablation. *Mech. Dev.* 101, 61–69.

Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., Cheng, J.-X., 2014. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab.* 19, 393–406. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.019

Yu, Y.P., Landsittel, D., Jing, L., Nelson, J., Ren, B., Liu, L., McDonald, C., Thomas, R., Dhir, R., Finkelstein, S., Michalopoulos, G., Becich, M., Luo, J.-H., 2004. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 2790–2799.

Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., Freeman, M.R., 2005. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Invest.* 115, 959–968. doi:10.1172/JCI19935

Supplemental information

Liver X Receptors constrain tumor development and metastasis dissemination in PTEN-deficient prostate cancer.

Anthony ALIOUI, Julie DUFOUR, Valerio LEONI, Anke LOREGGER, Martina MOETON, David VOLLE, Jean-Marc A. LOBACCARO, Noam ZELCER and Silvère BARON

Supplemental data

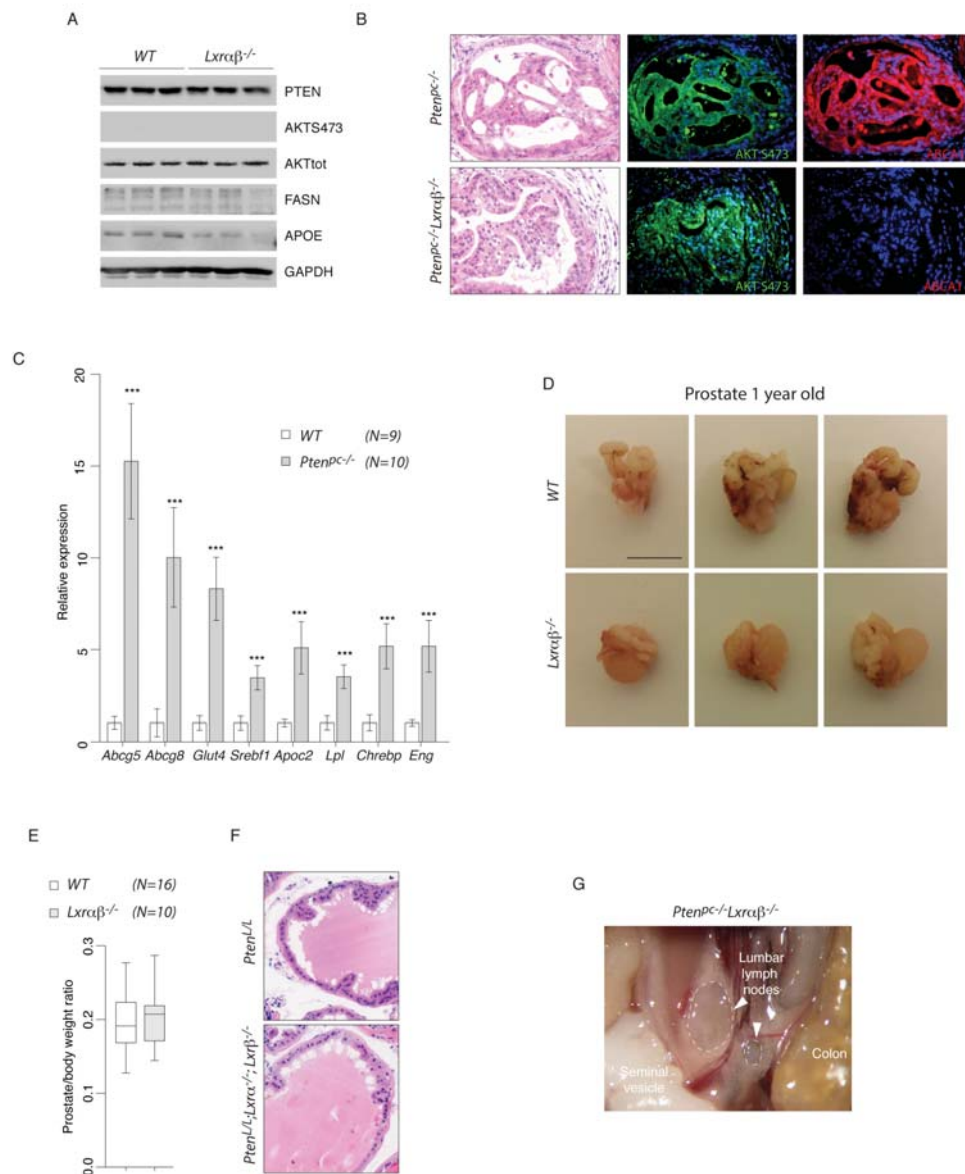


Figure S1. related to Figure 1.

(A) Western blot analysis of PTEN, AKTser473, AKT, FASN, APOE accumulation on prostatic samples from wild type and *Lxraβ^{-/-}* mice. (B) HE-stained sections on prostatic samples from *WT* and *Lxraβ^{-/-}* and immunofluorescence against AKT-ser473 and ABCA1. (C) Relative expression of LXR target genes previously described to have LXRE within promoter sequences. (D) Gross anatomy and (E) weight of representative prostates from 1 year-old *WT* and *Lxraβ^{-/-}* mice. Scale bar, 1cm. (F) Haematoxylin and eosin (HE) staining of prostate sections from *WT* and *Lxraβ^{-/-}* mice (6 months old). (G) Gross anatomy of lumbar lymph nodes from *Pten^{pc-/-}Lxraβ^{-/-}* mice. All data are represented as mean ± SEM. *** $p < 0.001$.

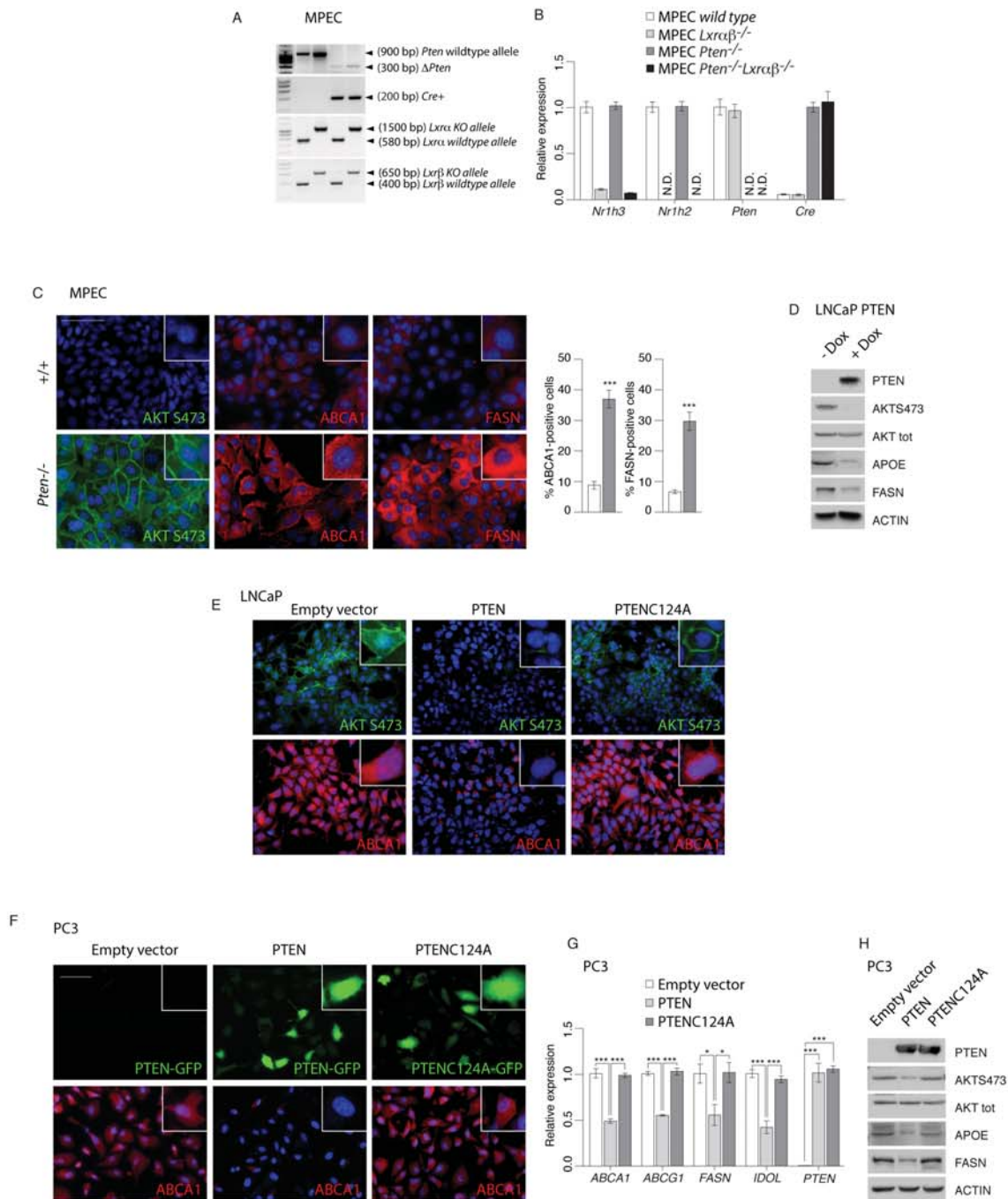


Figure S2. related to Figure 2.

(A) PCR-based identification of mutant MPEC lines for *Pten* wild-type allele, recombination of *PtenloxP* alleles, *Lxrα* and *Lxrβ* wild-type or KO alleles, Cre Transgene. (B) Genotype validation using analysis of relative expression of *Nr1h3* (*Lxrα*), *Nr1h2* (*Lxrβ*), *Pten* and Cre recombinase in the various MPEC lines. (N.D. not detectable). (C) Immunofluorescence and positive-cell quantification against AKTS473, ABCA1 and FASN in MPEC wild-type (+/+) and *Pten*^{-/-}. (D) PTEN, AKTS473, AKT, APOE, FASN and β-ACTIN protein accumulation levels in LNCaP PTEN in presence or absence of Doxycycline treatment. (E) Immunofluorescence against AKTser473 and ABCA1 in LNCaP cells transfected with PTEN or PTENC124A expression vectors. (F) Immunofluorescence against ABCA1 in PC3 cells transfected with PTEN or PTENC124A expression vectors. PTEN or PTEN-mutant accumulation is visualized using GFP. (G) Relative expression levels of *Abca1*, *Abcg1*, *Fasn*, *Idol* and *Pten* and (H) PTEN, AKTS473, AKT, APOE, FASN and β-ACTIN protein accumulation levels in PC3 cells transfected with PTEN or PTENC124A vectors. All data are represented as mean ± SEM. * *p* < 0.05; *** *p* < 0.001.

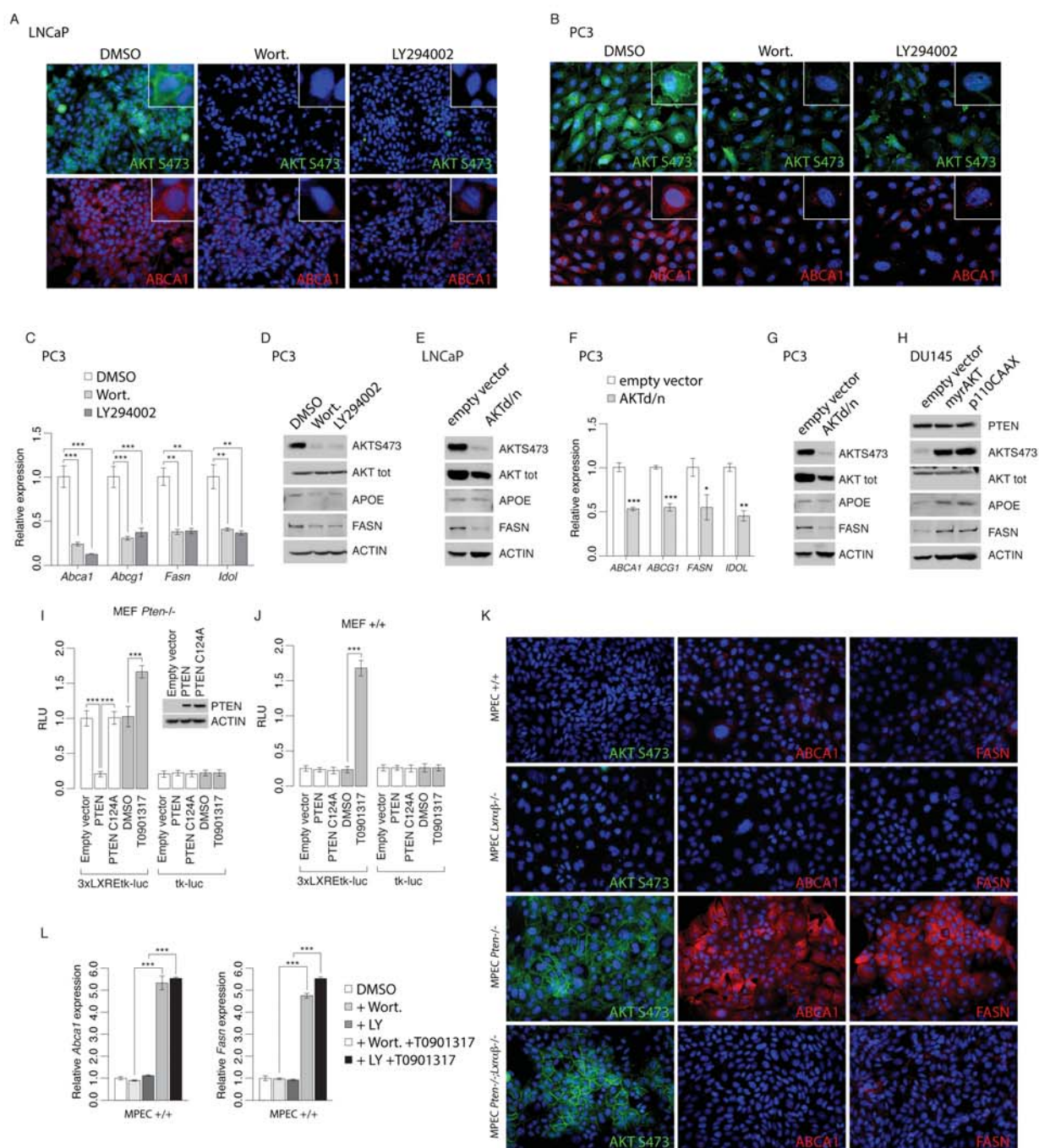


Figure S3. related to Figure 2.

(A,B) Immunofluorescence against AKTS473 and ABCA1 of LNCaP and PC3 cells treated with PI3K inhibitors Wortmannin (0,5μM) or LY294002 (20μM). (C,D) Relative expression and protein accumulations of LXR targets in PC3 cells treated with PI3K inhibitors Wortmannin (0,5μM) or LY294002 (20μM). (E) Immunoblot against AKTS473, AKT, APOE, FASN and β-ACTIN in LNCaP cells transfected with AKTd/n expression vector. (F) Relative accumulation of ABCA1, ABCG1, FASN and IDOL in PC3 cells transfected with AKTd/n expression vector. (G) Immunoblot against AKTS473, AKT, APOE, FASN and β-ACTIN in PC3 cells transfected with AKTd/n expression vector. (H) Immunoblot against PTEN, AKTS473, AKT, APOE, FASN and β-ACTIN in DU145 cells transfected with myrAKT and p110CAAX expression vectors. (I) Luciferase activity measured in MEF *Pten*^{-/-} or (J) MEF *+/+* transfected with 3xLXREtk-Luc reporter construct or tk-Luc as a control and expression vector encoding PTEN, PTENC124A mutant treated or not with T0901317 (1μM). (K) Immunofluorescence against AKT-ser473, ABCA1 and FASN on MPEC *+/+*, *Pten*^{-/-}, *Lxra*^{β-/-} or *Pten*^{-/-}*Lxra*^{β-/-}. (L) Relative accumulation of Abca1 and Fasn in MPEC *+/+* treated with DMSO, Wortmannin (0,5μM), LY294002 (20μM) and/or T0901317 (1μM). All data are represented as mean ± SEM. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

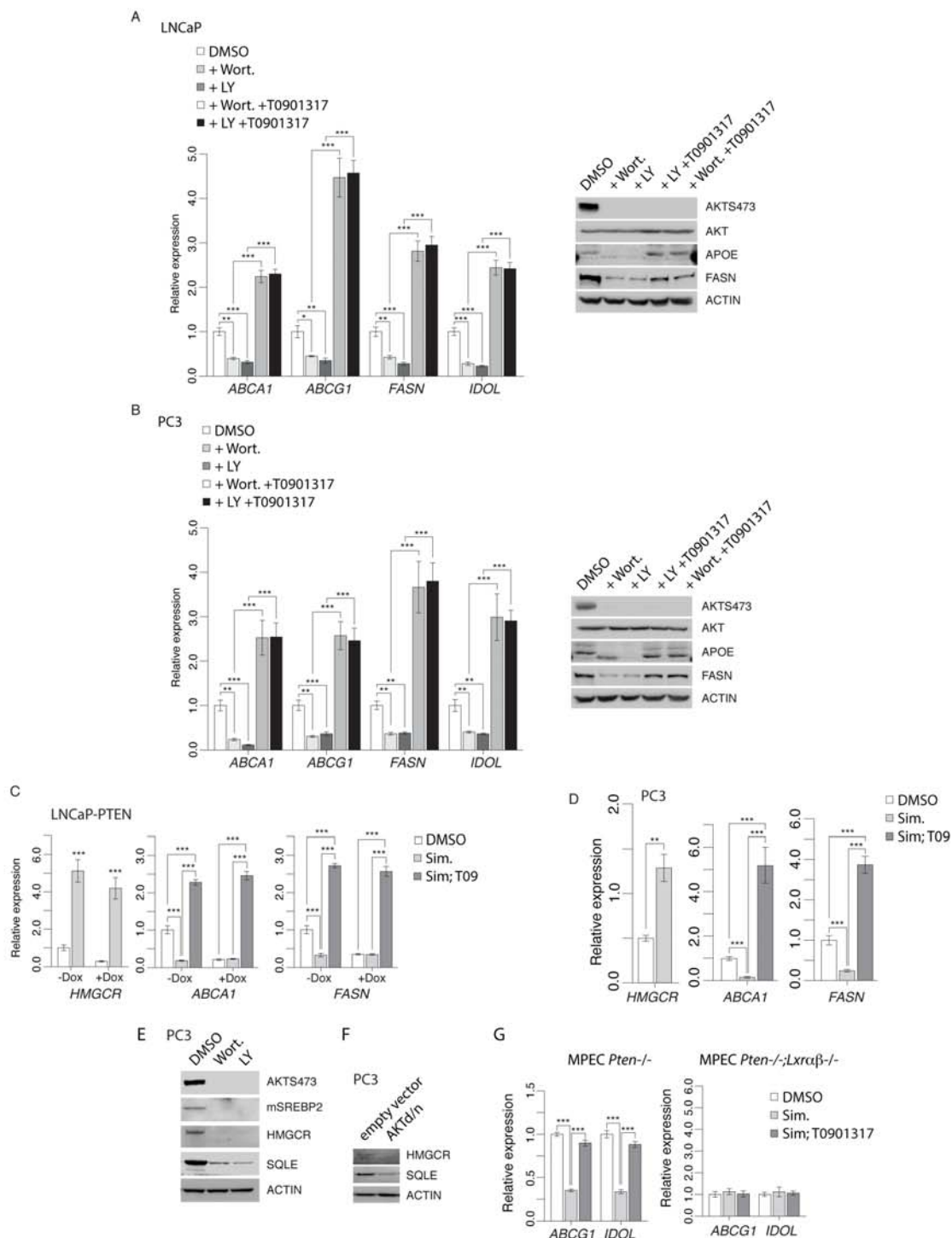


Figure S4. related to Figure 3.

(A,B) Relative expression and protein accumulations of LXR targets in LNCaP and PC3 cells treated with Wortmannin (0,5μM), LY294002 (20μM) and/or T0901317 (1μM). (C) qPCR analysis of *HMGCR*, *ABCA1* and *FASN* expression in LNCaP PTEN treated with doxycycline (25μM), simvastatin (2,5μM) and/or T0901317 (1μM). (D) qPCR analysis of *HMGCR*, *ABCA1* and *FASN* expression in PC3 cells treated with simvastatin (2,5μM) and/or T0901317 (1μM). (E) Immunoblot against AKTS473, mature-SREBP2 (mSREBP2), *HMGCR*, *SQLE* and β-ACTIN in PC3 cells treated with Wortmannin (0,5μM) or LY294002 (20μM). (F) Immunoblot against *HMGCR*, *SQLE* and β-ACTIN in PC3 cells transfected with AKTdn expression vector. (G) *Abcg1* and *Idol* relative expression in MPEC *Pten*^{-/-} and *Pten*^{-/-}; *Lxraβ*^{-/-} treated with DMSO, Simvastatin (2,5μM) and/or T0901317 (1μM). All data are represented as mean ± SEM. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

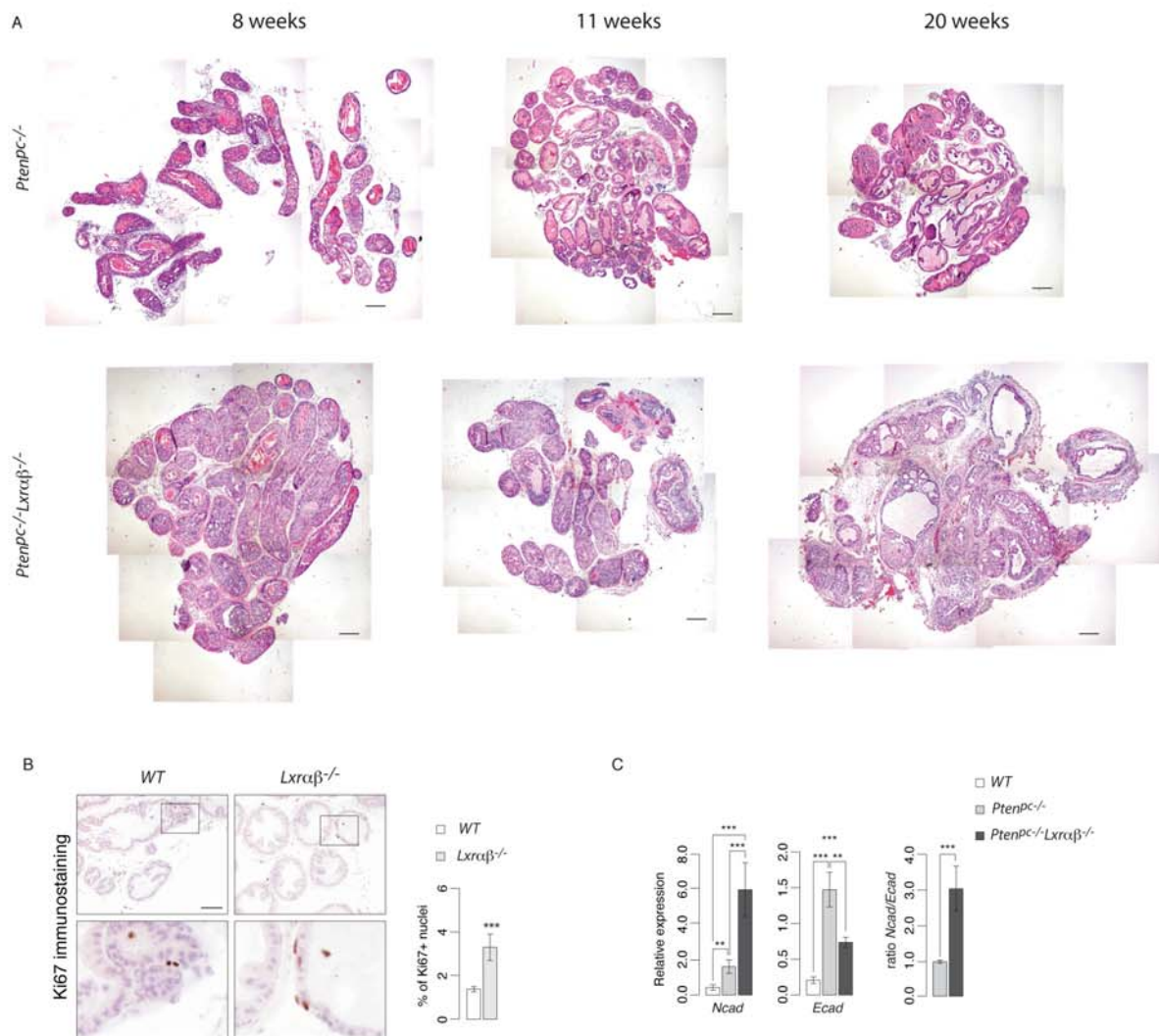


Figure S5. related to Figure 4.

(A) HE-stained entire sections of representative dorsal prostate (DP) at 8, 11 and 20 weeks from *Pten^{pc/-}* and *Pten^{pc/-};Lxra β ^{-/-}* mice. Scale bar, 100 μ m. (B) Representative and quantitative analysis of Ki67 immunohistochemistry on prostatic tissues from WT and *Lxra β ^{-/-}* mice (6-months old). Scale bar, 100 μ m. (C) Relative expression of *Ncad* and *Ecad* in prostate samples from WT, *Pten^{pc/-}* and *Pten^{pc/-};Lxra β ^{-/-}* mice (6-months old). All data are represented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

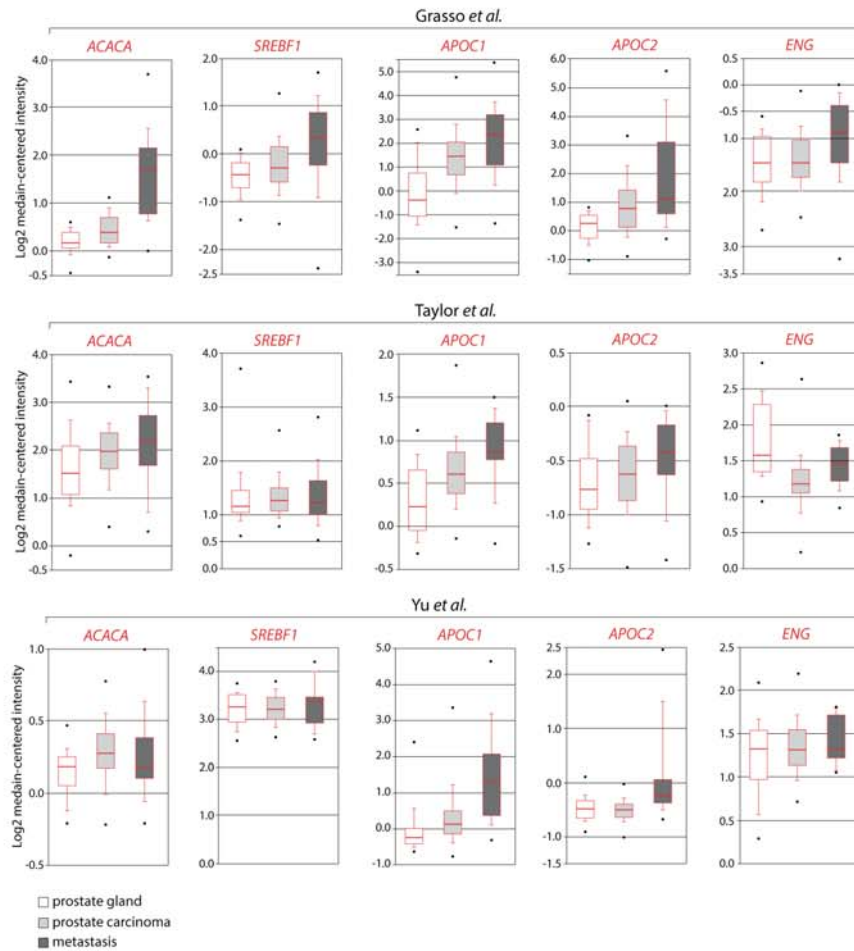


Figure S6. related to Figure 5.

OncoPrint box plot of *ACACA*, *SREBF1*, *APOC1*, *APOC2* and *ENG* expression levels between human prostate gland, prostate carcinoma and metastasis in datasets referred Grasso et al., 2012; Taylor et al., 2010; Yu et al., 2004. All data are represented as mean $\pm$ SEM. *** p<0.001.

Supplemental Experimental Procedures

Mouse Embryonic Fibroblasts

MEFs have been derived from 13.5 dpc embryos wild type, *Lxr α ^{-/-}*, *Lxr β ^{-/-}* or *Lxr $\alpha\beta$ ^{-/-}*. Briefly, dorsal part of the dissected embryos have been sliced and incubated with PBS Trypsin-EDTA digestion mix (Sigma-Aldrich) at 37°C for 45 min. Solution was homogenized using a syringe with 19G needle and plate in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with FCS 10% (Biowest), glutamine 2mM (Sigma-Aldrich), MEM Nonessential amino acids Solution (Sigma-Aldrich), Streptomycin 100µg/ml (Sigma-Aldrich) and Penicillin 100µg/ml (Sigma-Aldrich). MEFs have been split upon confluency until a period of massive senescence. After 2 months of culture, MEFs regrowth normally and have been considered as auto-immortalized.

Western blot analysis

Proteins were extracted from tissues and cells using a buffer solution with Hepes 25mM, NaCl 400mM, MgCl₂ 1.5mM, EDTA 200mM, Nonidet-P40 1% supplemented with phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM, Na₃VO₄ 0.1mM, NaF 0.1mM and complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France). Lysates were resolved on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Detection was performed using a peroxidase-conjugated anti-rabbit or mouse immunoglobulin G (P.A.R.I.S) and the Western Lightning System (Perkin- Elmer Life Sciences).

<i>Antibody</i>	<i>Dilution</i>	<i>Manufacturer</i>	<i>Reference</i>
APOE	1/500	Gift From A. Mazur	none
pAKTS473	1/1000	Abcam	ab9271
β-ACTIN	1/2000	Sigma-Aldrich	A2066
GAPDH	1/15000	Novus Biologicals	NB300221
AKT1	1/1000	Cell Signaling Tech	#2967
SLUG	1/500	Cell Signaling Tech	#9585
ZEB1	1/500	Cell Signaling Tech	#3396
FASN	1/500	Santa cruz	SC-20140
PTEN	1/1000	Cell Signaling Tech	#138G6
SNAI1	1/500	Cell Signaling Tech	#3879
VIMENTIN	1/500	Santa cruz	SC-5141
MMP9	1/1000	Abcam	ab38898
E-cadherin	1/500	Cell Signaling Tech	#3195
N-cadherin	1/500	Cell Signaling Tech	#4061

RT-qPCR

For cells experiments, total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For prostate tissues, mRNA were extracted using the NucleoSpinRNAII kit (Macherey Nagel EURL, Hoerd, France). cDNA was synthesized with MMLV-RT (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Brumath, France). Four µL of 1:20 diluted cDNA template were amplified by 0.75U of HotMaster TaqDNA polymerase (Eppendorf) using SYBR Green dye to measure duplex DNA formation on a LightCycler 480 system (Roche Diagnostics). Primer sequences used are described in the following table:

Mouse primers	Forward	Reverse
ABCA1	GGAGCTGGGAAGTCAACAAC	ACATGCTCTCTTCCCGTCAG
ABCG1	GACCTTTCCTACTCTGTACCCG	TTCATGAGTGTGGACTTCCCAG
IDOL	TACCGAGCCATCACCGAAAC	CCCTCCTGGCATGGTCATAG
APOE	TCTGACCAGGTCCAGGAAGAG	CATCAGTGCCGTCAGTTCTTG
FASN	AGCGGCCATTTCATTGCC	CCATGCCCAGAGGGTGTTG
ACACA	TTTCACATTCCGAGCAAGGGA	TTAGCAGCCCCAAGGTACAG
SCD1	CATCATTTCTCATGGTCCTGCT	CCCATTCTGTACACGTCATTCT
SCD2	TGCAAGCTCTACACCTGTCTC	GGCAATGATGAGGAAGAGCCT
RARB2	AGCTCCAAGAACCCTGCTG	GATGCTGCGGAGATCTGTGA
RXRG	GGCAGAGGAGCCGAGAGCGA	GGGGATGCGTTTGGCCCACT
PPARA	GGGAAAGACCAGCAACAACC	ATCGGACCTCTGCCTCTTTG
ABCB10	CCCAAGCGAGGGCTATGGCG	GAATGCCGTTGGCAGCAGCG
NR1H2	AAGCAGGTGCCAGGGTTCT	TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT
NR1H3	AGGAGTGTGACTTCGCAAA	CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT
PTEN	CGCGGCGGGAGGACAAGTTC	TCTGAGGTTTCTCTGGTCTCTGGT
SCD5	CCCAAGCTGGAGTACGTCTG	TGCTTTATAGGTTCCGGTGGCT
ENG	GGTGTTCCTGGTCCTCGTTT	CAAAGGAGGTGACAATGCTGG
NKX3.1	ATTGTTCCGTGTCCCTTGTT	ACTGATTGACGAAACAGGACAGA
CLUST	ACTGTGTGCAAGGAGATCCG	GTTAGCCTGGGCAGGATTGT
KI67	TAGAGGATCTGCCTGGCTTC	TGTCCTTGGTTGGTTTCTCC
CCNA2	ATGTCAACCCCGAAAACTG	TAAGCTCAGCTGGCCTCTTC
CCNB2	GGCTTCTGCAGGAACTCTG	TTTCTCGGATTTGGGAACTG
CCND2	TCCCGCAGTGTTCTCTATTC	CTGGGGCTTCACAGAGTTGT
ZEB1	CCGGCTCCTACTCTCAACAC	CCTCCACTGTACCATCAGTC
ZEB2	GTAACACGTCAGTCCGTCCCC	CAGGCTCGATCTGTGAAGTC
TWIST1	CCACTAGCAGCGGAGCTCC	GCTCCAGAGTCTCTAGACTGTC
TWIST2	CCATGTCCGCCTCCCACTAG	GGGTCATGAGGAGCCACAAGG
SNAI1	TGGAAAGGCCCTTCTCTAGGC	GCCTGGCACTGGTATCTCTT
VIMENTIN	TGGCACGTCTTGACCTTGAA	CTGTTCTGAATCTGGGCCT
TGFB1	AGGGCTACCATGCCAACTTC	CCACGTAGTAGACGATGGGC
NCADH	GTTTACAGCGCAGTCTTACC	AGCTTCTCACAGCATAACACC
ECADH	ACGTCCATGTGTGTGACTGTG	AGGAGCAGCAGGATCAGAATC
MMP1	AGGGGAGAGGTGTTTTCTTCA	TAGCTTCATAAGCAGCGTCAA
MMP2	ACAGTGACACCACGTGACAA	GGTCAGTGGCTTGGGGTATC
MMP7	ATGGGCCAGGGAACACTCTA	GTGGCCAAATTCATGGGTGG
MMP9	CGCTCATGTACCCGCTGTAT	CCGTGGGAGGTATAGTGGA
SREBP2	GCTCTGTGTGCTGTGAACCT	ACAGACTCTGGGCACGATTT
HMGCR	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
SQS	TCTGCCACCGGATGGGGTGT	TTCCCAACAGCCCAGCAACG
HMGCS1	TGACATGCTCTCCGAGTACC	CAGGAACATCCGAGCTAGAG
ABCG5	TGGATCCAACACCTCTATGCTAAA	GGCAGGTTTTCTCGATGAACT
ABCG8	ATCGGCAACTTCACCTTCTC	CTGATGCCGATGACAATGAG
GLUT4	CGGACACTCCATCTGTTGGG	GGCCACGATGGAGACATAGC
APOC1	GGATGGAGGCTCTTCATCGCT	GTTCCGGACAAATCCGGGG
APOC2	GGAGGTTGCCAAAGACCTG	CTTGCTTGGCAGCTACTCTC
LPL	GATGGCAAGCAACACAACCA	TGTCCACCTCCGTGTAAATC
CHREBP	TGGCAATGCTGACATGATCCA	GGGGCGGTAATTGGTGAAGA
LRH1	GAAGCTGCTTCAAACTGC	CCGTTACGTGCTTATAGTAC
TIMP2	GTTTATCTACACGGCCCCCTA	TCTGGGTGATGCTAAGCGTG

Human primers	Forward	Reverse
ABCA1	GCACTGAGGAAGATGCTGAAA	AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTACAC
ABCG1	CAGGAAGATTAGACACTGTGG	GAAAGGGGAATGGAGAGAAG
IDOL	CGAGGACTGCCTCAACCA	TGCAGTCCAAAATAGTCAACTTCT
FASN	CCCCAACCCCTGAGATCCCA	TTGATGCCCCACGTTGCC
SCD1	CTTGCGATATGCTGTGGTGC	TGGTGGTAGTTGTGGAAGGC
RXRG	CCCAGTGAGTGCCCCACGGA	CCGGGGCTGGTGGATGGGTA
PPARA	TCATCCTCTCAGGAAAGGCCA	GACGGTCTCCACTGACGTG
ABCB10	CCTTTGTTTTGAGCGTGGTG	GCCTCTTTCCTTGCTAACTG
NR1H2	AACAAACGCTCCTTCTCCGA	GGTGATACACTCTGTCTCGT
NR1H3	AGGAGTGTGCGCTTCGCAA	CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT
PTEN	ATTCCCAGTCAGAGGCGCTA	CACCTTTAGCTGGCAGACCA
SCD5	ATTTCTGGCTGTGCGCAACT	GTCAGCATCCGTCTCTGAGT
ENG	GCGGTGGTCAATATCCTGTC	GGAAGTGTGGGCTGAGGTAG
SREBP2	GAGACCATGGAGACCCTCAC	GGAGCTACACAGCTGTTCTGA
HMGR	TATGCCCATCCCTGTTGGAG	CACCACCCACCGTTCCTATC
SQS	ACCAAACAGTGATTGCCGAC	ACCAGCCCAGCAACATAGTG
HMGCS1	CCGAAGGAGGAAACAGTGACA	AGGGCAACAATTCCCACATCT
ABCG5	GCCGACTGTGCATGACTGCTC	TTACATTCTTGGGTCCGCTCAG
ABCG8	CCGGGGGCTTCATGATAAACT	CTGAGGCCAATGACGATGAGGTA

Immunofluorescence, Immunohistochemistry

ABCA1	1/200	Direct Alexa	Novus	NB 400-105
pAKTS473	1/100	Direct Alexa	Abcam	Ref 9271
b-ACTIN	1/200	Direct Alexa	Sigma-Aldrich	A2066
CK18	1/200	TSA amplification	Santa cruz	Sc-28264
PSCA	1/50	Direct Alexa	Santa cruz	Sc-28819
PCNA	1/100	Direct Alexa	Santa cruz	Sc-7907
Ki67	1/500	Novared amplification	Spring Bioscience Corp.	M3062
FASN	1/100	Direct Alexa	Santa cruz	Sc-20140
PTEN	1/100	TSA amplification	Cell Signaling Tech	Ref 138G6
SNAI1	1/100	Direct Alexa	Cell Signaling Tech	Ref 3879
VIMENTIN	1/100	Direct Alexa	Santa cruz	Ref 5141
MMP9	1/300	Direct Alexa	Abcam	Ab38898
PERILIPIN 2	1/400	TSA amplification	Abcam	Ab108323

Conclusion Article 1

Le but de ce projet était de caractériser le rôle des LXRs durant la dissémination métastatique du cancer de la prostate.

Nos résultats montrent que :

i) Il existe une interaction fonctionnelle des LXRs avec le suppresseur de tumeur PTEN. En effet, nous avons montré que la perte de PTEN (altération génétique la plus fréquente durant le cancer de la prostate (Taylor et al., 2010)) est associée à une augmentation de l'activité des récepteurs LXRs et de leur programme transcriptionnel.

ii) Ce mécanisme est dépendant de l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT et d'une augmentation subséquente de la synthèse *de novo* du cholestérol *in vivo* ainsi que dans différentes lignées tumorales humaines. En effet, le blocage de la voie du mévalonate (biosynthèse du cholestérol) par des statines entraîne une diminution de l'activité des LXRs. Cette activité peut être restaurée par l'apport exogène d'oxystérols.

iii) L'invalidation des *Lxrs* chez les souris *Pten*^{-/-} entraîne une hausse de la fréquence métastatique et diminue le taux de survie des souris. Cette observation est associée à une augmentation importante de l'agressivité tumorale au sein des sites primaires et à une accélération de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Ces travaux démontrent que les LXRs se comportent comme des acteurs importants dans l'évolution métastatique du cancer de la prostate.

ARTICLE 2

Liver X Receptors suppress prostate metastasis dissemination by interfering with TGF β -EMT axis.

Présentation du contexte scientifique

La première partie de mes travaux de thèse (Article 1) a permis de caractériser une fonction de « gardien » des LXR α vis-à-vis de la dissémination métastatique du cancer de la prostate, induit par la perte du suppresseur de tumeur PTEN. Ce projet a également défini la nature des dérèglements métaboliques aboutissant à la stimulation des LXR α en l'absence de PTEN. Ainsi, suite à l'activation de la voie PI3K/AKT, une augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol et un apport massif d'oxystérols, dont certains ligands des LXR α , ont été caractérisés.

Le second objectif a été de comprendre comment les récepteurs sont capables de contenir l'échappement tumoral. Pour cela, deux paramètres importants sont à prendre en considération :

- La caractérisation des souris *Pten^{loxP}/Lxr^{-/-}* a mis en évidence une augmentation de l'expression très marquée des acteurs de l'EMT. Pour rappel, cet événement permet à la cellule tumorale, initialement épithéliale, d'acquérir un phénotype mésenchymateux et des propriétés migratrices et invasives. D'un point de vue moléculaire, ce phénomène se traduit par une perte des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine ou la Vimentine. Pour cela, l'action de facteurs de transcription tels que SNAI, SLUG, ZEB, ou TWIST est nécessaire. La littérature indique d'ailleurs, concernant les tumeurs prostatiques, que l'agressivité du cancer, la résistance à la chimiothérapie et les récives après prostatectomie sont corrélées au niveau d'expression de ces différents marqueurs (Kwok et al., 2005; Ray et al., 2006; Tanaka et al., 2010). De plus, le ciblage d'acteurs tels que TWIST par ARN interférence est associé à une augmentation de la sensibilité de la cellule aux drogues anti-cancéreuses dans le cadre du cancer de la prostate (Kwok et al., 2005).

- Chez les souris uniquement invalidées pour les LXR α , des travaux ont pu mettre en évidence une corrélation entre l'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux, tels que SNAI, et une activité importante de la voie du TGF β (Kim et al., 2009). Comme défini en introduction, cette signalisation demeure fondamentale dans la

régulation de l'EMT durant la carcinogenèse prostatique, et son expression est associée à des phases avancées de la maladie (principalement l'isoforme $\beta 1$ du TGF) (Principe et al., 2014). Ainsi, le traitement de lignées tumorales prostatiques à l'aide d'un anticorps neutralisant du TGF β induit-il l'acquisition d'un phénotype épithélial (Hu et al., 2014). En lien, cette signalisation active l'expression de facteurs de transcription tels que SNAI ou SLUG (Slabáková et al., 2011).

De ce fait, les données bibliographiques indiquent que LXR β est capable d'inhiber l'activité du récepteur 1 du TGF β par une interaction directe (Mo et al., 2002). En se basant sur la dérégulation concomitante de TGF β et de l'EMT chez les souris invalidées pour les *Lxrs* et l'augmentation de l'EMT au sein des souris *Ptenl α r^{-/-}*, nous nous sommes demandé si :

1) En contexte tumoral, les récepteurs étaient capables de moduler la voie de l'EMT par l'intermédiaire de la signalisation du TGF β .

2) Une telle action pouvait en partie expliquer la différence du potentiel métastatique mis en évidence entre les souris *Pten^{-/-}* et *Ptenl α r^{-/-}*.

ARTICLE 2

Under submission

Under submission

Under submission

Liver X Receptors limit prostate metastasis dissemination by interfering with TGF β -EMT axis.

A. Alioui^{1,2,3,4}, J. Dufour^{1,2,3,4}, L. Bousset^{1,2,3,4}, D. Volle^{1,2,3,4}, J.M. Lobaccaro^{1,2,3,4} and S. Baron^{1,2,3,4}

In order to identify new factors involved in the inhibition of aggressive prostate cancer forms, our team previously characterized an LXRs gatekeeper function respect to prostate cancer metastasis induced by the loss of PTEN tumor suppressor. This new study aims to highlight subjacent molecular mechanism containing tumor dissemination. We herein demonstrate that LXRs activity slows down prostate cancer metastasis by a newly identified mechanism. Indeed, these analyzes identify an LXR-TGF β -EMT axis where receptor interferes with TGF β pathway activation, resulting in EMT process decrease. Results also demonstrate crucial function of this mechanism during tumor escape in vivo, and efficiency of LXR agonism during a background therapy targeting TGF β pathway in human tumoral cells.

¹Clermont université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F63000 Clermont-Ferrand, France

²CNRS, UMR 6293, GReD, F-63178 Aubière, France

³INSERM, UMR 1103, GReD, F-63178 Aubière, France

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

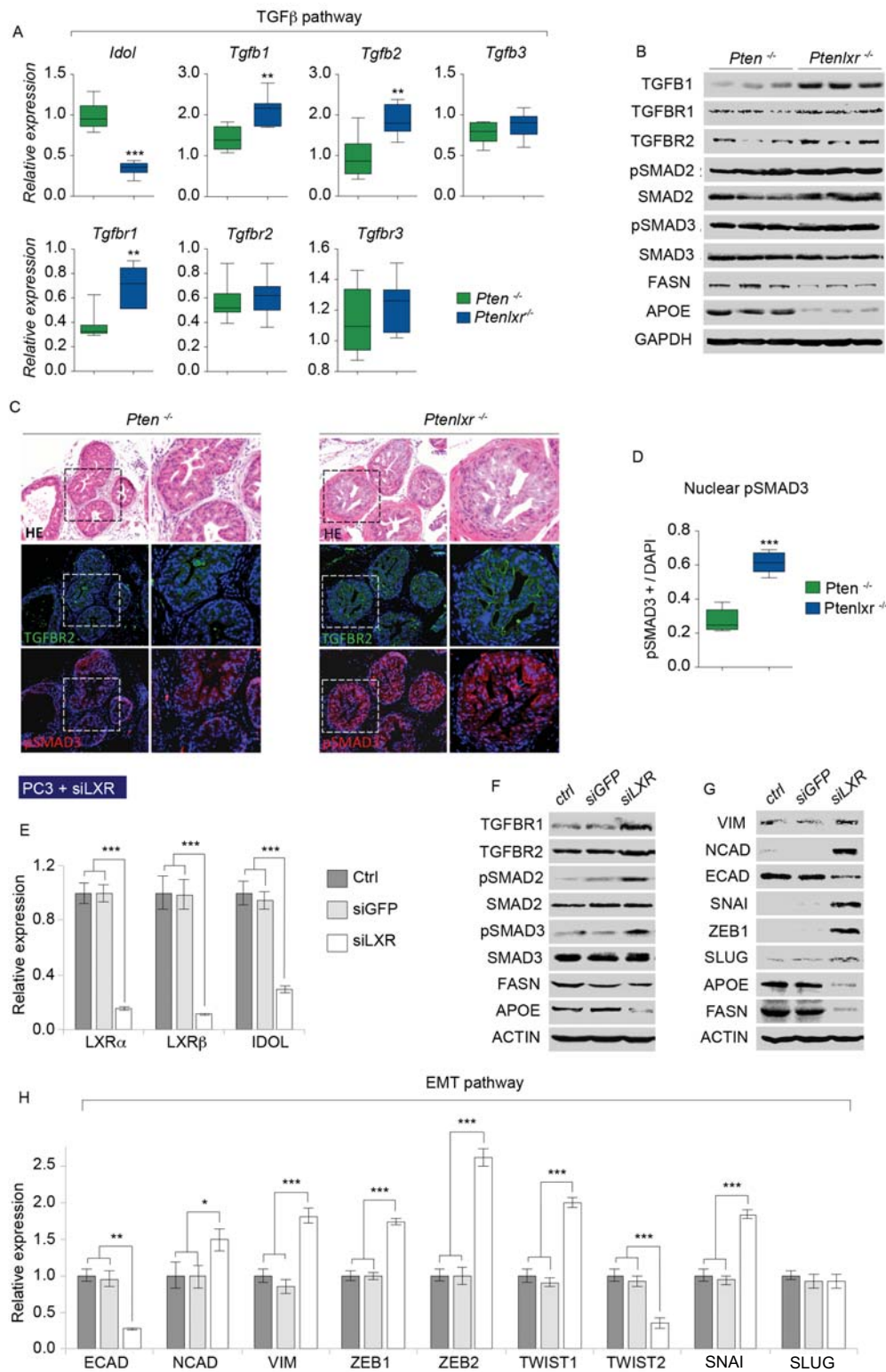


Figure 1. LXR status modifies TGF β -EMT axis during prostate carcinogenesis.

(A-B) Relative expression and protein accumulation on TGF β pathway effectors in 6 months old *Pten*^{-/-} and *Ptenlxr*^{-/-} mice prostates (N=10/10). (C) Immunofluorescence of TGF β R2 and pSMAD3 in 6 months old *Pten*^{-/-} and *Ptenlxr*^{-/-} mice prostates and (D) Quantitative measurement of nuclear pSMAD3-positive cells has been performed. (E) Relative expression on LXR α , LXR β and IDOL transcripts on PC-3 cells transfected without siRNA and with siGFP or siLXR α and β . (F-H) Relative expression and protein accumulation on TGF β pathway effectors and EMT markers on PC-3 cells transfected without siRNA and with siGFP or siLXR α and β . All data are represented as mean $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001. See also Figure S1 and S2.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death in men (Siegel et al., 2015). Clinical management of this cancer is complex especially in the metastatic state of the disease, due to a lack of therapeutic strategies after castration resistant cancer emergence.

The importance of metabolic reprogramming in cancer is being increasingly recognized, notably regarding the central involvement of cholesterol metabolism in PCa (Schulze and Harris, 2012). A such event could for example offers cell opportunity to build membrane and promote its dependent signaling pathways, or, in the specific case of prostate cancer, to provide a large amount of steroids precursors. Thus, cholesterol metabolism increase represent an event associated with tumor progression (Pelton et al., 2012), and its enrichment is therefore frequently observed in solids prostate tumors (White, 1909; Swyer, 1942). Both LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) isoforms, including in prostate tissue, represent crucial sensors of intracellular cholesterol accumulation and metabolic cell modifications, by binding the downstream oxysterols species, oxidized cholesterol forms (de Boussac et al., 2013). In this way, involvement of LXRs in proliferation and apoptosis regulation in tumorigenic cell lines has already been demonstrated (Pommier et al., 2010), and linked with protective function against neoplastic lesions (Pommier et al., 2013). To identify potent role of LXRs during latter steps of the disease and despite the high frequency of PTEN deletion in PCa, we generated *Lxr* knockout in tumorigenic mouse model based on prostate specific *Pten* invalidation (Wang et al., 2003), and then identified LXRs as a potent tumor suppressors responding to tumoral cholesterol accumulation, as their deletion is associated with highly aggressive prostatic lesions and systematic metastatic outcome (personal data, under publication). This parallel study address the identification of molecular event linking LXRs activity and prostate cancer dissemination constraining. To answer this, two fundamental elements were taken into consideration.

Characterization of *PtenLxr*^{-/-} mice revealed first a large increase of Epithelio-Mesenchymal Transition (EMT) process, explaining in part observed spreading event. Indeed, EMT refers to a program by which epithelial cells acquire a mesenchymal phenotype, while enabling them to migrate from their original compartment easier, and has been involved in many stages of embryonic development but also in tumorigenesis diseases (Kalluri, 2009). Morphological changes performed during EMT process include a loss of epithelial cells polarization. Various analyzes show a significant decline in cytokeratins and cell contact proteins such as desmoplakin and E-cadherin during prostate carcinogenesis (Ray et al., 2006), correlated with mesenchymal-associated transcription factor expression, as SNAIL, SLUG, or ZEB (Tanaka et al., 2010). This observation is inversely correlated with the tumor grade, its invasiveness, and resistance to radiotherapy. In addition, patients exhibiting aberrant expression of EMT markers

such as E-cadherin and N-cadherin after prostatectomy develop a greater risk of metastatic disease outcome (Ray et al., 2006). The association between EMT and prostate cancer dissemination is also evident through the study of key transcription factors. For example, the increase of TWIST transcription factor expression is observed in 90% of prostate cancers (Kwok et al., 2005), and RNA interference experiments induce tumor cells sensitivity to anticancer drugs. Finally, recent data shows that the accumulation of EMT markers favors the emergence of resistance to castration, inducing finally tumor independence with respect to the androgen signaling (Shiota et al., 2015).

This first observation can be linked with a study realised in *Lxr* knockout mice, where EMT markers increase is associated with TGF β pathway modification and its downstream SMADs signaling (Kim et al., 2009). TGF β signaling is known to promote tumor progression mainly in advanced steps of the disease (Cao and Kyprianou, 2015). This function is especially attributed to EMT process regulation, immunosuppressive capacity, angiogenesis, and bone tropism. Regarding prostate carcinogenesis, the ligand β 1 isoform is mostly involved in EMT induction (Principe et al., 2014), and tumoral prostate cell lines treatment with neutralizing antibodies against TGF beta 1 is associated with E-cadherin increase (Hu et al., 2014). In addition, the work of Slabakova et al. showed that TGF β is able of inducing, in prostate tumor lines, the expression of transcription factors involved in EMT, as SNAIL2 and SLUG (Slabakova et al., 2011). Besides the inductive potential of TGF β next to EMT process, other effectors has been involved, such as TGF β R (Transforming growth factor receptor) complex in the TRAMP model. TGF β dysregulation results in acceleration of tumor malignancy in these mice mainly by inducing EMT (Pu et al., 2009). Clusterin, a chaperone molecule having pleiotropic effects, has also been highlighted as effector of TGF β . Transcription induction of Clusterin through TGF β overexpression leads to a significant accumulation of Twist1, favoring the induction of mesenchymal markers such as N-cadherin or Fibronectin: Clusterin inhibition suppresses this effect (Shiota et al., 2012).

Thus, well-known proximity between TGF β signaling and SMADs-dependant EMT induction could offers an explanation to tumorigenic EMT modification following *Lxr* knockout in *Pten*^{-/-} mice, keeping in mind that a study showed, in endothelial cells, an inhibitory effect of LXR on TGF β R by direct interaction, leading finally to TGF β pathway decrease (Mo et al., 2002). Thus, we asked for molecular link between LXR and EMT modification during prostate tumorigenesis, focusing on TGF β pathway regulation. Using prostate cancer mouse model *Pten*^{pc/-} and tumoral cell lines, we herein demonstrate that LXR is able to inhibit EMT process by interfering with TGF β pathway activity, leading thus to decrease of prostate cancer aggressiveness and metastatic spreading.

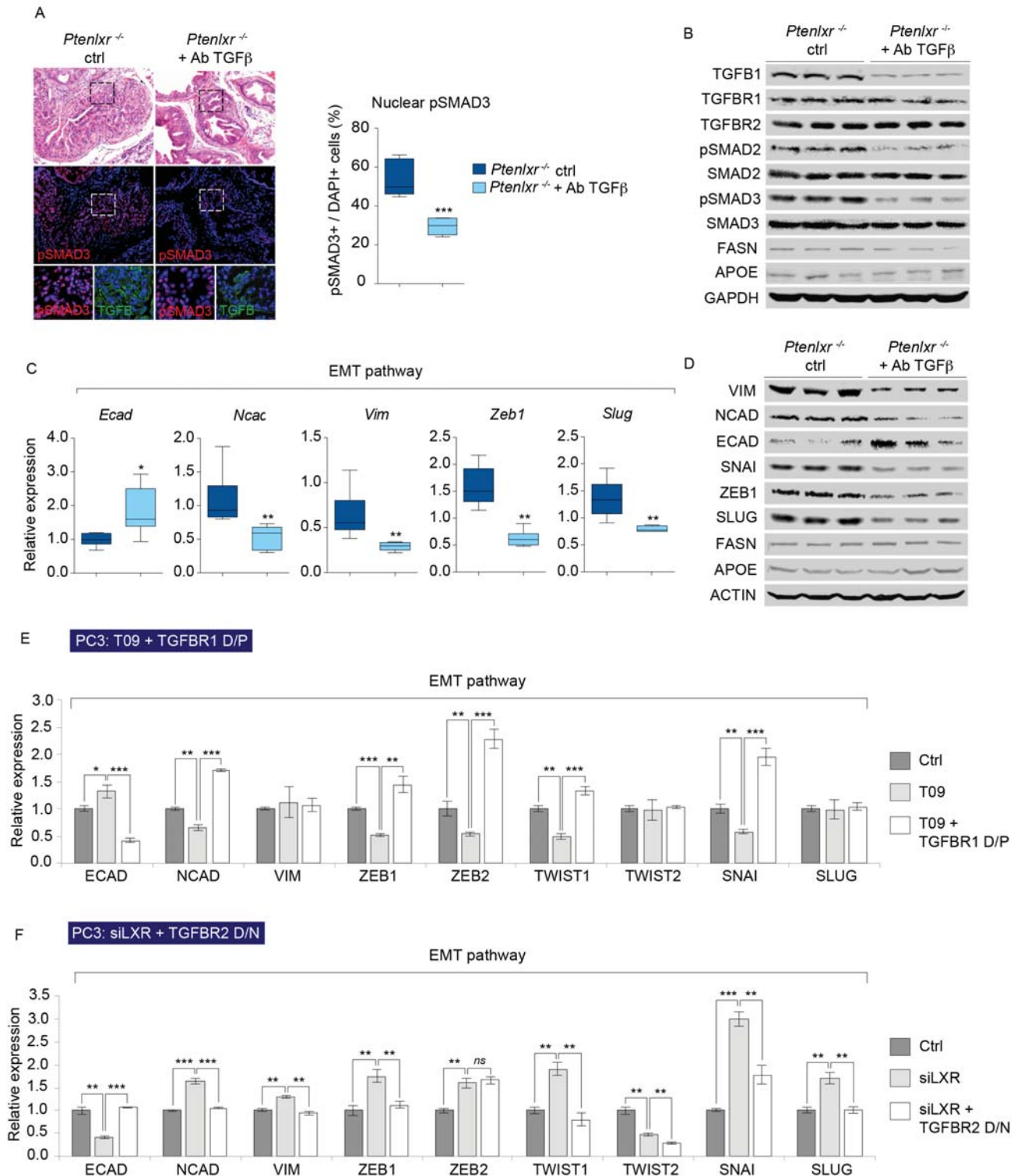


Figure 2. TGF β pathway is a crucial LXR effector driving EMT process.

(A) Immunofluorescence of TGF β and pSMAD3 on prostates of 6 months old *Ptenlrx*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody (N=6/6) and quantitative measurement of nuclear pSMAD3-positive cells has been performed. (B) Protein accumulation of TGF β pathway effectors on prostates of 6 months old *Ptenlrx*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody. (C-D) Relative expression and protein accumulation of EMT markers on prostates of 6 months old *Ptenlrx*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody. (E-F) Relative expression of EMT markers in PC-3 cells transfected with TGFBR positive or negative dominant and treated with T0901317 or siLXR α and β respectively. All data are represented as mean $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001. See also Figure S3.

Results

LXR status is associated with TGF β -EMT axis dysregulation during prostate carcinogenesis.

As described above, team's experience helped to highlight the role of LXR in cycle regulation of prostate tumor cells and initiation of the disease. Our most recent results also demonstrate a central function in metastatic spreading. In order to identify the process leading to this phenotype, our work previously revealed an increase of EMT processes within *Ptenl α ^{-/-}* mice. Due to various correlations already established between LXR and TGF β pathway, we decided to characterize the activity of the latter in mice, in comparison to a murine tumor model only invalidated for *Pten*. TGF β signaling is mostly mediated by the action of SMADs proteins. TGF β ligands bind type II receptor, followed by the recruitment and the phosphorylation of TGFBR1 which in turn activates SMAD2/3 by its kinase activity. Finally, SMAD2 and 3 phosphorylated are associated with cytosolic SMAD4 and translocate into the nucleus to regulate the expression of various target genes, including EMT transcription factors.

Thus, in *Ptenl α ^{-/-}* mice prostates whose molecular characterization is shown Figure S1, we observed transcriptional accumulation of ligands B1, B2, and TGFBR1 (Figure 1A). These results were validated at the protein level and then definitively associated with constitutive activation of the TGF β pathway by the analyse of SMAD2/3 phosphorylation (Figure 1B). This was finally correlated with an increase of 2 times of the number of prostate epithelial cells positives for TGF β R2 and exhibiting a pSMAD3 nuclear localization (Figure 1C-D). We wished to determine if the correlation between the loss of LXR in the tumor environment and the increased activity of the TGF β pathway was representative of a direct link. For this purpose, we realized a siRNA directed against both LXR isoforms in human prostate tumor cell line PC3. After checking the protocol effectiveness (Figure 1E), a significant decrease of the TGF β pathway activity has been detected by western blot (Figure 1F). It has been mostly associated with a raise of EMT process, highlighted at the transcriptional and protein level by an increase of transcription factors ZEB1, TWIST1, SLUG and SNAIL, and resulting in a loss of E-CADHERIN and a gain of mesenchymal markers such as N-CADHERIN and VIMENTIN (Figure G-H). These results have also been tested on DU145, another prostate tumoral cell line of reference (Figure S2A). More fundamentally, treatment with a synthetic LXR agonist, T0901317, shown that LXR were also able, once activated, to engage the phenotype of mesenchymal cells (MEF) to a transition toward an epithelial phenotype regarding molecular markers analyze (Figure S2B).

Overall, these initial results indicate that the loss of LXR during prostate carcinogenesis is directly associated with an increase of two highly related process, TGF β pathway and EMT. It then suggests that TGF β signaling could represents

a crucial intermediate between LXRs and EMT process.

Secondly, we wished naturally to determine whether TGF β regulation by LXRs during prostate carcinogenesis constitutes the main mechanism driving EMT process modification. To this aim, we treated *Ptenl α ^{-/-}* mice with a TGF β neutralizing pan-antibody (RnD systems, MAB1835, 1D11). After one month of administration, results firstly shown treatment efficiency at the prostatic level by immunohistochemistry, as indicated by the decrease of TGF β accumulation, and correlated with a reduction in the number of pSMAD3 positive cells within the nucleus (Figure 2A). This clear effect was also observed by western blot, resulting in lower pSMAD2 and pSMAD3 accumulation in parallel with the decrease TGF β protein (Figure 2B). Interestingly, TGF β pathway downregulation is distinctly associated with a decrease of the various EMT transcription factors and effectors, at both transcriptional and protein levels (Figure 2C-D).

To definitively determine if LXR were able to inhibit the epithelial-mesenchymal transition by TGF β pathway interference, we used a strategy of TGFBR1/BR2 positive/negative dominants, combined with agonist treatment or siRNA against both LXR isoforms. As illustrated, the regulation exerted by LXR opposite to EMT process is overstepped during a constitutive activation of TGF β pathway in PC3 (Figure 2E and S3A) and DU145 cells (Figure S3C). Mirroring this first experiment, LXR siRNA is, as described above, correlated with an EMT increase, phenomenon abolished during a forced TGF β inhibition (Figure 2F, S3B and S3D). Together, these results show in vivo and in vitro that LXR are able to inhibit EMT process by interfering with TGF β pathway.

LXR-dependent PCa aggressiveness reduction is mediated by TGF β -EMT inhibition.

The following crucial question of the project was to assess whether the dysregulation of TGF β -EMT axis within *Ptenl α ^{-/-}* mice represent the major component leading to prostate aggressiveness previously characterized by our team. For this, we performed phenotypic analysis of mice treated with the TGF β neutralizing antibody. After one month of treatment of mice developing at base an aggressive intraprostatic tumor phenotype, analyzes revealed first a decrease of the proliferation/apoptosis ratio (Figure 3A-B and Figure S4A). This data is molecularly correlated to a decrease of *Ccnd2* transcripts level (Figure S4B) and reduction of prostates weight (Figure 3C). Histologically, this first characterization is associated with a decrease of invasive carcinomas events, evaluated by scoring of hematoxylin-eosin stainings (Figure 3D) as well as immunohistochemistry quantification analyzing basal lamina breaks (SMA-) associated with proliferating cells (Ki67+), (Figure 3E). Interestingly, the study is reinforced by a decrease of aggressiveness markers transcription widely characterized in prostatic tumorigenesis such as

ARTICLE 2 : Liver X Receptors limit prostate metastasis dissemination by interfering with TGF β -EMT axis.

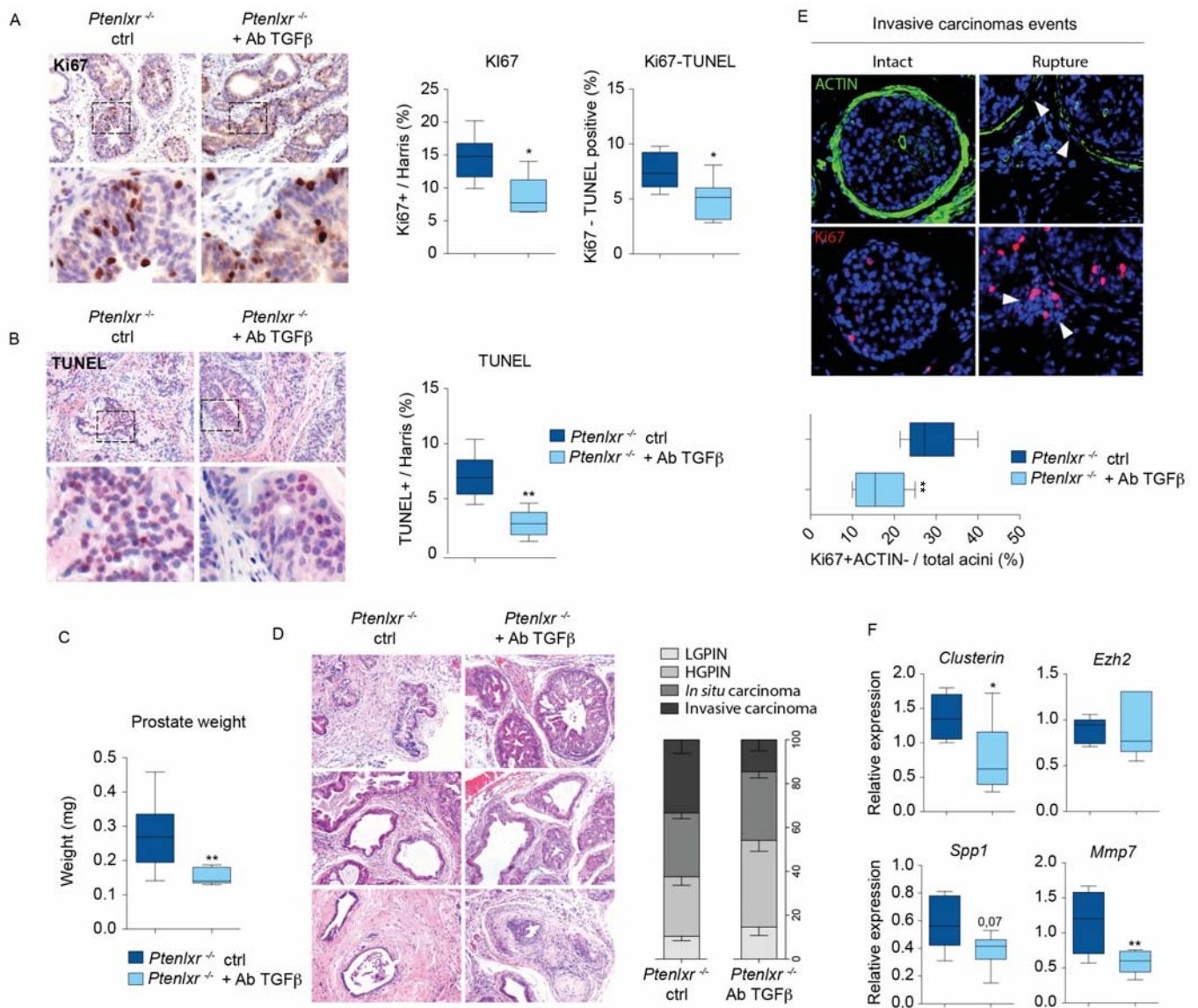


Figure 3. Prostate carcinogenesis aggressiveness modification exerted by LXR is dependent on TGF β -EMT axis regulation.

(A-B) Ki67 and TUNEL immunohistochemistry and quantitative measurement performed on dorsal prostate of 6 months old *Ptenlxr*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody (N=6/6). (C) Relative weight of prostates *Ptenlxr*^{-/-} and *Ptenlxr*^{-/-} + pan-TGF β -neutralizing antibody. (D) Histological evaluation of dorsal lobe lesions, Low-Grade PIN, High-Grade PIN, In situ Carcinoma or Invasive Carcinoma. Three distant sections from each mouse were scored. (E) Ki67 and SMA immunofluorescence performed on *Ptenlxr*^{-/-} or *Ptenlxr*^{-/-} + pan-TGF β -neutralizing prostate specimens. Acini breaks have been quantified using following criteria: discontinuous SMA staining and presence of Ki67-positive staining in surrounding stromal compartment. (F) Relative expression on PCa aggressiveness markers *Clusterin*, *Ezh2*, *Spp1* and *Mmp7*. All data are represented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. See also Figure S4.

Clusterin, *Spp1*, or *Mmp7* (Figure 3F). Overall, prostatic phenotype obtained after treatment with neutralizing antibody against the TGF β fairly shows that the prostatic aggressiveness developed within *Ptenlxr*^{-/-} mice is widely refunded. These results confirm that the dysregulation of TGF β -EMT axis in these mice explains exacerbated tumor phenotype.

Metastatic spreading inhibition exerted by LXR is mediated by TGF β -EMT axis inhibition.

In light of these results, we rationally wondered if TGF β -EMT axis dysregulation was sufficient to explain the dramatic metastatic spreading previously characterized by our team within *Ptenlxr*^{-/-} mice. To investigate this question,

we took once again advantage of TGF β -neutralizing antibody. Thus, the first analyze indicate that the treatment leads to a decrease of the proliferating cells population positive for SNAI and VIMENTIN markers, thereby characterizing a smaller theoretical capacity of tumoral cell to metastasize (Figure 4A-B). Interestingly, regarding prostate carcinomas already established, the number of proliferating cells retaining expression of EMT markers is restricted, suggesting that the most advanced tumor lesions are also altered (Figure 4C). Finally, the analysis of prostatic-deriving metastasis in mice *Pten^{lcr}* lungs (Figure 4D-E) shown a clear decrease of the dissemination frequency (Figure 4F) as well as lower pulmonary area affected concerning individuals exhibiting metastases (Figure 4G-H and Figure S5). These results therefore shown that the inhibition of TGF β -EMT axis by LXR represents the main component of their restricting control regarding metastatic dissemination during prostatic carcinogenesis.

LXR agonism potentializes TGF β -targeted metastasis inhibition during human orthotopic grafts

To determine whether TGF β pathway neutralization combined to LXRs activation could be effective against dissemination of human tumoral cells, we decided to realize an orthotopic graft protocol on nude SCID mice using PC3 cells. In vitro preliminary results strengthened us in this way since simultaneous treatment with anti-TGF β and GW3965 leads to a synergistic reduction of EMT markers (Figure S6A-B). Cells were thus implanted within one of the two anterior prostate lobes randomly. After 15 days, mice were treated for 4 weeks with anti-TGF β antibody alone or with GW3965 (Figure 5A). Thus, the results show firstly the viability of graft protocol, observed macroscopically and by histological analysis (Figure 5B). Interestingly, anti-TGF β treatment associated with GW3965 leads to a decrease of the other prostatic lobes and seminal vesicles colonization by the grafted cells (Figure 5B). Treatments effectiveness within these grafted cells has been assessed through the increase of the LXR-target FASN and the decrease of pSMAD3 accumulation (Figure 5C). Interestingly, we also noted in vivo optimal efficiency of the double treatment on pSMAD3 reduction. This finding is correlated with a significant decrease in proliferating cells positives for EMT markers as SNAI (Figure 5D). Consistent with, fewer number of proliferating cells positives for SNAI has been detected in the various prostatic lobes of mice (Figure S6C). This then suggests a decrease of tumor cell properties to spread outside the primary tumor. Fortunately, the graft procedure allowed the emergence of multiple metastases, particularly in the liver, lymph nodes, and lungs (Figure 5E and S6D). A scoring of these events indicates that the tumor cells, identified by immunohistochemistry against pAKT (Figure S6E), exhibit a poorest ability to metastasize at the mesenteric and pulmonary levels in presence of anti-TGF β and GW (Figure 5F). In addition, the number of lung metastases observed has been significantly reduced (Figure 5G). Thus, mobilizing LXRs during a background therapy directed against TGF β pathway is of particular effectiveness

in managing metastatic dissemination of human cell models.

Discussion

Despite very effective therapeutic strategies implemented in the early prostate cancer stages, treatment of patients harboring metastases remains limited and involves identification of new targets specifically implicated in this process.

LXR involvement in carcinogenesis and specifically in metastatic spreading inhibition has been shown these last years through study of various tumor types such as melanoma or colorectal cancer. Indeed, LXR-dependent induction of ApoE within melanoma is associated with strong inhibition of metastatic process (Pencheva et al., 2014). Molecularly, the authors explain this phenotype and demonstrate that ApoE binds the LRP1 and LRP8 receptors displayed on tumoral cell and endothelial cell membranes respectively, interfering ultimately with tumor cell dissemination. Regarding colorectal cancer, receptor activation in various human cell lines leads a cell cycle arrest by controlling the expression of genes such as Skp2, c-Myc, or p15, but is mainly associated with a decrease of Retinoblastoma tumor suppressor phosphorylation (Chuu, 2011; Vedin et al., 2013). Receptor activation also suppresses β -catenin activity. A co-immunoprecipitation experiment thus shows a direct inhibitory binding effect of LXR to the Armadillo domain of the protein (Uno et al., 2009).

Convergently, the work of our team demonstrates the involvement of LXR in prostate cancer progression, and highlights their inhibitory function on metastatic dissemination process. The results reported in this study emphasize a new molecular mechanism underlying the observed phenotype. Thus, LXR-dependent EMT inhibition by interfering with TGF β pathway is sufficient to constrain metastatic spreading, as a forced inhibition of this pathway in a carcinogenic mice model invalidated for both LXR isoforms is sufficient to mimic the anti-metastatic potential of the receptors (Figure 6). These results are particularly interesting as they show a synergism between a TGF β -neutralizing antibody used extensively in the literature and activation of LXR by specific agonists.

A direct functional link between LXR activation and inhibition of TGF β pathway can be reasonably explained. Thus, Mo *et al.* for example found, in endothelial cells, that the cytoplasmic domain of TGFBR is able to bind LXR β both in vitro and in vivo. This event, allowing initially LXR β phosphorylation, leads ultimately to transcription-independent inactivation of the TGF β signaling pathway (Mo et al., 2002). Related to these informations, mice invalidated for both LXR isoforms exhibit, at prostatic level, an increase of TGF β markers such as phosphorylated Smads, which represent major effectors of the canonical TGF β signaling pathway (Kim et al., 2009).

On another hand, the work initiated some years ago by our team demonstrated that LXR, via an intracellular cholesterol depletion, is able to disrupt lipid rafts coalescence, which

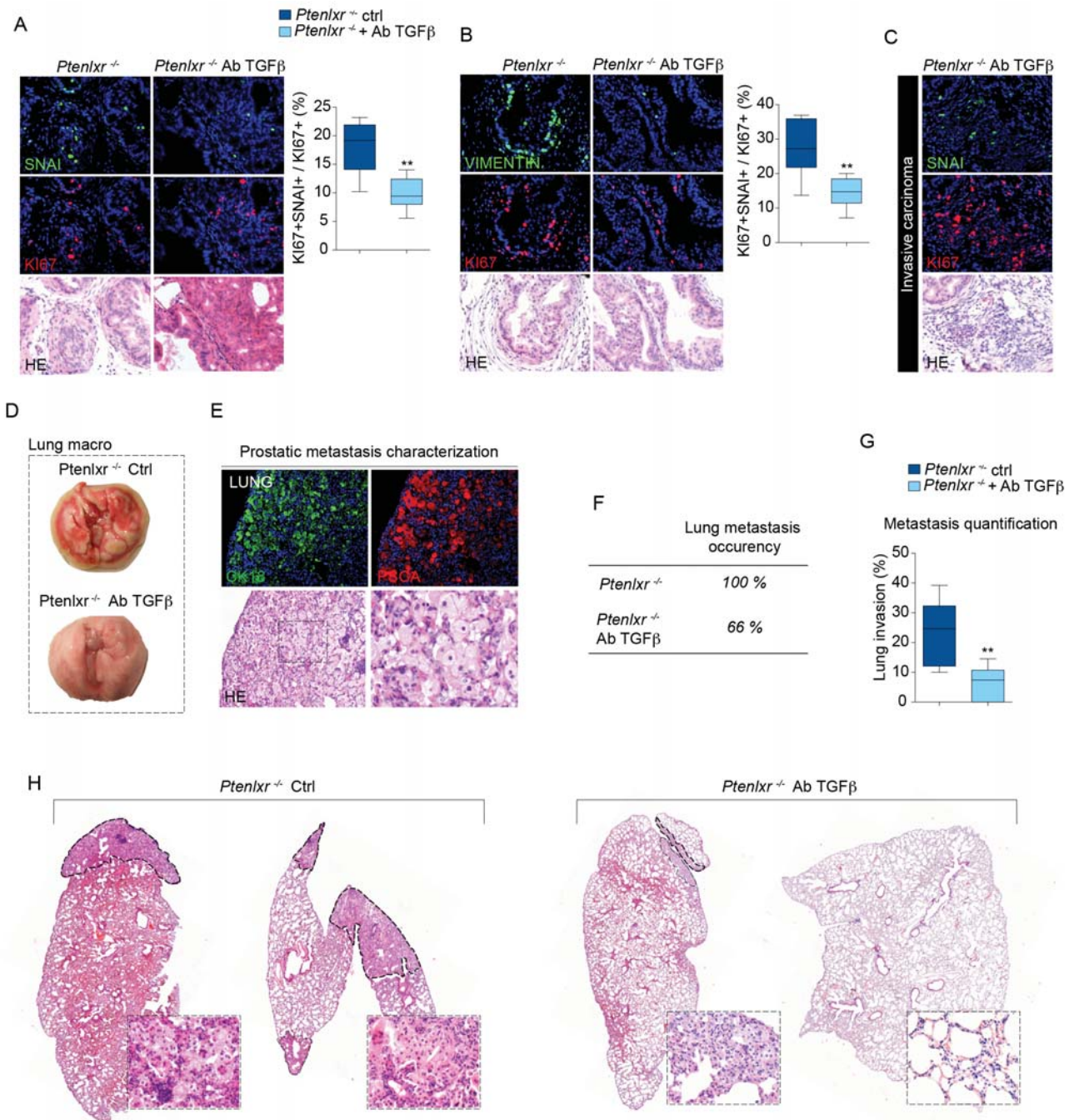


Figure 4. Metastatic spreading inhibition exerted by LXR is dependent on TGF β -EMT axis inhibition.

(A-B) Immunofluorescence staining against EMT markers SNAI and VIMENTIN, together with Ki67 on prostatic sections from *Ptenlxr*^{-/-} or *Ptenlxr*^{-/-} mice + pan-TGF β -neutralizing antibody (N=6/6). (C) Immunofluorescence against SNAI and Ki67 on invasive carcinoma events of *Ptenlxr*^{-/-} mice + pan-TGF β -neutralizing antibody. (D) Gross anatomy of lungs from 6-months *Ptenlxr*^{-/-} or *Ptenlxr*^{-/-} mice + pan-TGF β -neutralizing antibody, and (E) HE-stained sections and immunofluorescence detection of metastases in lungs using specific (CK18/PCSA) prostatic markers. High-magnification depicting cell arrangement within the host tissue. (F) Recapitulative table of metastatic phenotypes in *Ptenlxr*^{-/-} or *Ptenlxr*^{-/-} mice + pan-TGF β -neutralizing antibody. (G-H) Lung metastasized area quantification and HE reconstitution of representative lung lobes (N=6/6). Four distant sections from each mouse were quantified. All data are represented as mean $\pm$ SEM. *p<0.05, ** p<0.01; *** p<0.001. See also Figure S5

represent cellular platforms initiating various membrane-dependent signaling pathway (Pommier et al., 2010). Consistent with the literature, LXR activation and subsequent depletion of rafts cholesterol could inhibit the association between RI and RII subtypes TGF β partners receptors, leading at a decrease in the kinase activity of TGFBR1 and inhibition of the SMADs cascade (Chen et al., 2008). Conversely, LXR loss in tumor context could generate a better association of the RI/RII dimer, resulting in the increase of EMT process and metastatic capacity of the tumoral cells.

Our results show a large increase of TGF β 1 ligand within *Ptenlxl^{-/-}* mice prostates, which may represent a key element of the control exerted by LXR on this pathway. Among the three existing isoforms of TGF β , TGF β 1 is clearly implicated in advanced tumorigenesis progression, including prostate cancer (Ewart-Toland et al., 2004). Indeed, it is found overexpressed in prostate tumoral cells and has the potential, in particular by the canonical TGF β pathway, to promote angiogenesis, matrix remodeling and cell migration, as well as cell plasticity (Cao and Kyprianou, 2015). In addition to the tumoral cell itself, cellular microenvironment can also contribute to the TGF β production. Thus, tumor macrophage fraction (TAM, for tumor associated macrophages), which are associated with a M2 phenotype (alternately activated population), is able to express a wide range of molecules promoting angiogenic processes, cell growth and migration, immune suppression, and anti-inflammatory molecules such as IL-10, arginase 1 and TGF β 1 (Noy and Pollard, 2014). In addition to their crucial function in cholesterol homeostasis regulation into macrophage cells (A-González and Castrillo, 2011), various studies suggest that LXR modulate macrophage proliferation, differentiation, and polarization (A-González and Castrillo, 2011; Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011; Pascual-García et al., 2011; A-Gonzalez et al., 2013). Their invalidation within an aggressive tumor environment could therefore lead to a macrophagic fraction activity dysregulation, explaining the aberrant accumulation of TGF β 1, and thus TGF β -EMT axis overactivation observed in *Ptenlxl^{-/-}* mice.

As mentioned in the introduction, the duality of action of TGF β pathway makes it complex. Indeed, this signaling functions as an inhibitor of tumor growth in many cancer at early stages of the disease, and as a promoter of metastatic spreading during advanced stages (Lebrun and Lebrun, 2012). Among TGF β effectors, EMT process will allow to control migratory and invasive properties specific, required to cancer progression. Thus, human tissue studies reveals a colocalization of EMT and TGF β markers within tumor invasion front. A large panel of analyzes reinforces the intimate connection between the TGF β pathway and EMT regulation during tumor progression these recent years. As described previously, E-cadherin is frequently reduced in many cancer and sign an intense epithelial-mesenchymal transition activity. Interestingly, EMT-induced TGF β often coincides with E-cadherin expression loss

(Miettinen et al., 1994; Oft et al., 1996). Moreover, TGF β is able to induce transcription factors as SNAIL and SLUG, known to repress E-cadherin (Siegel and Massagué, 2003).

These properties characterize TGF β pathway as target of interest during clinical therapy. However, the dual functions of this signaling during carcinogenesis involves to accurately target the treatment to mainly modulate its function in metastatic spreading. In this regard, various I/II phases strategies are being tested. The LY2157299, a kinase inhibitor targeting the TGFBR1, is currently in Phase I trial with efficacy in patients with prostate cancer. LY573636 is meanwhile in phase II test on patients with advanced melanoma (Flavell et al., 2010). Inhibition of TGF β pathway in the context of immunotherapy is also relevant, since the FC1008, a neutralizing antibody against the three TGF β isoforms, is actually in phase I/II trial to treat breast cancer advanced stages (Trachtman et al., 2011). Finally, in prostate cancer strategies based on antisense oligonucleotides are also established against TGF β 1 (Flavell et al., 2010). In addition to show that LXR are able to constrain metastasis via inhibition of TGF β -EMT axis, the results presented in our study indicate that receptor activation is also able to act with a synergistic effect on strategies already overstudied and under clinical management.

LXR-dependent inhibition of prostate metastasis through the regulation of TGF β pathway opens up a last perspective. Indeed, among the most flagrant examples of TGF β involvement during metastatic process, recent studies have shown a fundamental function of this signaling in bone niching, which represents the major metastatic colonization site by prostatic and mammary tumoral cells. Thus, histological analyzes show that 75% of biopsies from bone metastases are characterized by increased of pSMAD2 accumulation in metastatic cells, indicating an overactivation of the TGF β pathway in these samples. Experimentally, tumor cells MDA-231 harboring a bone tropism transfected with a dominant negative of TGFBR2 exhibit a large decrease in the ability to establish tumor foci within the bones. This clearly demonstrates the importance of this pathway during bone metastasis setup (Kang et al., 2005; Javelaud et al., 2007). Molecularly, these results are illustrated by the ability of TGF β to regulate the production of pro-osteolytic factors such as PTHrP, activating the production of RANK ligand, ultimately leading to osteoclast differentiation and tumoral cell niching into bone tissues (Yin et al., 1999). This aspect reinforces the interest that could have an LXR targeting, especially in prostate cancer.

Overall, our study identifies LXR as a relevant target in metastatic stages of the prostate tumor disease, optimizing the effect of TGF β inhibitors, widely tested in clinical field during prostate carcinogenesis.

Methods

Animal experiments

All mouse studies were conducted according to standard handle and care in agreement with the local ethic committee. PB-cre4 T/

ARTICLE 2 : Liver X Receptors limit prostate metastasis dissemination by interfering with TGF β -EMT axis.

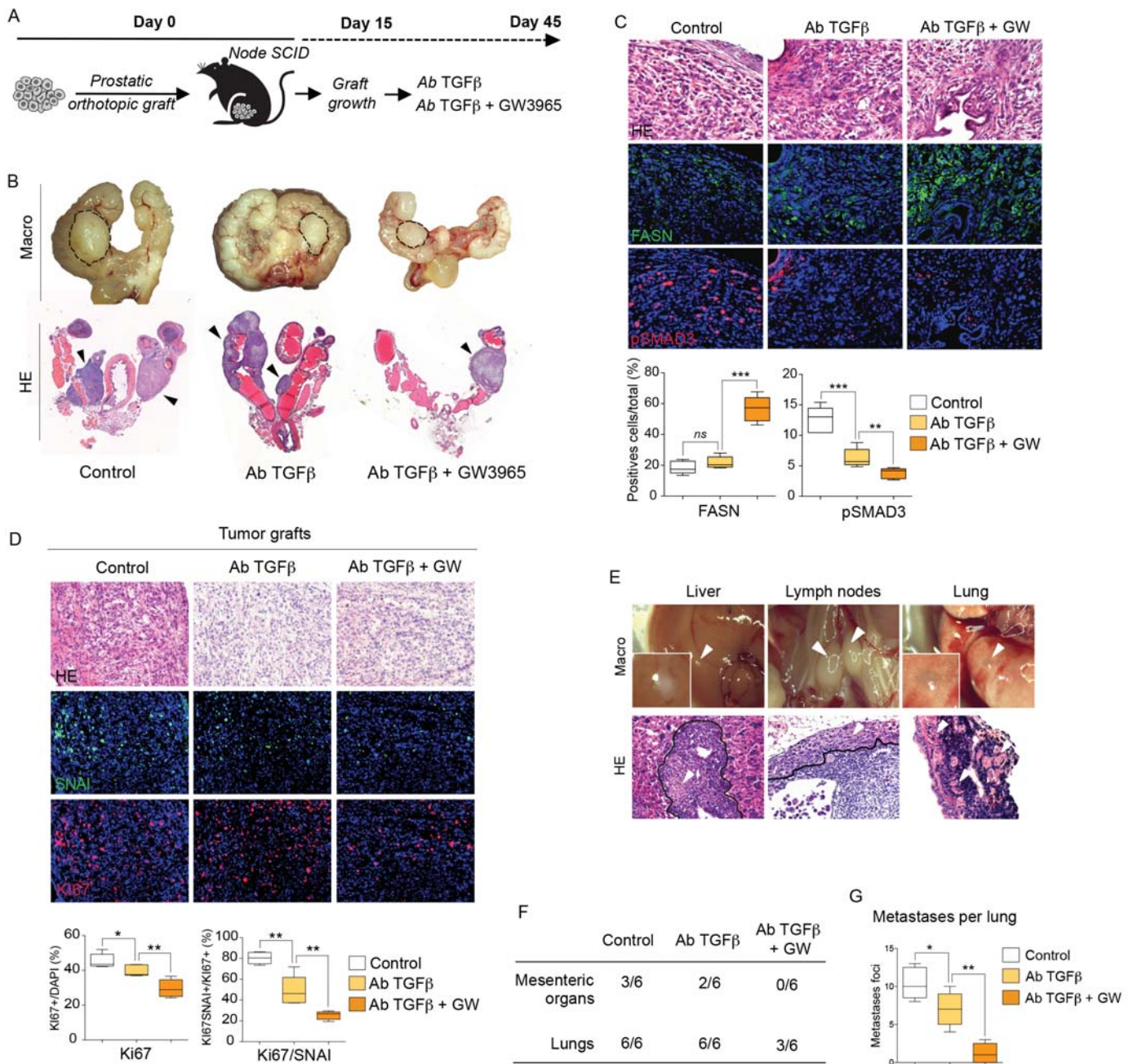


Figure 5. LXR activation potentiates anti-TGF β -dependant metastatic inhibition in human tumoral prostatic cells.

(A) Orthotopic graft protocol. (B) Macroscopic view and HE sections of urogenital blocs treated with anti-TGF β alone or with TGF β and GW3965 (cell grafts are indicated by dotted lines and black arrows). (C) Immunofluorescence staining and relative quantification of FASN and pSMAD3 on graft sections (N=6/6/6). (D) Immunofluorescence against SNAI and Ki67 on PC3 grafts treated with anti-TGF β alone or with anti-TGF β and GW3965. (E) Macroscopic characterization and histological analyse of metastatic foci in liver, lymph nodes and lung. (F) Metastatic colonization scoring of mesenteric organs and lungs. (G) Metastatic foci quantification performed on lungs lobes of mice treated with anti-TGF β alone or with anti-TGF β and GW3965. All data are represented as mean $\pm$ SEM. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. See also Figure S6

+:PtenloxP/loxP mice were provided by NCI mouse repository (Lesche et al., 2002; Wang et al., 2003; Wu et al., 2001), and crossed with Lxr α ^{-/-}Lxr β ^{-/-} mice were obtained from Dr. David Mangeldorf Lab. For simplicity, the resulting PtenloxP/loxP:PB-creT/+:Lxr α ^{-/-}Lxr β ^{-/-} mice were named PtenLxr^{-/-}. For TGF β neutralizing antibody treatment experiments (TGF-beta 1, 2, 3 Antibody, #MAB1835, RnD Systems), mice were injected in intraperitoneal 3 times a week (7 μ g of antibody per injection) during 4 weeks. Regarding orthotopic grafts protocol, 2 x 10⁶ cells have been implanted within one of the two anterior prostate lobes randomly. After 15 days, mice were treated for 4 weeks (3 times per week) with anti-TGF β antibody alone (TGF-beta 1, 2, 3 Antibody, #MAB1835, RnD Systems) or with GW3965 (Sigma-Aldrich).

Reagents

T0901317 and GW3965 ligands were purchased respectively from Cayman Chemical (71810) and Sigma-Aldrich (G6295). For cell culture, reagents were used diluted in DMSO (Sigma- Aldrich). For in vivo experiments, GW3965 was diluted into Methylcellulose. Primary and secondary antibodies used in immunoassay and western blot are listed in Supplemental Experimental Procedures.

Cell culture, treatments and transfection

All cell lines were cultured at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. DU145 and PC-3 cells were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen), and MEFs in DMEM medium (Invitrogen), containing penicillin/streptomycin (100 mg/ml), and supplemented with 10 % fetal bovine serum (Biowest). Transfections were performed using jetPRIME (PolyPlus transfection) according to manufacturer informations in 10 % fetal bovine serum-supplemented medium. Agonists Treatments were performed in 2 % Lipoprotein deficient serum (LPDS) during 48 hours. pRK5 TGF beta type I receptor (T202D) Flag was a gift from Rik Derynck (Addgene plasmid # 14833) and LNCX TbetARII DN was a gift from Rik Derynck (Addgene plasmid # 12640). For LXR RNA interference, PC3 and DU145 cells were transfected in 10% fetal bovine serum-supplemented medium with a single 400 pmol/ml small interfering RNA solution during 24h. Cells were then incubated in a fetal bovine serum-depleted medium containing a DMSO or T0901317 solution for 48h or transfected with TGFBR negative dominant for 24h. To silence genes, the following primers were used: siLXR α 5'-AGCAGGGCUGCAAGUGGAATT-3'; siLXR β 5'-CAGAUCCGGAAGAAGAAGATT-3'; siGFP 5'-ACUACCAGCAGAACACCCUUTT-3'. Quantifications or representative pictures represent, at least, three independent experiments. See Supplemental Experimental Procedures.

Immunohistochemistry

Animal tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin according to a standard protocol. For immunochemistry, paraffin sections were dewaxed, rehydrated, unmasked using 0.1M citrate buffer (pH 6.0) and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber. Detections were performed alternatively using the NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories) or Alexa 488 conjugated anti-mouse IgG/Alexa 555 conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen). Cell nuclei were stained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). To identify apoptosis in tumor sections, TdT-mediated dUTP nick end labeling method was applied using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics). For immunofluorescence experiments, cells were seeded onto glass coverslips. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-Triton X-100 0.1% buffer. Saturation was performed using PBS BSA 1%-SVF 1% blocking solution, and incubated with respective primary antibodies. Detection was conducted using secondary antibody Alexa 488 or 555 conjugated with anti-mouse or rabbit IgG (Invitrogen). See Supplemental Experimental Procedures.

Data analysis

Values are expressed as means $\pm$ SEM. Statistical comparisons were performed using a two-tailed Student's t test or ANOVA as indicating in figure legends. Throughout all figures, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001. Significance was considered at p < 0.05.

References

- A-González, N., and Castrillo, A. (2011). Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812, 982–994.
- A-Gonzalez, N., Guillen, J.A., Gallardo, G., Diaz, M., De la Rosa, J.V., Hernandez, I.H., Casanova-Acebes, M., Lopez, F., Tabraue, C., Beceiro, S., et al. (2013). The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 831–839.
- Cao, Z., and Kyprianou, N. (2015). Mechanisms navigating the TGF- β pathway in prostate cancer. *Asian Journal of Urology* 2, 11–18.
- Chen, C.-L., Huang, S.S., and Huang, J.S. (2008). Cholesterol modulates cellular TGF-beta responsiveness by altering TGF-beta binding to TGF-beta receptors. *J. Cell. Physiol.* 215, 223–233.
- Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2011). Macrophage polarization

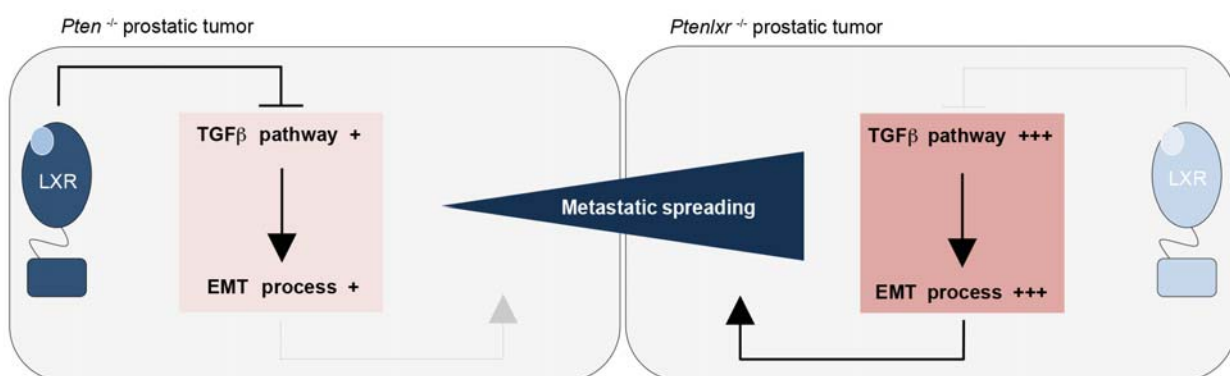


Figure 6. LXR activation constrains prostate cancer metastasis by inhibiting TGF β -EMT axis.

- in metabolic disorders: functions and regulation. *Curr Opin Lipidol* 22, 365–372.
- Chuu, C.-P. (2011). Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med. Hypotheses* 76, 697–699.
- Ewart-Toland, A., Chan, J.M., Yuan, J., Balmain, A., and Ma, J. (2004). A gain of function TGFB1 polymorphism may be associated with late stage prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 759–764.
- Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 554–567.
- Hu, S., Yu, W., Lv, T.-J., Chang, C.-S., Li, X., and Jin, J. (2014). Evidence of TGF- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in immortalized benign prostatic hyperplasia cells. *Mol. Membr. Biol.* 31, 103–110.
- Javelaud, D., Mohammad, K.S., McKenna, C.R., Fournier, P., Luciani, F., Niewolna, M., André, J., Delmas, V., Larue, L., Guise, T.A., et al. (2007). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res.* 67, 2317–2324.
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1417–1419.
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G.P., Serganova, I., Chen, C.-R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W.L., and Massagué, J. (2005). Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13909–13914.
- Kim, H.-J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2009). Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 558–563.
- Lebrun, J.-J., and Lebrun, J.-J. (2012). The Dual Role of TGF in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis, The Dual Role of TGF in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *International Scholarly Research Notices*, International Scholarly Research Notices 2012, 2012, e381428.
- Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R., and Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* 127, 2021–2036.
- Mo, J., Fang, S.J., Chen, W., and Blobel, G.C. (2002). Regulation of ALK-1 Signaling by the Nuclear Receptor LXR β . *J. Biol. Chem.* 277, 50788–50794.
- Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61.
- Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H., and Reichmann, E. (1996). TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* 10, 2462–2477.
- Pascual-García, M., Carbó, J.M., León, T., Matalonga, J., Out, R., Van Berkel, T., Sarrias, M.-R., Lozano, F., Celada, A., and Valledor, A.F. (2011). Liver X receptors inhibit macrophage proliferation through downregulation of cyclins D1 and B1 and cyclin-dependent kinases 2 and 4. *J. Immunol.* 186, 4656–4667.
- Pelton, K., Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2012). Cholesterol and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 12, 751–759.
- 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.
- Pommier, A.J.C., 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.
- Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., and Grippo, P.J. (2014). TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt369.
- Pu, H., Collazo, J., Jones, E., Gayheart, D., Sakamoto, S., Vogt, A., Mitchell, B., and Kyprianou, N. (2009). Dysfunctional transforming growth factor-beta receptor II accelerates prostate tumorigenesis in the TRAMP mouse model. *Cancer Res.* 69, 7366–7374.
- Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–821.
- Swyer, G. (1942). The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* 372–375.
- Trachtman, H., Fervenza, F.C., Gipson, D.S., Heering, P., Jayne, D.R.W., Peters, H., Rota, S., Remuzzi, G., Rump, L.C., Sellin, L.K., et al. (2011). A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- β antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 79, 1236–1243.
- 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, 2324.

186–195.

Vedin, L.-L., Gustafsson, J.-Å., and Steffensen, K.R. (2013). The oxysterol receptors LXR α and LXR β suppress proliferation in the colon. *Mol. Carcinog.* 52, 835–844.

White, C. (1909). On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 3–10.

Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G.R., and Guise, T.A. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* 103, 197–206.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. David Mangelsdorf (Dept. of Pharmacology and Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas) for providing the Lxr $\alpha\beta$ ^{-/-} mice. We thank Dr. André Mazur (INRA, Theix) for providing APOE antibody. We thank Sandrine Plantade, Kheredine Ouchane and Philippe Mazuel for efficient and fruitful work in mouse husbandry and care. We are grateful to Pradeep A. Val for discussion and improvement of the manuscript. We thank Christelle DamonSoubeyrant and Anip@th platform (GReD, Clermont-Ferrand) for histological exploration of mouse phenotypes. Julie Dufour was supported by ARC (Association de Recherche contre le Cancer). Silvère Baron and Jean Marc Lobaccaro were supported by “Cancer Auvergne Prostate” (CLARA, INCa), ARTP (Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques) and EDC-CaP Plan Cancer 2014-2019 INCa (Institut National du Cancer).

Author contribution

S.B. designed and S.B., A.A., J.D., performed the in vivo experiments. A.A. and J.D. performed the experiments. S.B. supervised experiments. S.B. performed computational analysis. J.M.A.L. contributed as senior author. S.B., A.A., D.V. and J.M.A.L. contributed to the writing of the manuscript.

Additional information

Supplemental Information includes X figures, Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Liver X Receptors limit prostate metastasis dissemination by interfering with TGF β -EMT axis.

A. Alioui^{1,2,3,4}, J. Dufour^{1,2,3,4}, L. Bousset^{1,2,3,4}, D. Volle^{1,2,3,4}, J.M. Lobaccaro^{1,2,3,4} and S. Baron^{1,2,3,4}

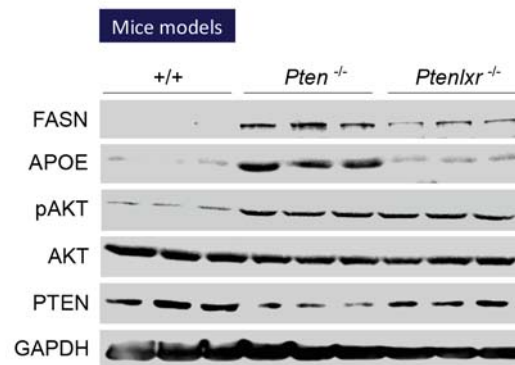
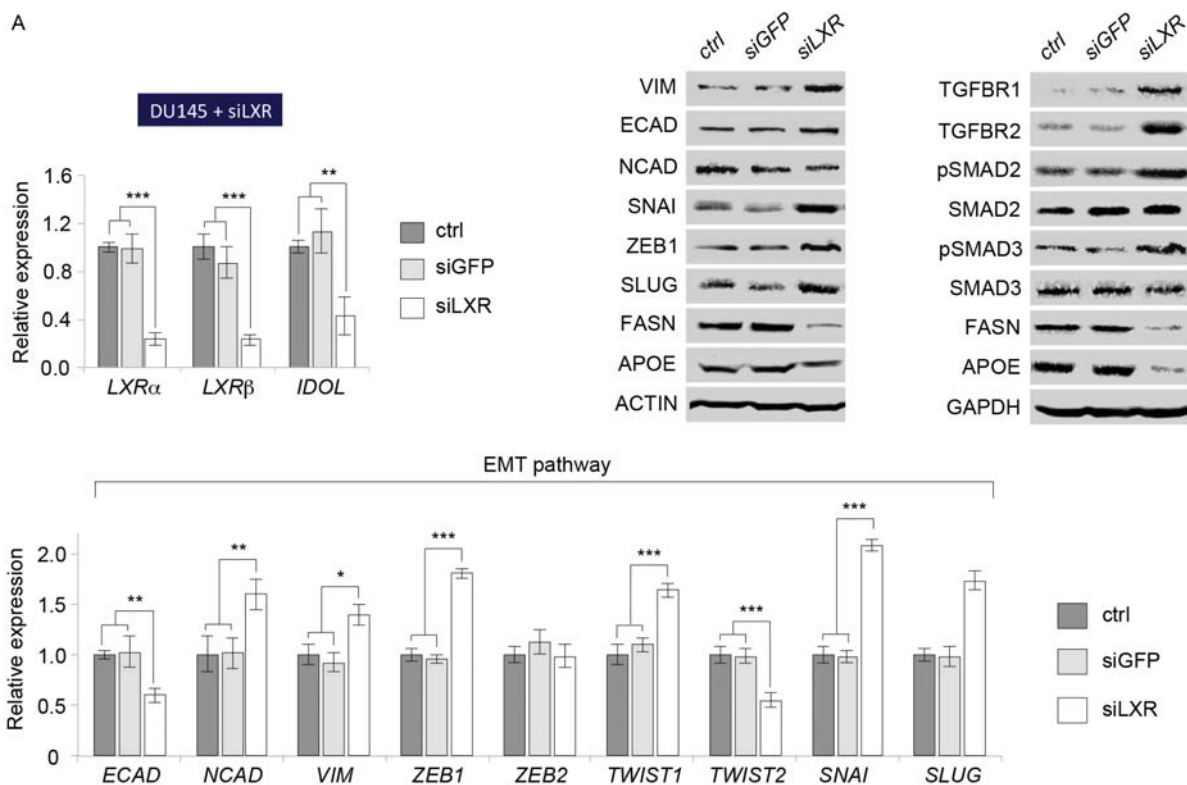


Figure S1. related to Figure 1.

Western blot analysis of PTEN, AKT, AKTS473, FASN, APOE and GAPDH of wild type (WT), *Pten*^{pc-/-} and *Pten*^{pc-/-}*Lxra* β ^{-/-} mouse prostate tissues from 6-months old animals.

A



B

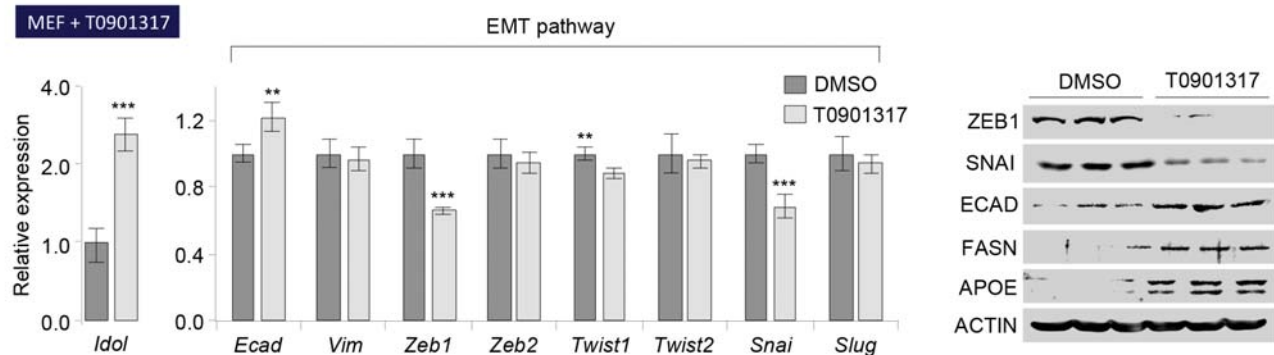


Figure S2. related to Figure 2.

(A) Relative expression of LXR α , LXR β and IDOL transcripts on DU145 cells transfected without siRNA and with siGFP or siLXR α and β ., and relative expression and protein accumulation of TGF β pathway effectors and EMT markers on DU145 cells transfected without siRNA and with siGFP or siLXR α and β . (B) Relative expression of *Idol* transcripts on MEF cells treated with T0901317, and relative expression and protein accumulation of EMT markers. All data are represented as mean $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001.

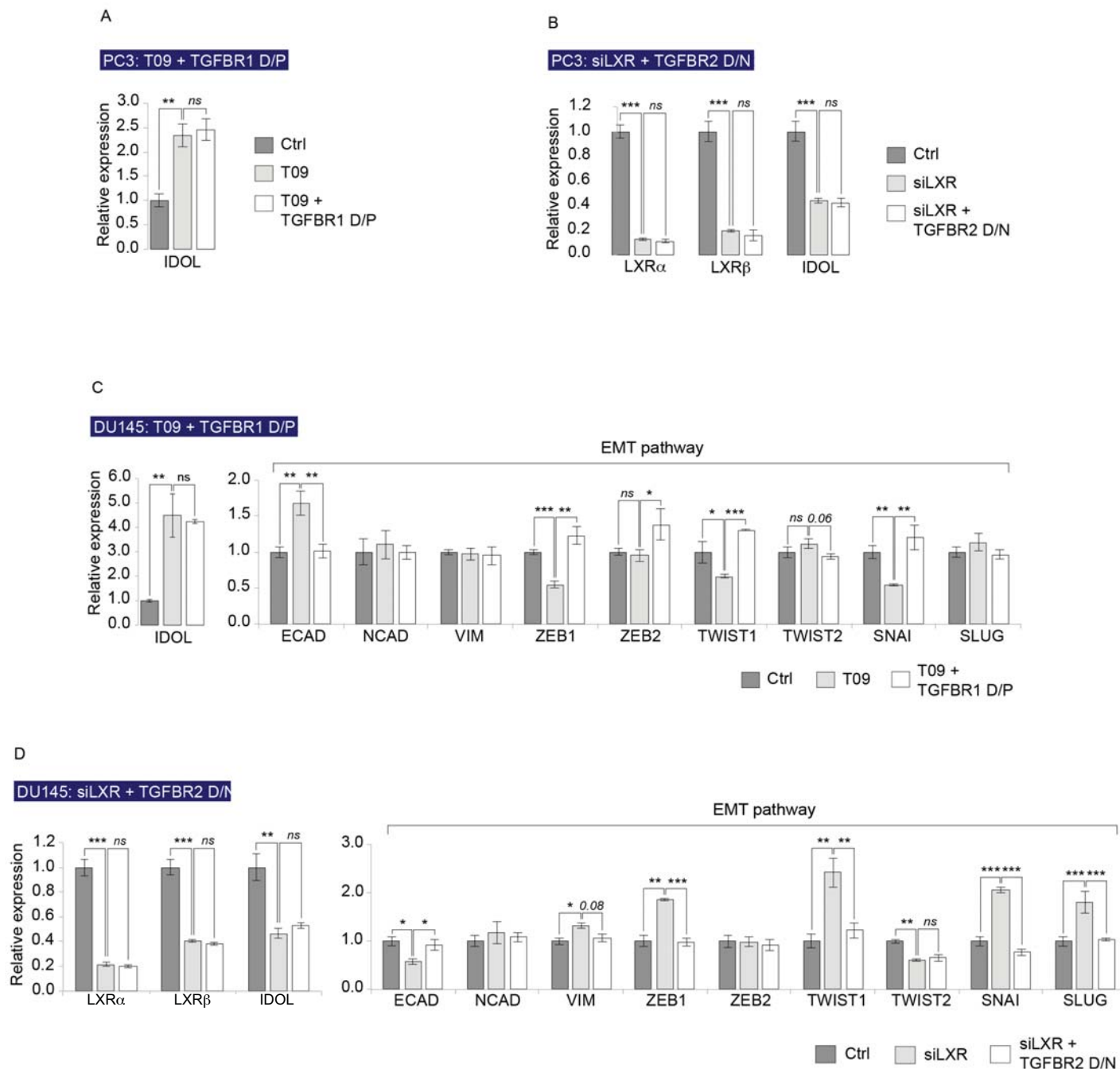


Figure S3. related to Figure 2.

(A) Relative expression of IDOL in PC3 cells transfected with TGFBR positive dominant and treated with T0901317. (B) Relative expression of LXR α , LXR β , and IDOL in PC3 cells transfected with TGFBR negative dominant and siLXR α and β . (C) Relative expression of IDOL and EMT markers in DU145 cells transfected with TGFBR positive dominant and treated with T0901317. (D) Relative expression of LXR α , LXR β , IDOL and EMT markers transcripts on DU145 cells transfected with siLXR α and β and TGFBR2 negative dominant. All data are represented as mean $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001.

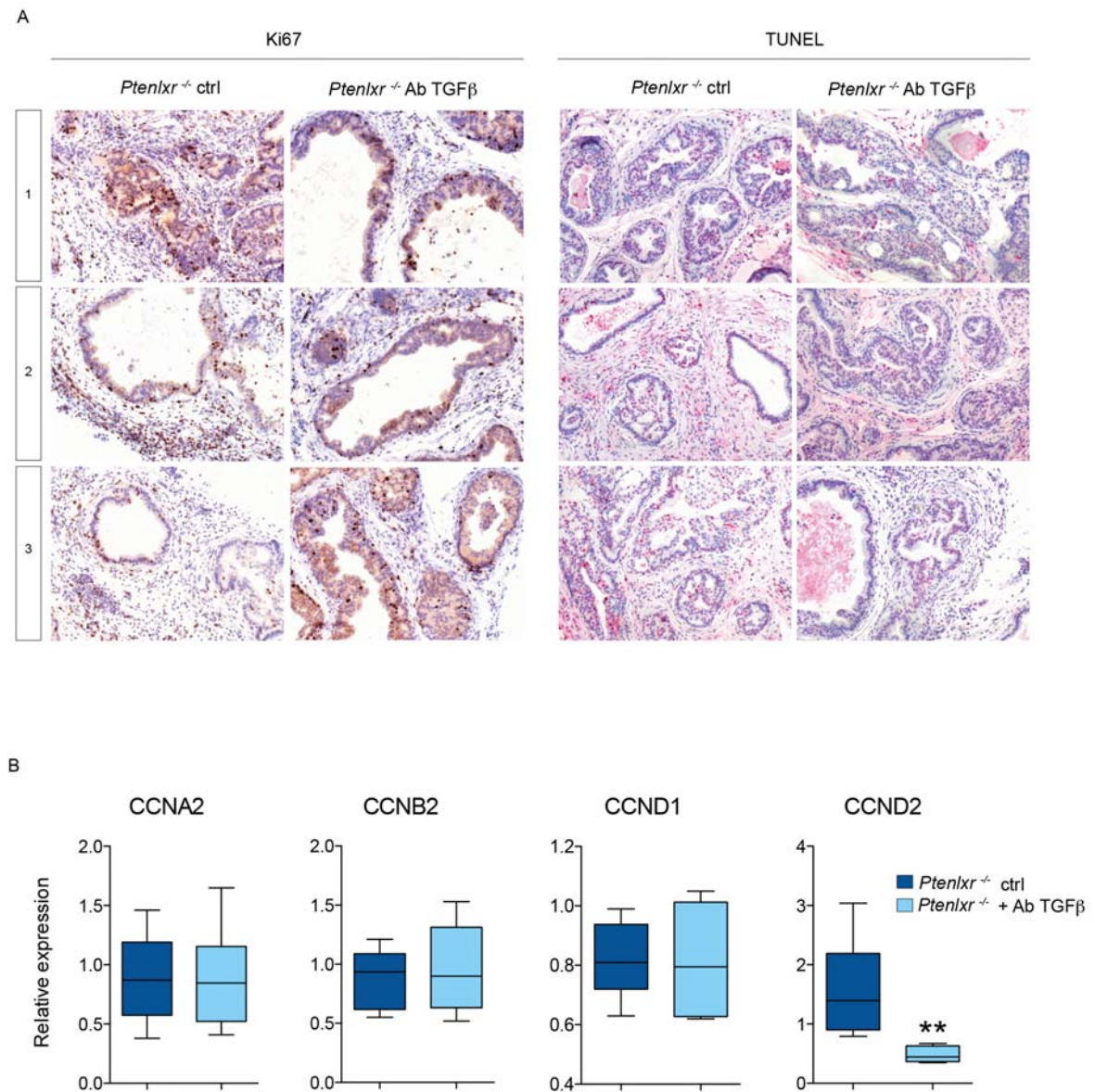


Figure S4. related to Figure 3.

(A) Immunohistochemistry of three representative areas of Ki67 and TUNEL experiments performed on dorsal prostate of 6 months old *Ptenlxr*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody (N=6/6). (B) Relative expression of CCNA2, CCNB2, CCND1 and CCND2 on dorsal prostate of 6 months old *Ptenlxr*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody. All data are represented as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$.

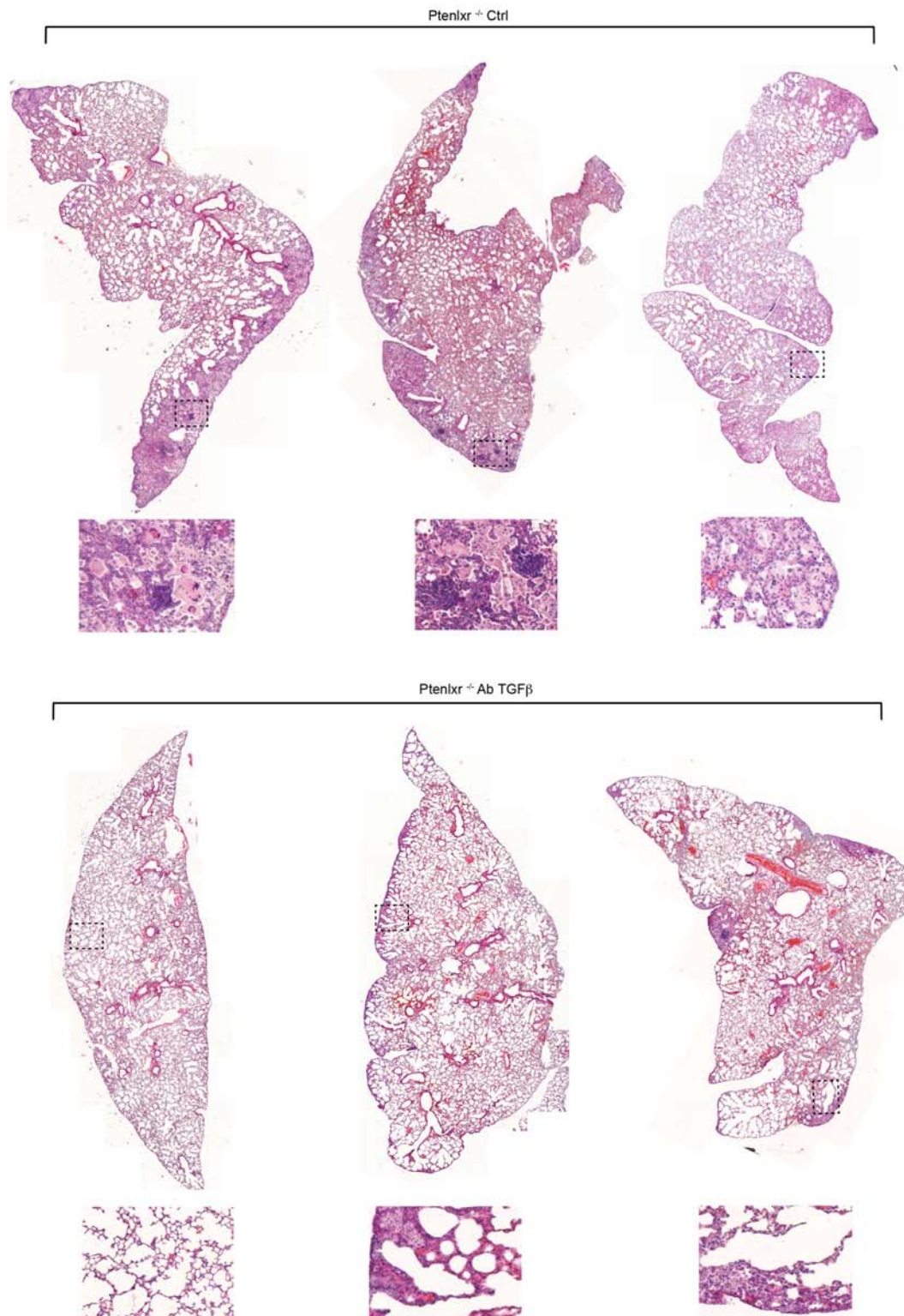


Figure S5. related to Figure 4.

HE analyse of three representative lung reconstitutions on 6 months old *Ptenlxr*^{-/-} mice treated or not with pan-TGF β -neutralizing antibody.

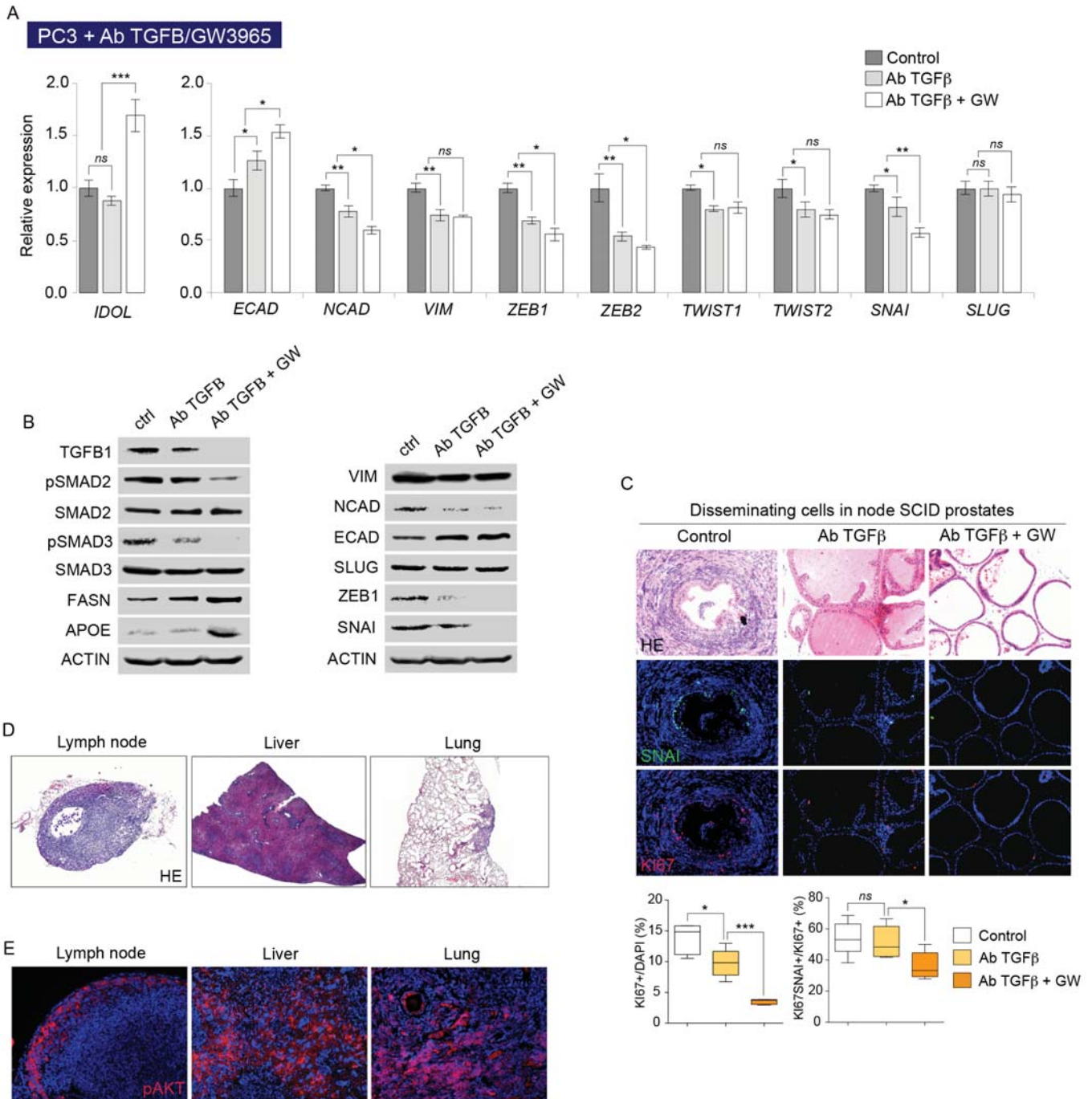


Figure S6. related to Figure 5.

(A-B) Relative expression and protein accumulation of LXR target genes and EMT markers on PC3 cells treated with anti-TGF β alone or with anti-TGF β and GW3965. (C) Immunofluorescence against SNAI and KI67 and quantification on PC3 grafts treated with anti-TGF β alone or with anti-TGF β and GW3965 (N=6/6/6). (D) Wide HE section performed on lymph nodes, liver and lung exhibiting metastatic foci. (E) Immunofluorescence against pAKT realized in metastatic sites. All data are represented as mean $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01; *** p <0.001.

Conclusion Article 2

Mon travail de thèse montre que les LXR_s permettent de ralentir la dissémination métastatique du cancer de la prostate *via* un nouveau mécanisme moléculaire. En effet, ces analyses mettent en évidence un axe LXR_s-TGFβ-EMT. L'activation des récepteurs durant la carcinogenèse prostatique interfère avec la voie du TGFβ, entraînant une diminution des processus d'EMT. Ce mécanisme semble majeur dans le devenir de l'échappement tumoral, puisqu'une neutralisation du TGFβ au sein des souris *Pten^{lox}^{-/-}* diminue la fréquence des métastases ainsi que leur degré de colonisation des organes cibles. De plus, nos travaux montrent un synergisme entre un anticorps anti-TGFβ (MAB1835, RnD Systems) et l'utilisation d'agonistes des LXR_s vis-à-vis de l'inhibition de la dissémination métastatique.

La suite de l'étude nécessite de comprendre comment les LXR_s sont capables de diminuer l'activité de la voie du TGFβ. Cette notion de synergisme entre l'anticorps neutralisant et les agonistes des LXR_s suggère que le mécanisme peut être additionnel et/ou indépendant de la régulation de la production des ligands de la voie du TGFβ. Cet aspect sera développé plus précisément dans la discussion.

Comme énoncé en introduction, la voie du TGFβ joue un rôle fondamental dans la progression de la carcinogenèse prostatique. Outre la capacité à activer les processus d'EMT, la signalisation entraîne également une augmentation du phénomène d'immunosuppression, de dégradation de la matrice extracellulaire et de l'angiogenèse. La compréhension des possibilités thérapeutiques reposant sur le ciblage de la voie du TGFβ en cancérologie est ainsi en développement depuis quelques années (Neuzillet et al., 2015). Le lien établi entre les LXR_s et la signalisation du TGFβ apporte une information supplémentaire quant à la modulation de cette dernière lors de la progression du cancer de la prostate.

Globalement, ces nouveaux résultats de thèse confirment le potentiel anti-métastatique des LXR_s au sein des tumeurs prostatiques et mettent en évidence un nouveau mécanisme moléculaire d'action.

PROJET COMPLÉMENTAIRE : LXR_s ET HOMEOSTASIE OSSEUSE

Présentation du contexte scientifique

L'ensemble de mes travaux de thèse montre que **les LXR_s constituent un frein au processus de dissémination métastatique du cancer de la prostate**. La caractérisation des événements métastatiques dans le modèle *Pten^{loxP}* a pour l'heure été réalisée dans les ganglions et les poumons. Cependant chez l'homme, le cancer de la prostate métastase le plus fréquemment dans l'os. Ceci indique que la cellule tumorale présente des caractéristiques moléculaires facilitant l'envahissement de ce tissu. Différents travaux décrivent en effet des mécanismes mis en jeu par la cellule pour modifier l'homéostasie du tissu osseux et y faciliter son intégration. Ces études sont détaillées dans l'introduction en partie II)-3), et illustrent l'implication des **axes CXCR4-SDF-1, OPG-RANKL-RANK ou de molécules telles que la PTHrP, l'Ostéopontine ou le TGF β** .

La compréhension des voies moléculaires régissant la dissémination osseuse constitue donc une étape clé dans l'élaboration de protocoles thérapeutiques efficaces. Ceci nécessite l'utilisation de modèles murins appropriés. Outre les protocoles de greffes intra-tibiales de cellules tumorales, **il n'existe malheureusement pas de modèle endogène développant une atteinte osseuse**.

Grâce à des études récentes, **les LXR_s ont pu être associés de diverses manières à la régulation de l'homéostasie osseuse**. Ainsi, ces récepteurs peuvent-ils être considérés comme des inhibiteurs potentiels de la différenciation ostéoclastique. Remen *et al.* ont montré que l'activation des LXR_s par du GW3965 diminue l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse induite en temps normal par l'action des ligands RANK (Remen et al., 2011). En effet, l'utilisation de GW3965 au sein de précurseurs ostéoclastiques murins et humains inhibe leur maturation. Ces effets sont perdus dans des précurseurs ostéoclastiques dérivés des souris invalidées pour *Lxr β* , suggérant que le mécanisme est dépendant de cette isoforme. Kleyer *et al.* ont démontré que les LXR_s protègent les souris femelles d'une perte osseuse induite par ovariectomie. En lien, dans des expériences *in vitro* de co-cultures ostéoblastes/ostéoclastes, l'activation des LXR_s entraîne une diminution de l'expression de RANKL par les ostéoblastes, interférant ainsi avec la différenciation ostéoclastique (Kleyer et al., 2012). Deux autres études indiquent que l'utilisation d'agonistes des LXR_s diminue la différenciation ostéoclastique induite par le LPS (*Lipopolysaccharide*) (Kim et al., 2013;

Remen et al., 2013). Les auteurs montrent aussi que les LXRs sont capables d'accélérer les événements apoptotiques au sein de la population ostéoclastique. Cet effet est notamment expliqué par l'induction des caspases -3, -9 et de BCL2L11 (*Bcl-2-like protein 11*). Ces différents travaux indiquent que les LXRs représentent des modulateurs importants de l'homéostasie osseuse.

La pénétrance métastatique au sein des souris *Ptenlxr*^{-/-} est très marquée. Du fait de la dérégulation de la voie du TGFβ, également impliquée dans l'homéostasie osseuse (Yasui et al., 2011), il nous a paru important d'évaluer :

- **La signature moléculaire de la tumeur primaire vis-à-vis des marqueurs de l'homéostasie osseuse dans la prostate des souris *Ptenlxr*^{-/-} vs *Pten*^{-/-}.**
- **La présence de métastases osseuses chez les souris *Ptenlxr*^{-/-} via différentes approches expérimentales.**

Résultats

Notre investigation met en évidence une dérégulation de différents marqueurs clés de l'homéostasie osseuse, plus particulièrement ceux impliqués dans la différenciation ostéoblastique et dans les processus de minéralisation (**Figure 48**). Ainsi, des facteurs de transcription clés dans l'élaboration du programme de l'ostéoblastogenèse tels que *Runx3* ou *Osterix* sont augmentés lors de l'inactivation des *Lxrs* en contexte tumoral. En lien, une surexpression de témoins majeurs du remodelage osseux (*Cadherine 11*, *Ostéopontine*, *Alkaline phosphatase*) est observée (**Figure 49A**). Ce constat est particulièrement marqué concernant SPP1, une phosphoprotéine sécrétée qui contrôle la formation osseuse par l'intermédiaire de la différenciation ostéoblastique ou de l'adhésion des ostéoclastes à l'os. L'expression de cette dernière est fortement corrélée à la dissémination métastatique du cancer de la prostate (**Figure 49B**). Phénotypiquement, ces variations se traduisent par l'apparition de nodules calcifiés au coeur des prostatites tumorales des souris *Ptenlxr^{-/-}*, mis en évidence par une analyse de micro-tomographie (**Figure 49C**).

L'analyse des métastases au sein des poumons est caractérisée par un marquage immunohistochimique dirigé contre SPP1 important (**Figure 50A**). Cela suggère que la cellule tumorale en échappement conserve le profil moléculaire mis en évidence dans la tumeur primaire. La présence de protubérances associées à la colonne vertébrale dans la région thoracique a été observée (**Figure 50B**). Une expérience d'immunofluorescence dirigée contre le PSCA a permis d'illustrer la présence de cellules prostatiques disséminant dans ces régions, et plus particulièrement au niveau de la moelle osseuse (**Figure 50C**).

Dans l'optique d'associer ces lésions à un échappement plus généralisé au sein du tissu osseux, nous avons réalisé des expériences à l'aide de glucose marqué (2DG-750 et 18-FDG) et de technetium radiomarqué Tc^{99m}. Dans de rares cas, des foyers anormaux ont été observés (**Figure 51 A-B**).

Marqueur moléculaire osseux	Fonction
Cadherin 11 (Cdh11)	Cadhérine exprimée abondamment dans les ostéoblastes et nécessaire à leur différenciation.
Osteopontin (Spp1)	Protéine d'adhérence du tissu osseux faisant partie de la fraction non collagénique de la matrice osseuse.
Runt-related transcription factor 2/3 (Runx2/3)	Facteur de transcription essentiel dans la différenciation ostéoblastique et la morphogenèse du squelette.
Osterix (Osx)	Facteur de transcription essentiel pour la différenciation ostéoblastique.
Osteoprotegerin (Opg)	Récepteur soluble produit par les ostéoblastes et se liant à RANKL afin d'inhiber la différenciation ostéoclastique.
Osteocalcin (Ocn)	Hormone protéique spécifique des tissus osseux, codée par le gène <i>Bglap</i> , et sécrétée par les ostéoblastes afin de favoriser la fixation du calcium à la substance fondamentale.
Alkaline phosphatase (Alp)	Métalloglycoprotéine clivant les fonctions phosphoester pour libérer un phosphate et un groupement hydroxyle. Son expression est particulièrement concentrée dans le foie, la bile, le placenta et l'os.
Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (Dmp1)	Protéine critique pour la minéralisation osseuse, régulant un panel important de gènes pro-ostéoblastiques.
Msh homeobox 2 (Msx2)	Agit en tant régulateur transcriptionnel lors du développement osseux. Réprime notamment l'action de l'Ostéocalcine et de l'ALP durant la différenciation ostéoblastique.
Receptor activator of NFkB ligand (Rankl)	Protéine favorisant la différenciation des ostéoclastes par l'intermédiaire d'une liaison avec son récepteur RANK au niveau de la membrane des progéniteurs ostéocalciques.

Figure 48 : Descriptif fonctionnel des marqueurs osseux analysés dans les prostates des souris

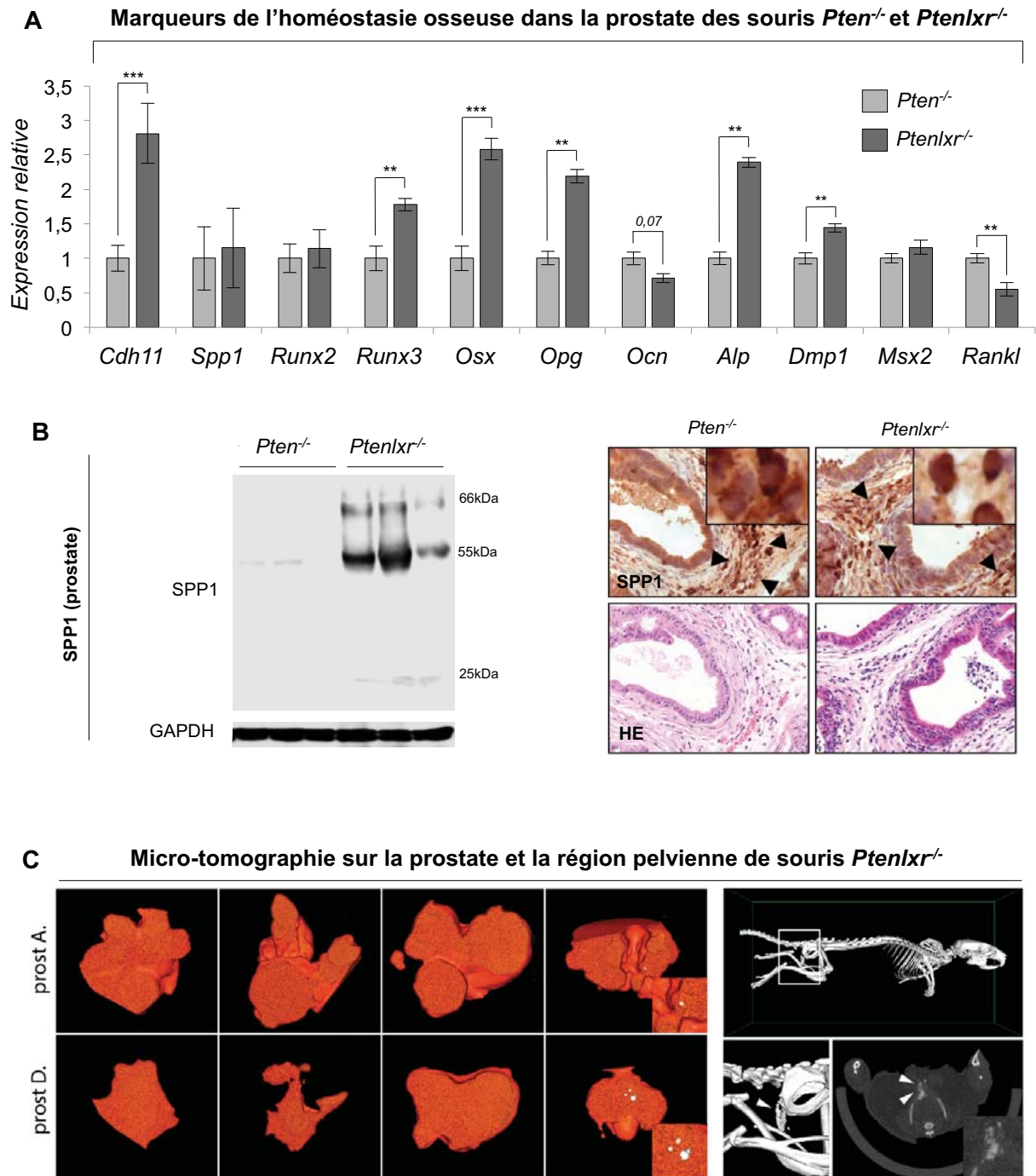


Figure 49 : Les prostates des souris *Ptenlxr*^{-/-} présentent des calcifications associées à une dérégulation des marqueurs de l'homéostasie osseuse

(A) Expression relative de marqueurs impliqués dans l'homéostasie et la minéralisation osseuse au sein des prostates des animaux *Pten*^{-/-} et *Ptenlxr*^{-/-} âgés de 6 mois (N=8/11) ; fonctions des gènes détaillées en **Figure 48**. (B) Accumulation protéique de SPP1 déterminée par western blot et immunohistochimie au sein des prostates des souris *Pten*^{-/-} et *Ptenlxr*^{-/-} âgées de 6 mois. (C) Micro-tomographie réalisée sur la prostate dorsale, la prostate antérieure, et au niveau de la région pelvienne de souris *Ptenlxr*^{-/-} âgées de 12 mois. Prost A : Prostate Antérieure ; Prost D : Prostate Dorsale. La normalisation est réalisée par le gène *36b4*. Test t de Student, **p<0,01 et ***p<0,001.

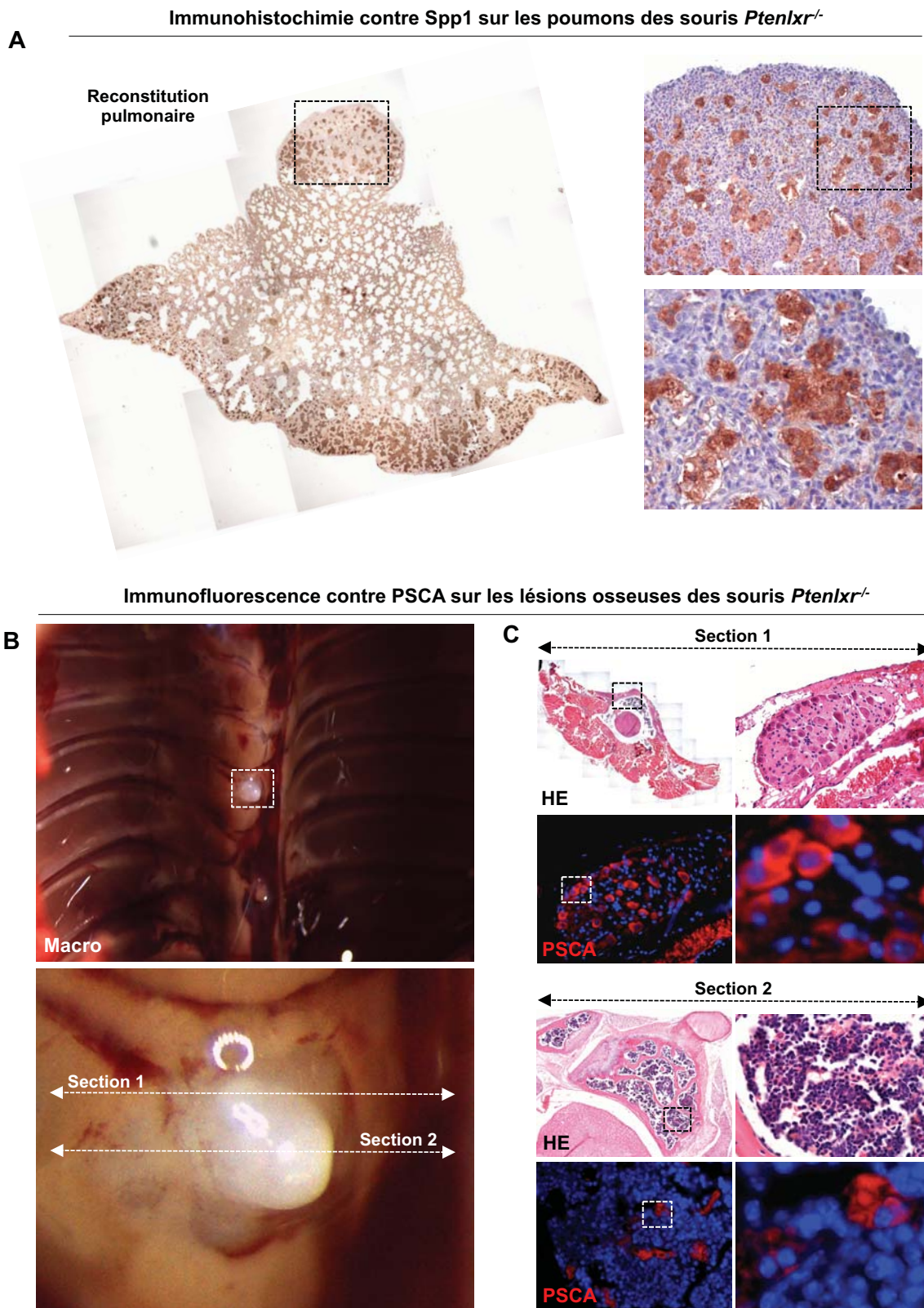


Figure 50 : Les souris *Ptenlxr^{-/-}* développent des lésions osseuses macroscopiques positives pour le PSCA

(A) Immunohistochimie dirigée contre SPP1 sur les poumons des souris *Ptenlxr^{-/-}* âgées de 6 mois. (B) Lésion macroscopique observée au niveau thoracique au sein de souris *Ptenlxr^{-/-}* âgées de 12 mois, et (C) Immunofluorescence contre le marqueur prostatique PSCA au niveau de la zone précédemment isolée.

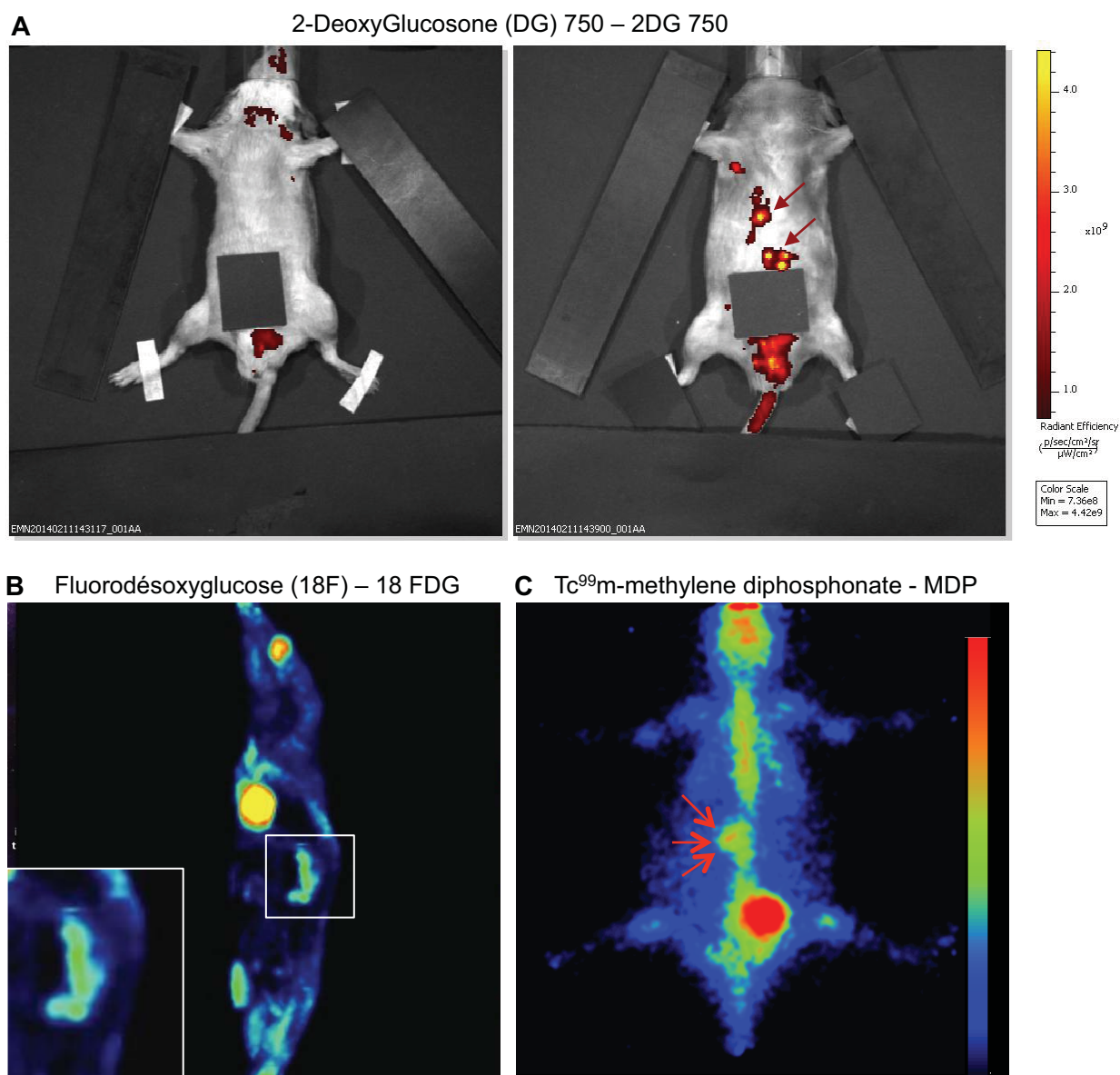


Figure 51 : Identification de lésions osseuses potentielles par techniques d'imagerie

Les souris *Pten^{lox/-}* âgées de 12 mois ont été respectivement injectées avec, (A-B) du glucose fluorescent 2DG-750 et du glucose radiomarqué 18-FDG, et (C) du technetium radiomarqué Tc^{99m}.

Conclusion

Ces travaux préliminaires ont permis d'associer l'invalidation des *Lxrs* en contexte tumoral *Pten*^{-/-} avec l'expression précoce et anormale de marqueurs ostéoblastiques et minéralisants par la cellule tumorale au sein de son site primaire. Ce profil moléculaire est corrélé à l'apparition de nodules calcifiés dans les prostates des souris *Ptenlxr*^{-/-} uniquement. Ces propriétés semblent conservées dans les métastases établies, telles que les lésions pulmonaires. Finalement, ces observations sont mises en parallèle avec le développement rare de calcifications macroscopiques accolées à la colonne vertébrale des souris, et associées à la présence de cellules tumorales prostatiques dans la moelle osseuse. La recherche de métastases à plus grande échelle grâce à diverses techniques d'imagerie médicale révèle également certains foyers anormaux.

Malgré la difficulté à mettre en évidence des métastases osseuses dans les souris *Ptenlxr*^{-/-}, ces résultats sont intéressants puisqu'ils montrent clairement que la modulation des LXRs au niveau du site tumoral primaire est capable de modifier l'expression de marqueurs moléculaires déterminants dans le contrôle du remodelage osseux. Cette observation pourrait être corrélée à l'apparition d'événements disséminatoires.

DISCUSSION ET
PERSPECTIVES

Les LXR_s inhibent la dissémination métastatique du cancer de la prostate

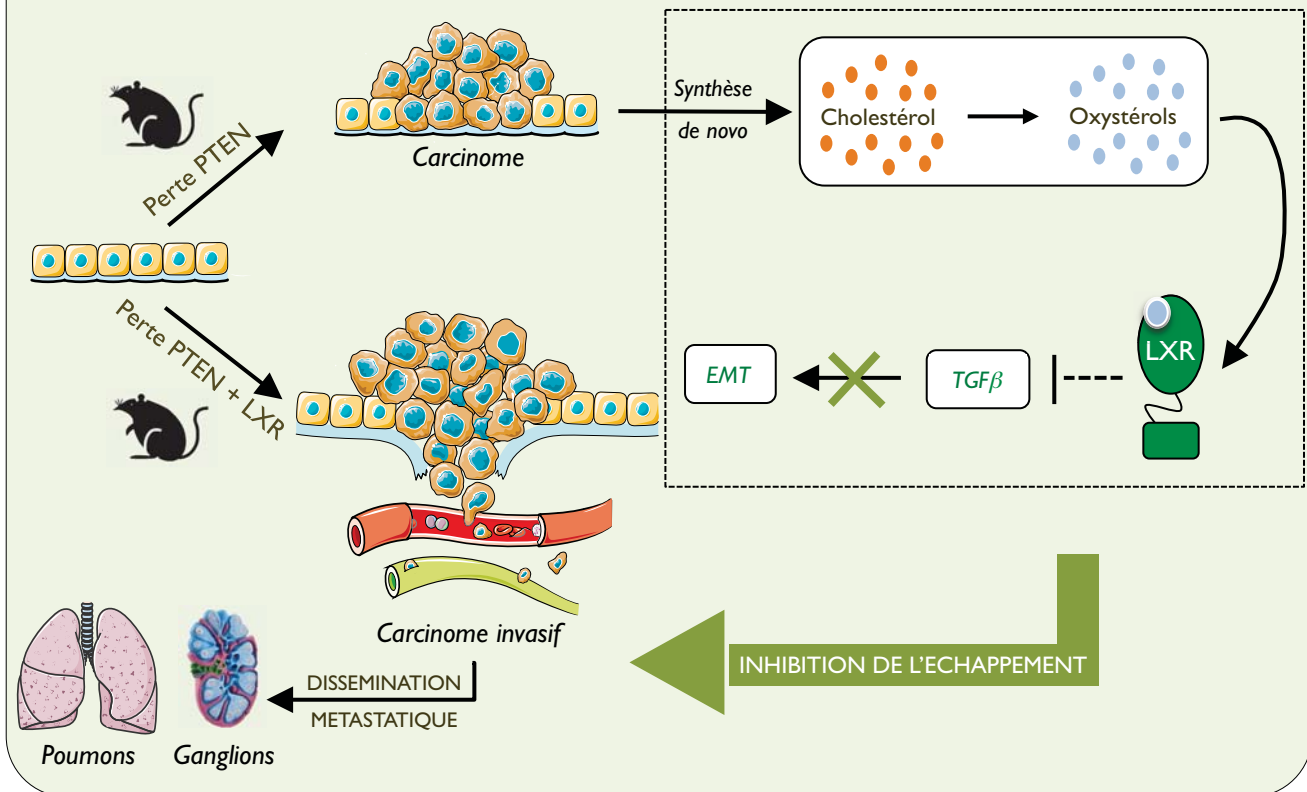


Figure 52 : Schéma représentatif de la fonction des LXR_s lors de la carcinogenèse prostatique dépendante de la perte du suppresseur de tumeur *Pten*

Les différents travaux conduits par l'équipe ont illustré le rôle des LXR_s dans le contrôle du cycle cellulaire de lignées tumorales prostatiques, ainsi que *in vivo* dans les phases initiatrices de la pathologie cancéreuse. L'objectif de mon travail de recherche doctorale était d'évaluer la fonction des LXR_s dans le processus de dissémination métastatique du cancer de la prostate (Figure 52). Cette étude a été réalisée en utilisant un modèle murin de carcinogenèse prostatique invalidé pour le suppresseur de tumeur *Pten*. Nous avons également pu caractériser le profil métabolique du cholestérol lors de la pathologie tumorale. Ainsi, nous montrons que :

i) La mutation de *Pten* entraîne une accumulation anormale de cholestérol intraprostatique *via* une augmentation du processus de synthèse *de novo*. Cette observation a été reliée à la suractivation de la voie PI3K/AKT et à l'expression importante d'acteurs limitants de la voie du mévalonate.

ii) Les LXR_s sont activés suite à la mutation de *Pten*. Une augmentation de l'accumulation des oxystérols ligands des LXR_s a permis d'expliquer cette observation et a été mise en lien direct avec les altérations métaboliques précédemment caractérisées.

iii) Les LXR_s permettent ainsi de freiner le processus de dissémination métastatique, notamment en inhibant l'axe TGFβ-EMT qui est largement impliqué dans l'échappement tumoral du cancer de la prostate. Ainsi, l'invalidation des récepteurs en contexte tumoral favorise-t-il l'émergence de lésions agressives dans la prostate ; ces lésions sont associées à une augmentation des processus d'EMT. Ceci conduit *in fine* à une large augmentation des événements métastatiques et à une diminution de la survie des animaux.

iv) La signature moléculaire des prostates des souris *Pten^{-/-}Lxr^{-/-}* est caractérisée par une augmentation des marqueurs ostéoblastiques et pro-minéralisants. Ceci est corrélé à l'apparition de foyers de calcification dans la prostate.

Ces travaux montrent donc que les LXR_s agissent en tant que barrière face à la dissémination métastatique du cancer de la prostate. Plusieurs questions peuvent être abordées dans cette discussion :

1 - L'augmentation de la synthèse *de novo* suffit-elle à expliquer l'accumulation du cholestérol intra-prostatique chez les souris *Pten^{-/-}* ?

2 - Quelle est la contribution du cholestérol dans l'émergence du phénotype tumoral des souris *Pten^{-/-}* ?

3 - L'activation des LXR_s lors de la carcinogenèse prostatique n'est-elle inductible que suite à la perte de *Pten* et à une modification du métabolisme du cholestérol ?

4 - Quelle est l'origine de la régulation de l'axe TGF β -EMT par les LXRs ? Est-elle la seule composante conduisant au phénotype métastatique des souris *Ptenlxr*^{-/-} ?

5 - Quel est le rôle des LXRs dans le contrôle de l'expression de marqueurs moléculaires osseux au sein de la cellule tumorale ?

6 - Quelle est l'implication des LXRs dans le microenvironnement tumoral prostatique ?

7 - Les résultats sont-ils applicables à l'homme ?

1 - L'augmentation de la synthèse *de novo* suffit-elle à expliquer l'accumulation du cholestérol intra-prostatique chez les souris *Pten*^{-/-} ?

L'homéostasie du cholestérol dans la cellule est la résultante de deux composantes majoritaires : la synthèse *de novo* et le captage. Notre travail a pu évaluer un lien clair entre l'activité de la voie du mévalonate et la perte du suppresseur de tumeur *Pten* lors de la tumorigenèse, de manière dépendante de la voie PI3K/AKT et de la maturation protéique de SREBP2. Le recrutement de cette voie métabolique *in vitro* au sein de différentes lignées tumorales a déjà été relié à une modification de l'activité de SREBP2 (Chen and Hughes-Fulford, 2001). Notre travail vient donc compléter ces résultats *in vivo* dans le cadre de la tumorigenèse prostatique.

La contribution du processus de captage dans l'homéostasie du cholestérol de la cellule tumorale a été également décrite. Deux acteurs principaux ont été caractérisés : i) LDLR (*LDL receptor*) et ii) SRB1 (*Scavenger Receptor B1*), un récepteur aux HDL.

i) L'importance des LDLs dans la cellule tumorale prostatique est suggérée par différentes études épidémiologiques, mais les mécanismes sous-jacents sont peu décrits. Il est cependant connu que le LDLR représente une cible directe de SREBP2. Ainsi, Chen *et al.* ont démontré que la perte de la régulation de SREBP2 était associée à une augmentation de l'expression du récepteur aux LDLs (Chen and Hughes-Fulford, 2001). La cellule tumorale pourrait donc contenir ses différents besoins énergétiques en associant la production intracellulaire de cholestérol et l'internalisation des LDLs circulants *via* SREBP2. Nos résultats préliminaires obtenus *in vivo* au sein des souris *Pten*^{-/-} montrent une augmentation de l'expression du LDLR en parallèle de SREBP2. Une proximité entre ces deux acteurs étant connue, il serait intéressant d'évaluer la contribution de LDLR dans l'augmentation des taux intra-prostatiques de cholestérol chez les souris *Pten*^{-/-}. Cette proximité soulève une seconde

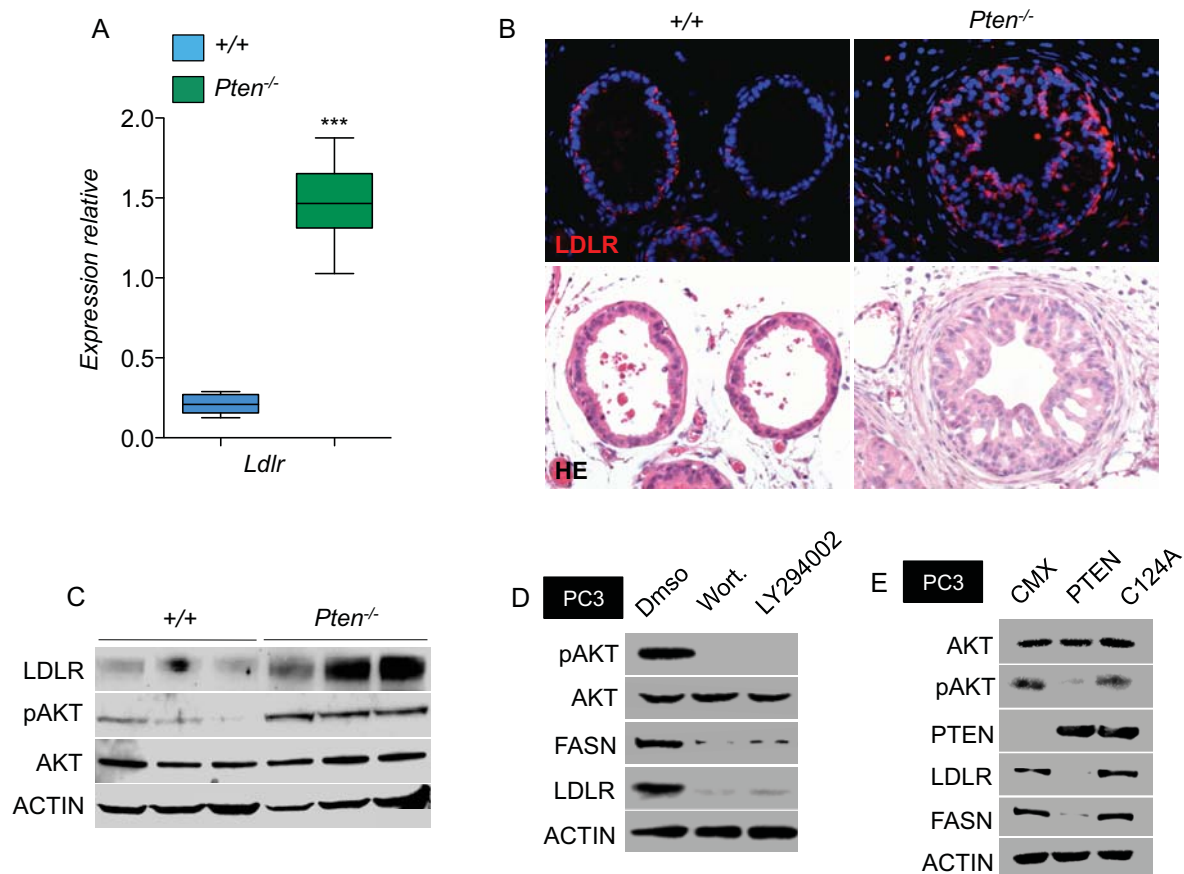


Figure 53 : Surexpression du LDLR lors de la perte de PTEN

(A) PCR en temps réel, (B) Immunohistochimie, et (C) Western blot dirigés contre le récepteur aux LDLs (LDLR) au sein des prostates d'animaux sauvages (+/+) ou invalidés pour *Pten* (*Pten*^{-/-}), âgés de 6 mois (N=8/8). (D) Western blot réalisé sur des PC3 traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques de la voie PI3K/AKT (Wort. et LY294002). (E) Western blot réalisé sur des PC3 transfectées avec un vecteur vide (CMX), la forme sauvage de PTEN (PTEN), et une forme mutante de l'activité phosphatase de PTEN (C124A). La normalisation est réalisée par le gène *36b4*. Test t de Student, ***p<0,001.

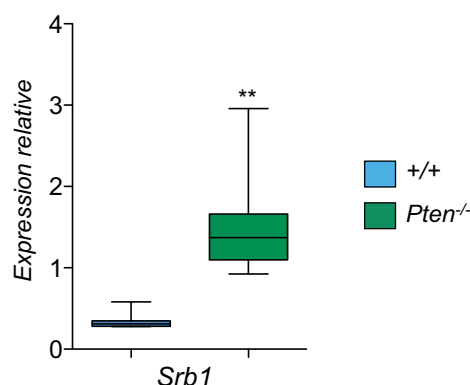


Figure 54 : Une accumulation des transcrits de SRB1 est observée dans les souris *Pten*^{-/-}

Expression relative de SRB1 déterminée par PCR en temps réel au sein des prostates d'animaux sauvages (+/+) ou invalidés pour *Pten* (*Pten*^{-/-}), âgés de 6 mois (N=8/8). La normalisation est réalisée par le gène *36b4*. Test t de Student, **p<0,01.

question : les traitements hypocholestérolémiants basés sur l'utilisation de statines ciblent la synthèse *de novo* du cholestérol (inhibition de la HMG-CoA réductase) mais ne préviennent pas l'activation de SREBP2 (Xiao and Song, 2013). En réponse à des taux décroissants de cholestérol et malgré le blocage de la voie du mévalonate, l'activation du facteur de transcription SREBP2 pourrait hypothétiquement promouvoir l'internalisation des LDLs *via* le LDLR. De plus, l'utilisation de statines entraîne *de facto* une diminution de l'activation des LXRs. Par l'intermédiaire du gène *Idol*, les récepteurs LXRs constituent pourtant un des mécanismes principaux de la régulation du LDLR en favorisant sa dégradation par le protéasome (Zelcer et al., 2009). Le ciblage de SREBP2 dans la cellule tumorale prostatique représenterait alors une perspective intéressante, permettant le blocage à la fois de la synthèse *de novo* mais également du captage du cholestérol.

ii) Différentes études illustrent le rôle du récepteur aux HDLs SRB1 dans la carcinogenèse prostatique. Ainsi, Twiddy *et al.* montrent que la perte de la protéine dans des LNCaP et des cellules C4-2 est associée à une diminution de la sécrétion du PSA et de la viabilité cellulaire malgré la présence de HDLs (Twiddy et al., 2012). Cette analyse montre donc toute l'importance de SRB1 dans l'assimilation des HDLs par la cellule tumorale prostatique. Ces résultats ont été confortés très récemment puisqu'une augmentation de l'expression de SRB1 est corrélée à la progression de la carcinogenèse prostatique chez l'homme, notamment vers des stades androgéno-indépendants (Schörghofer et al., 2015; Celhay et al., en préparation). Ainsi, SRB1 est-il surexprimé dans les stades métastatiques de la maladie, en association avec un mauvais pronostic de survie. De plus, une expérience de xénogreffe montre une accumulation de SRB1 lors du développement de formes résistantes à la castration. L'association de cet acteur avec le développement tumoral est également rapportée dans le cadre des cancers nasopharyngés, colorectaux, ovariens et mammaires (Zheng et al., 2013). Dans le cas du cancer nasopharyngé (NPC), les auteurs caractérisent la surexpression de SRB1 dans toutes les lignées cellulaires testées et dans 75% des biopsies issues des patients, démontrant la pertinence de ce marqueur.

Nous proposons donc d'étudier *in vivo* l'importance du LDLR et de SRB1 vis à vis de l'accumulation intra-prostatique de cholestérol et de la progression tumorale au sein des souris *Pten*^{-/-}. Les résultats préliminaires indiquent d'ores et déjà une expression importante des deux acteurs dans ce modèle (**Figure 53** et **Figure 54**).

2 - Quelle est la contribution du cholestérol dans l'émergence du phénotype tumoral des souris *Pten*^{-/-} ?

Comme décrit à travers ce manuscrit, le cholestérol peut exercer des effets pro-carcinogènes de différentes manières. En nous focalisant sur le cancer de la prostate, plusieurs mécanismes peuvent être privilégiés. La régulation de la signalisation androgénique et l'émergence de l'hormono-indépendance représentent des pistes d'études concrètes. Certains travaux démontrent tout d'abord une augmentation de l'expression de gènes codant des enzymes de synthèse du cholestérol et de conversion des androgènes lors du CRPC par rapport aux tumeurs primaires (Dillard et al., 2008). Cette observation suggère que le statut du cholestérol peut conditionner la capacité de la cellule tumorale à survivre malgré une privation androgénique clinique. En effet, AR est exprimé dans les tumeurs issues de CRPC à des niveaux équivalents à ceux retrouvés dans les tumeurs primaires, et différentes analyses indiquent que malgré un faible taux d'androgènes dans le sérum après la castration, le niveau intra-tumoral reste suffisant pour activer le récepteur (Mizokami et al., 2004; Nishiyama et al., 2004). Cette observation est notamment associée à un mécanisme de synthèse intra-tumorale d'androgènes grâce à l'augmentation de l'expression de différentes enzymes de la voie des stéroïdes (Montgomery et al., 2008b). Les cellules nécessitent cependant la présence d'une quantité de cholestérol importante *in situ*. Ceci suggère que le protocole de privation androgénique pourrait être basé sur de nouvelles thérapies combinant d'une part une castration chimique et/ou physique, et d'autre part l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse intracrine des androgènes, ou encore d'agents diminuant les taux de cholestérol dans la cellule tumorale.

En lien avec les observations cliniques montrant l'enrichissement du cholestérol intra-prostatique lors de la tumorigenèse, des travaux ont permis de caractériser la dérégulation de différents facteurs clés de l'homéostasie du cholestérol lors du développement du CRPC. Ainsi lors de xénogreffes de cellules LNCaP hormono-sensibles chez la souris, l'augmentation de SREBP2 et de ses différents gènes cibles (*HMGCR*, *SQS*, *LDLR*) est observée après un protocole de castration et coïncide avec l'émergence de la résistance à la thérapie (Ettinger et al., 2004). De plus, SREBP2 est connu pour être un gène cible de AR (Heemers et al., 2001). SRB1, quant à lui, est notamment impliqué dans l'apport de cholestérol aux cellules stéroïdogènes (Connelly, 2009). La cellule tumorale prostatique présente une signature moléculaire stéroïdienne. L'augmentation de l'expression de SRB1 est ainsi fortement associée à la progression de la carcinogenèse prostatique (Dillard et al., 2008; Montgomery et al., 2008a). L'accumulation de ce dernier dans la cellule tumorale

représenterait alors un mécanisme d'import des précurseurs métaboliques nécessaires à la synthèse des androgènes. SRB1 représente donc une cible clinique prometteuse dans la lutte contre l'émergence du CRPC. De plus, ces informations illustrent l'importance du contrôle de l'homéostasie du cholestérol, et notamment de son import, lors de la tumorigenèse prostatique. Finalement, les enzymes impliquées dans l'estérification du cholestérol sont également régulées par les androgènes au sein du cancer de la prostate (Locke et al., 2008). En effet, les auteurs montrent que le traitement de cellules LNCaP avec un agoniste de AR, le R1881, est associé à une augmentation de l'activité d'estérification du cholestérol, principalement reliée à l'expression de ACAT2 (*Acetyl-CoA acetyltransferase 2*). Ce résultat est corrélé à l'expression du facteur de transcription STAT1 α (*Signal transducer and activator of transcription 1 alpha*), un activateur de l'expression des ACATs.

Dans les souris *Pten*^{-/-}, nos travaux mettent en évidence une accumulation du cholestérol intra-prostatique suite à une augmentation de la synthèse *de novo*. De plus, les travaux de Mulholland *et al.* montrent que la progression du cancer vers un stade de CRPC peut être moléculairement reliée à la perte de *Pten* dans ce même modèle. Les auteurs indiquent que la perte de PTEN au sein de la cellule tumorale conduit à une activation importante de la voie PI3K/AKT (Mulholland et al., 2011). La dérégulation de cette voie est largement associée au développement du CRPC même si les mécanismes impliqués ne sont pas connus (Ham et al., 2009). Ainsi dans l'étude, la perte de PTEN entraîne l'activation de la voie PI3K/AKT, qui à son tour inhibe l'axe androgéno-régulé FKBP5-PHLPP en diminuant l'activité de AR. L'axe FKBP5-PHLPP permet notamment d'inhiber l'activité de AKT. La perte de cette boucle de régulation négative favorise l'activité de la voie PI3K/AKT, aboutissant à l'émergence de clones cellulaires présentant une résistance à la thérapie anti-hormonale. Les souris *Pten*^{-/-} semblent donc prédisposées à développer un CRPC (Mulholland et al., 2011). Compte tenu de la proximité entre les stérols, les androgènes et la voie PI3K/AKT, l'impact de l'enrichissement du cholestérol dans l'agressivité des tumeurs prostatiques *Pten*^{-/-} pourrait représenter une perspective d'étude, surtout vis-à-vis de l'émergence du CRPC. Pour vérifier cela, il serait par exemple intéressant de réaliser des traitements à l'aide de statines (inhibiteurs de la HMG-CoA réductase) sur des souris *Pten*^{-/-} castrées et d'analyser les effets sur l'émergence du CRPC.

3 - L'activation des LXR_s lors de la carcinogénèse prostatique n'est-elle inducible que suite à la perte de *Pten* et à une modification du métabolisme du cholestérol ?

Comme nous l'avons démontré, la perte de *Pten* entraîne une accumulation de cholestérol et d'oxystérols ligands des LXR_s. Il semble rationnel de penser que d'autres altérations en lien avec une modification du métabolisme du cholestérol puissent être associées à une activation des récepteurs. Il sera donc nécessaire d'étudier leur activité dans d'autres modèles murins de carcinogénèse prostatique. Nous pourrions par exemple utiliser des souris TRAMP, caractérisées par l'expression de l'antigène T du virus SV40 et dont la progression tumorale aboutit à l'émergence de carcinomes et de métastases (Hurwitz et al., 2001). Dans ce modèle, PTEN n'est pas muté et l'enrichissement du cholestérol intraprostatique n'est pas décrit. Il serait alors nécessaire d'évaluer l'activité des LXR_s dans la tumeur en réponse à un régime riche en cholestérol. Dans la perspective où les résultats ne seraient pas similaires à ceux obtenus au sein des souris *Pten*^{-/-}, cela suggérerait la contribution de mécanismes alternatifs dépendant de la perte de *Pten*, mais étrangers à un apport de cholestérol intracellulaire et de ligands agonistes des LXR_s.

Deux de ces mécanismes sont à privilégier : i) la modification post-traductionnelle des LXR_s et/ou de ses co-facteurs ; ii) le métabolisme des rétinoïdes, susceptible de modifier l'activité du partenaire hétérodimérique des LXR_s, RXR.

i) L'hétérodimère LXR/RXR est fixé constitutivement sur les promoteurs de ses gènes cibles. Son activité transcriptionnelle peut être inhibée par des répresseurs tels que N-CoR et SMRT par le biais d'histones désacétylases (HDAC) maintenant la chromatine condensée (Hu et al., 2003). Inversement, certains co-facteurs peuvent favoriser la transcription. Ainsi, les facteurs SWI/SNF déstabilisent-ils les interactions entre l'ADN et les histones en hydrolysant l'ATP. De plus, d'autres facteurs à activité histone acétyl-transférase sont capables de modifier les histones, tels SRC-1 (*Nuclear Receptor Coactivator 1*), GRIP-1 (*Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1*), CBP (*c-AMP Response Element Binding Protein*), p300, PGC1 α (*PPAR-Gamma Co-activator 1*), TRRAP (*Transformation/Transcription Domain-Associated Protein*), ainsi qu'un facteur touchant la méthylation des histones, Rap250 (*Nuclear receptor-activating protein*). Une inhibition des répresseurs ou à l'inverse une stimulation des co-facteurs pourrait expliquer l'activation des LXR_s dans les souris *Pten*^{-/-}. Enfin, l'activité des LXR_s peut également être influencée par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, désacétylations et/ou SUMOylations (Chen et al., 2006b; Ghisletti et al., 2007; Li et al., 2007; Delvecchio and Capone, 2008). Par exemple, la SIRT1 est une protéine co-activatrice des LXR_s. Celle-ci induit leur

A

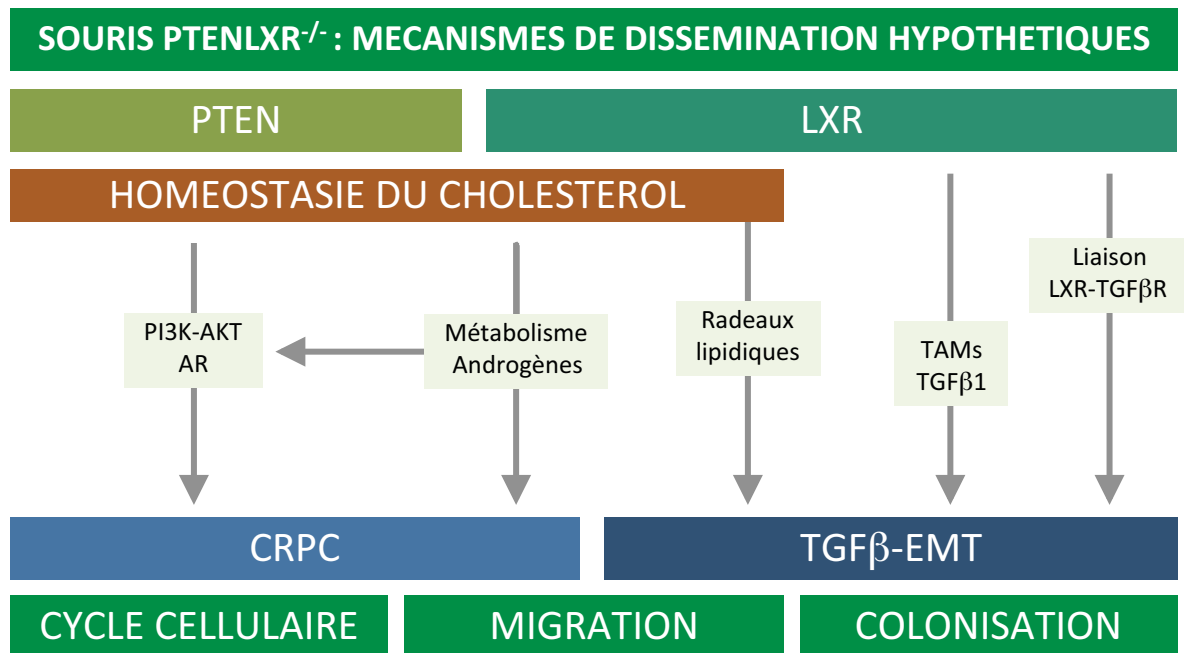


Figure 55 : Schéma des hypothèses moléculaires reliant LXR et dissémination métastatique du cancer de la prostate

désacétylation et leur dégradation protéasomale, favorisant la mise en place d'un nouvel hétérodimère sur les éléments de réponse dans les promoteurs de gènes cibles (Li et al., 2007). Cette étude montre que la perte de SIRT1 entraîne la diminution de l'expression des gènes cibles des LXRs, et suggère d'étudier l'expression et l'accumulation des modifications post-traductionnelles des LXRs dans les souris *Pten*^{-/-}.

ii) L'hétérodimère RXR/LXR est dit permissif : il peut être également activé par la fixation du ligand de RXR, l'acide rétinoïque 9-*cis*, qui est synthétisé dans les tissus suite à l'oxydation du rétinol (vitamine A) en acide rétinoïque. Même si l'existence de l'acide rétinoïque 9-*cis* *in vivo* est controversée (Dawson and Xia, 2012), il est considéré comme le ligand endogène des RXRs. Certains acides gras poly-insaturés tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA) peuvent également activer les RXRs (Dawson and Xia, 2012). De plus, les trois isoformes RXR α , β et γ sont exprimées dans la prostate même si RXR α semble avoir un rôle dominant, puisque seules les souris *Rxra*^{-/-} développent des néoplasies prostatiques identiques à celles des souris *Lxra* β ^{-/-} nourries avec un régime enrichi en cholestérol (Huang et al., 2002a; Pommier et al., 2013). Des travaux menés antérieurement au laboratoire chez les souris *Pten*^{-/-} ont alors montré une augmentation de l'expression de *Rxra* dans la tumeur prostatique (Julie Dufour, *communication personnelle*).

4 – Quelle est l'origine de la régulation de l'axe TGF β -EMT par les LXRs ? Est-elle la seule composante conduisant au phénotype métastatique des souris *PtenLxr*^{-/-} ?**

❖ Dans un premier temps, il sera nécessaire de comprendre de quelle manière les LXRs sont capables de réprimer la voie du TGF β . Différentes hypothèses sont d'ores et déjà proposées (**Figure 55**).

i) Interaction directe entre les LXRs et le TGF β : une interaction entre le TGF β R1 et LXR β a déjà été mise en évidence. En effet, Mo *et al.* montrent que le domaine cytoplasmique du TGF β R1 est capable de se lier à LXR β *in vivo* dans les cellules endothéliales, entraînant dans un premier temps une phosphorylation de LXR β , qui en retour inactive de façon transcription-indépendante l'activité du TGF β R1 (Mo et al., 2002). Le mécanisme moléculaire précis entraînant cette inhibition n'a pas été décrit.

ii) LXRs, radeaux lipidiques et initiation de la voie du TGF β : notre équipe a déjà démontré que les LXRs étaient capables de réguler la coalescence des radeaux lipidiques en déplaçant la cellule en cholestérol (Pommier et al., 2010). Pour rappel, les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol. Ils constituent

notamment une plateforme rigide initiant différentes signalisations cellulaires telles que la voie PI3K/AKT, dont l'activité est dépendante d'un récepteur membranaire. L'activation des LXRs pourrait ainsi inhiber l'association entre les partenaires obligatoires TGFβR1 et TGFβR2 et entraîner une diminution de l'activité de la voie du TGFβ. Inversement, la perte des LXRs dans un contexte tumoral pourrait conduire à une meilleure association entre le dimère R1/R2, augmentant *in fine* les processus d'EMT dépendant de la signalisation du TGFβ et la capacité métastatique de la cellule tumorale.

iii) LXRs, activité macrophagique et production du ligand TGFβ : nos résultats ont permis de caractériser une augmentation importante de l'expression du TGFβ1 dans les prostates des souris *Ptenl^{xr}^{-/-}*. En plus de la tumeur, le micro-environnement peut aussi participer à ce processus. Par exemple, les TAMs (*Tumor associated macrophages*) expriment diverses molécules favorisant l'angiogenèse, la croissance cellulaire, l'immunosuppression ou la migration cellulaire telles que le TGFβ1 (Noy and Pollard, 2014). La littérature montre que la survie et l'activité macrophagique sont fortement liées à la modulation des LXRs (Joseph et al., 2003; Rigamonti et al., 2008). Ainsi, l'invalidation des récepteurs en contexte tumoral pourrait conduire à un dysfonctionnement de la sous-population cellulaire macrophagique et induire une accumulation aberrante de ligand TGFβ1. Ce mécanisme favoriserait alors les processus d'EMT dans la tumeur prostatique, et inciterait de plus à considérer le rôle du micro-environnement dans l'augmentation de la dissémination métastatique observée dans les souris *Ptenl^{xr}^{-/-}*.

Grâce aux résultats précédemment obtenus par l'équipe, il semblerait raisonnable de penser que les LXRs altèrent la signalisation du TGFβ en modifiant la coalescence des radeaux lipidiques. Il paraît donc nécessaire d'étudier la localisation des partenaires TGFβR1 et TGFβR2 dans des cellules tumorales prostatiques traitées avec des agonistes des LXRs. Si l'hypothèse est juste, elle permettrait de fournir le lien moléculaire manquant entre l'activation des LXRs et l'inhibition de la voie du TGFβ.

❖ Le ciblage de l'axe TGFβ-EMT *in vivo* dans les souris *Ptenl^{xr}^{-/-}* à l'aide de l'anticorps neutralisant les ligands TGFβ (MAB1835, RnD Systems) ne présente pas une efficacité totale vis-à-vis de l'inhibition de la dissémination métastatique, malgré une diminution importante de l'activité de la voie. Les expériences devront être répétées en ciblant la tumeur selon une cinétique plus précoce, c'est-à-dire avant l'apparition des métastases chez les animaux. En effet, le traitement est réalisé de l'âge de 5 à 6 mois. Lors de cette fenêtre de

traitement, les souris *Pten^{lox/-}* présentent déjà une dissémination métastatique étendue, particulièrement dans le poumon. La voie du TGF β est fortement impliquée dans la régulation du micro-environnement tumoral, notamment en activant la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse ou en diminuant l'immunosurveillance réalisée par les cellules dendritiques et les macrophages (Pickup et al., 2013). Le traitement pourrait alors être plus efficace si la tumeur était encore localisée dans le site primaire, faute de micro-environnement propice à la dissémination métastatique.

❖ Si la fréquence d'échappement reste identique, ceci peut suggérer l'existence d'autres mécanismes moléculaires inhibant la progression tumorale et dépendant des LXR. Parmi eux, l'acquisition de l'androgéno-indépendance devra être étudiée (**Figure 55**). Comme indiqué en introduction, différents travaux ont déjà suggéré le lien entre les LXRs et la signalisation androgénique, notamment grâce à la stimulation du catabolisme des androgènes *via* l'augmentation de l'expression du gène *Sult2a1*, ou en prévenant la conversion locale de précurseurs androgéniques en métabolites actifs par l'induction de l'expression de la *Steroid sulfatase* (Lee et al., 2008). Cependant, le rôle des LXRs durant le CRPC n'a pas encore été caractérisé.

Concernant cet aspect, l'équipe souhaite maintenant étudier l'effet de l'invalidation des *Lxrs* sur la mise en place d'un cancer résistant à la castration en contexte mutant pour *Pten*. L'acquisition de l'hormono-indépendance suite à une thérapie anti-androgénique représente un élément capital dans l'évolution de la tumeur vers un stade métastatique chez l'homme. Comme énoncé précédemment, la perte d'expression de *Pten* par la cellule tumorale *in vivo* modifie l'activité transcriptionnelle de AR et prédispose cette dernière à survivre malgré la castration. Ce mécanisme a initialement été proposé pour expliquer l'acquisition de l'androgéno-indépendance des tumeurs mutantes pour *Pten* (Mulholland et al., 2011). Compte tenu du lien potentiel évoqué précédemment entre le cholestérol et l'émergence du CRPC, la dérégulation du métabolisme du cholestérol due à la perte des LXRs pourrait favoriser l'émergence du phénotype.

La suite de ce projet de recherche est alors de comprendre quels rôles jouent les LXRs dans la mise en place du CRPC chez les souris *Pten^{lox/-}*. Pour cela, deux questions principales seront posées : i) L'invalidation des LXRs influence-t-elle la mise en place du CRPC *in vivo* ? ; ii) La modulation de l'activité des LXRs modifie-t-elle la réponse de AR aux androgènes au sein de la tumeur ?

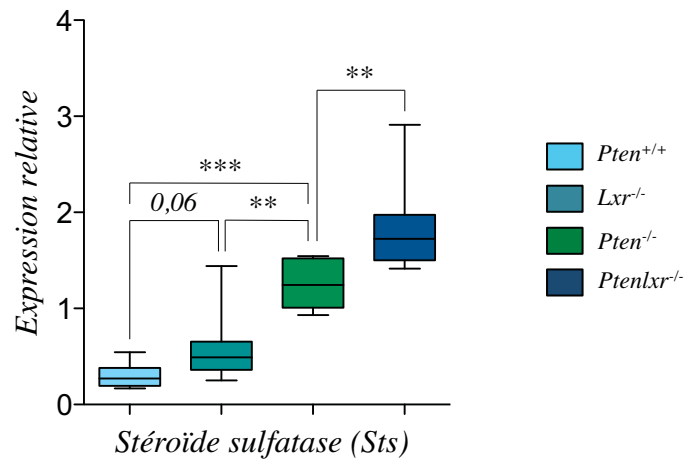
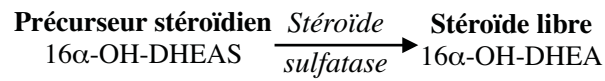


Figure 56 : L'expression du gène *Sts* est augmentée dans la prostate des souris *PtenLxr*^{-/-}

Analyse par RT-qPCR de l'expression de la *Stéroïde sulfatase* au sein des prostates dorsales d'animaux sauvages (+/+), invalidés pour les *lxrs* (*Lxr*^{-/-}), pour *Pten* (*Pten*^{-/-}), ou pour *Pten* et les *Lxrs* (*PtenLxr*^{-/-}), (N = 10/8/10/12). La normalisation est réalisée par le gène *36b4*. Test t de Student, *<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

i) Les résultats préliminaires (Laura Bousset, *communication personnelle*) montrent pour l'instant que l'invalidation des LXR α s chez les souris *Pten*^{-/-} conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire en réponse à la castration par rapport à des souris *Pten*^{-/-} exprimant les récepteurs. Ceci souligne d'une part que les LXR α s régulent l'activité proliférative des cellules tumorales en échappement vis-à-vis de la privation androgénique et d'autre part un contrôle de l'activité de AR.

ii) Les travaux démontrent également que l'induction des LXR α s *in vitro* ou que leur invalidation *in vivo* modifie le profil d'expression de gènes androgéno-sensibles dans la prostate. Par ailleurs, les souris *Ptenlxr*^{-/-} présentent, en réponse à la castration, des métastases plus agressives. Les mécanismes moléculaires par lesquels les LXR α s sont capables d'influencer la sensibilité androgénique dans ce contexte restent à élucider. De manière intéressante, l'expression de *Sts* (*Steroid sulfatase*) est augmentée dans les prostates des souris *Ptenlxr*^{-/-}. Ce résultat suggère une capacité importante des tumeurs à métaboliser les précurseurs stéroïdiens en stéroïdes actifs lors de la perte des LXR α s (**Figure 56**).

Les souris *Pten*^{-/-} présentent un faible taux de métastases. L'étude fonctionnelle des LXR α s vis-à-vis de l'échappement tumoral est alors limitée aux souris *Ptenlxr*^{-/-} et donc à l'effet de l'invalidation des récepteurs lors de la carcinogenèse. Afin de mettre en évidence d'autres mécanismes moléculaires dépendant des LXR α s et susceptibles de prévenir la dissémination métastatique, il serait intéressant d'utiliser des modèles murins présentant des récepteurs fonctionnels et capables de développer des métastases, comme par exemple les souris TRAMP. Ainsi, nous pourrions envisager de traiter les animaux avec des agonistes des LXR α s, tels que le T0901317 ou le GW3965, puis d'analyser l'impact sur la dissémination, et enfin de mettre en évidence les signalisations dérégulées.

5 - Quel est le rôle des LXR α s dans le contrôle de l'expression de marqueurs moléculaires osseux au sein de la cellule tumorale prostatique ?

Les résultats préliminaires obtenus indiquent que la perte des LXR α s chez les souris *Pten*^{-/-} est associée à une augmentation des marqueurs de différenciation ostéoblastique et des acteurs pro-minéralisants. Ces données suggèrent d'évaluer la dissémination tumorale au niveau du tissu osseux. Les résultats obtenus ne permettent pas encore de conclure clairement quant à l'existence de métastases osseuses, puisque l'identité des lésions observées n'a pas été précisément caractérisée. Il sera nécessaire de définitivement valider leur présence dans l'os et, le cas échéant, de comprendre sur quelles cibles moléculaires les LXR α s peuvent agir. Une modulation des LXR α s *in vitro* dans différentes lignées tumorales prostatiques permettra tout

d'abord de confirmer la spécificité des différents gènes dérégulés dans les souris *Ptenlxr^{-/-}*. La littérature indique que la stimulation des LXR est capable de réguler la différenciation ostéoclastique en modifiant le ratio OPG/RANKL (Remen et al., 2011). Comme expliqué en introduction, RANKL est une molécule initialement sécrétée par les ostéoblastes et sa liaison à son récepteur RANK induit la différenciation ostéoclastique. C'est un des mécanismes qui va notamment permettre d'entretenir un cercle vicieux d'ostéogenèse/ostéolyse favorable au développement de la métastase et à sa colonisation au sein de différents sites osseux (Ando et al., 2008). Ainsi, la dérégulation des marqueurs observée chez les souris *Ptenlxr^{-/-}* dans le site primaire pourrait-elle refléter une prédisposition de la cellule tumorale à métastaser dans l'os. L'étude des autres acteurs canoniquement impliqués dans l'émergence des métastases osseuses, tels que la PTHrP, sera réalisée. In vivo, nous pourrions également pratiquer des greffes intra-tibiales de cellules tumorales prostatiques sur des souris athymiques traitées avec des agonistes des LXR, puis étudier l'efficacité de colonisation de ces dernières, ainsi que le niveau d'expression des différents acteurs nécessaires à l'implantation des tumeurs, tels que RANKL, PTHrP, le TGFβ ou encore SPP1.

Enfin, la signalisation androgénique est fortement impliquée dans le tropisme osseux de la cellule tumorale prostatique (Yang and Levine, 2011). De plus, les données de la littérature montrent que les LXR sont capables d'inhiber l'activité de la signalisation des androgènes en inhibant la synthèse de ces derniers (Lee et al., 2008). Comme nos résultats préliminaires le suggèrent, les LXR pourraient jouer un rôle dans l'émergence du CRPC. De ce fait, nous rechercherons si les LXR peuvent agir sur la modulation de l'expression des marqueurs moléculaires osseux via la dérégulation de la voie des androgènes.

6 - Quelle est l'implication des LXR dans le microenvironnement tumoral prostatique ?

Les souris *Ptenlxr^{-/-}* développées par le laboratoire sont invalidées pour *Pten* uniquement dans les cellules épithéliales prostatiques, tandis que la perte des LXR est effective dans l'ensemble des tissus. Nous avons cependant caractérisé un effet spécifique de l'invalidation des récepteurs au niveau du compartiment tumoral. En effet, lors de greffes d'explants tumoraux issus des prostates de souris *Ptenlxr^{-/-}* sous la capsule rénale de souris *nude*, le développement systématique de métastases est également observé. Cependant, cette analyse ne dissocie pas l'effet de l'invalidation des LXR au niveau du compartiment épithélial de l'effet de leur invalidation dans le compartiment stromal.

Pour répondre à cette question, nous avons décidé de nous procurer des souris invalidées pour les deux isoformes des LXR spécifiquement dans l'épithélium prostatique.

Les expérimentations réalisées *in vitro* sur les lignées cellulaires MPECs (*Mouse Prostatic Epithelial Cells*) dérivées de l'épithélium de chaque génotype murin a tout de même pu nous apporter quelques indications. En effet, le mécanisme d'activation des LXRs est en lien avec l'activation de la voie PI3K/AKT dans ce type cellulaire. L'utilisation de souris invalidées pour *Pten* et *Lxraβ* dans le compartiment épithélial prostatique permettra de déterminer si la perte des LXRs au sein de la cellule épithéliale est suffisante pour promouvoir le développement métastatique. Deux cas de figure peuvent être envisagés :

- i) Les souris développent des métastases : ce phénotype nous indiquera que le rôle des LXRs dans le stroma n'est pas indispensable dans l'acquisition du pouvoir métastatique.
- ii) Les souris ne développent plus/développent moins de métastases : les LXRs doivent donc réguler des processus dépendant du stroma, ou plus largement du micro-environnement, et impliqués dans la tumorigenèse.

En effet, les tissus tumoraux sont composés d'une population mixte de types cellulaires incluant des structures directement associées avec la cellule maligne. Les interactions multiples entre la cellule tumorale et son micro-environnement local sont donc importantes. De nombreuses études caractérisent des modifications stromales accompagnant la carcinogenèse. Dans les cancers du sein, de l'ovaire, du colon et de la peau, le stroma associé aux carcinomes invasifs est ainsi composé de cellules myofibroblastiques anormales accolées aux cellules tumorales (Rønnov-Jessen et al., 1996). *In vitro*, des études ont montré une variation de la signature moléculaire, notamment de l'expression de différentes métalloprotéases, et du potentiel migratoire des cellules stromales associées à la tumeur en comparaison de celles issues de tissu sain (Basset et al., 1990). Fondamentalement, ces cellules contribuent à la formation et au remodelage de la matrice extracellulaire. Leur modulation peut offrir à la tumeur un environnement propice à la dissémination. Afin d'identifier d'autres acteurs synthétisés par la cellule stromale et impliqués dans la progression de la maladie, des travaux ont permis de mettre en évidence des molécules clés telles que des facteurs de croissance (IFG, FGF), des cytokines (IL-6) ou de manière très intéressante le TGFβ (Ellis et al., 1994; Rønnov-Jessen et al., 1996). Pour définitivement confirmer l'importance du stroma dans le développement tumoral, des auteurs ont utilisé des chimères prostatiques en association avec un cocktail viral pro-tumoral exprimant notamment *myc* et *ras*. Ils ont réalisé différentes combinaisons de chimères. Les combinaisons basées sur une transduction uniquement dans le compartiment mésenchymateux (UGM) ou épithélial (UGE) ne développent que de l'hyperplasie (Thompson et al., 1989, 1993). La combinaison UGM + UGE transduite entraîne quant à elle l'apparition récurrente de carcinomes. Ces

travaux montrent donc que des changements dans les compartiments épithéliaux et mésenchymateux sont nécessaires pour que le cancer se développe avec une malignité importante.

En ce qui concerne les LXRs, différentes études ont ainsi pu caractériser leurs fonctions dans la modification du micro-environnement tumoral. Comme décrit précédemment, Pencheva *et al.* montrent que l'activation des récepteurs dans le mélanome inhibe la progression tumorale, l'angiogenèse et la dissémination métastatique. Une partie de cet effet est reliée à l'expression de APOE, LXR β -dépendante, dans les cellules stromales et les cellules endothéliales (Pencheva et al., 2014).

En plus d'une fonction dans le compartiment stromal, de nombreux travaux illustrent l'implication des LXRs et du métabolisme des oxystérols dans la régulation de l'environnement immunitaire inné et adaptatif de la tumeur. Comme décrit dans l'introduction, différents éléments associent les LXRs à la régulation de l'activité des macrophages, des cellules dendritiques ou encore des populations lymphocytaires T et B. Dans le cancer du sein, Nelson *et al.* montrent que le 27-hydroxy-cholestérol (27-OHC), un ligand des LXRs et de ER, augmente la capacité métastatique de la tumeur (Nelson et al., 2013). Ce constat est associé à l'expression, dans les macrophages, de l'enzyme CYP27A1 convertissant le cholestérol en 27-OHC. L'agressivité du phénotype est notamment expliquée par l'augmentation des mécanismes d'EMT dans la cellule tumorale mammaire. Villablanca *et al.*, quant à eux, indiquent que la production d'oxystérols ligands des LXRs par la cellule tumorale active l'isoforme α dans les cellules dendritiques (Villablanca et al., 2010). Ceci est associé à une diminution de l'expression du récepteur aux cytokines CCR7 en surface et à une diminution de la maturation des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes. Ces cellules présentatrices d'antigènes étant nécessaires à l'activation des cellules T, la tumeur altère ainsi la qualité de l'immunosurveillance au sein de son micro-environnement. Elle favorise *in fine* l'échappement de la maladie. En lien, la production d'oxystérols par la tumeur entraîne le recrutement de neutrophiles *via* un mécanisme dépendant du récepteur aux cytokines CXCR2 (Raccosta et al., 2013). Les neutrophiles favorisent ici les processus néo-angiogéniques et l'immunosuppression. Les effets sont indépendants des LXRs, puisque le mécanisme est également observé dans des souris invalidées pour ces derniers.

Ces différentes données bibliographiques caractérisent les fonctions des LXRs dans le micro-environnement tumoral. De plus, elles illustrent la complexité des effets associés, parfois anti-tumoraux, parfois pro-tumoraux. Nous remarquons également que les oxystérols, indépendamment de l'activation des LXRs, peuvent être impliqués dans le contrôle de ce

microenvironnement. Il semble nécessaire, pour chaque pathologie tumorale, de prendre en compte la nature des ligands oxystérols en présence. Cet aspect explique peut être les différences fonctionnels des LXRs vis à vis de la progression tumorale. Dans le cadre thérapeutique, il serait plus pertinent de cibler la régulation du métabolisme des dérivés oxystérols, plutôt que directement modifier l'activité des LXRs. En exemple, on sait que l'augmentation du catabolisme des oxystérols en exprimant la sulfotransférase SULT2B1b inhibe le recrutement des neutrophiles au sein du microenvironnement, limitant la croissance du cancer (Raccosta et al., 2013).

7 - Les résultats sont-ils applicables à l'homme ?

Les résultats obtenus durant ma thèse ont notamment montré, *via* l'analyse de transcriptomes issus de la littérature, que la perte d'expression prostatique de *Pten* chez l'homme (60 % des tumeurs) est fortement associée à l'augmentation de la signature moléculaire dépendante des LXRs. Des gènes tels que *APOE*, *FASN*, *GLUT4*, *ABCG5*, *IDOL*, ou encore *CHREBP* sont ainsi surexprimés dans les tissus métastatiques en comparaison de tumeurs primaires ou de tissus sains.

L'équipe a initié l'étude d'une banque de tissus prostatiques en collaboration avec le service d'Urologie de Clermont-Ferrand (collaboration Pr L.Guy et Pr JL. Kemeny). L'originalité de cette banque réside dans le fait que les échantillons prélevés correspondent à du tissu sain et tumoral pour un même patient, permettant d'apprécier la variation entre les individus. Il serait important de vérifier la présence d'éventuelles mutations germinales ou somatiques des gènes codant pour les LXRs pour déterminer l'existence d'un polymorphisme les associant à la pathologie. Nous allons analyser l'expression des LXRs mais également de leurs cibles, en corrélation avec l'invalidation de *PTEN* dans les échantillons humains à notre disposition. Cette banque a déjà permis de caractériser les voies métaboliques associées au cholestérol dans les échantillons issus des prostatectomies. Les résultats préliminaires montrent que le captage est fortement augmenté, par le biais de l'augmentation du gène codant SRB1 dans les tissus tumoraux. En lien, une modification de la conversion en oxystérols et une diminution du stockage cellulaire sont caractérisées. Dans les tissus tumoraux, l'import de cholestérol par SRB1 a été positivement corrélé à son stockage intracellulaire, ainsi qu'à l'activation du gène régulateur SREBP2 et de ses gènes cibles : LDLR et gènes de la voie de synthèse *de novo* (HMGCoA réductase, DHCR7). L'import de cholestérol et sa transformation en oxystérols sont significativement plus élevés dans les

tissus cancéreux prostatiques. Le statut tumoral a été associé à une augmentation des flux cellulaires liés au métabolisme du cholestérol (Celhay et al., en préparation).

Globalement, cette approche nous permettrait d'avoir une idée précise de la place du cholestérol, des oxystérols et des LXRs vis-à-vis de la carcinogenèse prostatique, par rapport aux résultats déjà obtenus à l'aide de nos modèles murins. En nous référant aux acteurs moléculaires mis en évidence chez les souris *Pten^{lox}*, il serait judicieux de corrélér l'accumulation des oxystérols ou l'expression des gènes cibles des LXRs avec différents acteurs de la voie du TGF β et de l'EMT, ainsi qu'avec des marqueurs impliqués dans l'homéostasie osseuse tels que l'ostéoprotégérine, l'alkaline phosphatase, la cadhérine 11 ou encore SPP1.

D'un point de vue thérapeutique et d'après leur implication dans le métabolisme du cholestérol, le ciblage des LXRs pourrait être pertinent. En effet l'expérience acquise par notre équipe indique que les LXRs exercent des rôles anti-prolifératifs et pro-apoptotiques dans la cellule tumorale prostatique *in vitro* et *in vivo* (Pommier et al., 2010). Nous avons également montré que les LXRs agissent comme une barrière contre la progression tumorale. Enfin, sur des xénogreffes de cellules LNCaP, l'utilisation de T0901317 diminue le volume des tumeurs, suggérant que les cellules tumorales humaines sont sensibles à l'induction pharmacologique des LXRs (Pommier et al., 2010). Ce constat interroge quant au potentiel d'un traitement à l'aide d'agonistes des LXRs chez l'homme. Pour cela, il est prioritaire de poursuivre l'identification des mécanismes régulant le métabolisme du cholestérol et des oxystérols lors de la tumorigenèse prostatique, ainsi que d'identifier précisément les acteurs moléculaires ciblés par les LXRs lors du processus de dissémination métastatique. De plus, les efforts concernant le développement de ligands des LXRs permettant le ciblage de certaines de leurs fonctions spécifiquement dans un tissu doivent être maintenus.

D'après le lien mis en évidence entre la perte de *Pten* et l'activation des LXRs, il semble également important de savoir si une sous-catégorie de patients pourrait répondre préférentiellement à un traitement. Avant cela, deux questions doivent être résolues au sein de modèles transgéniques : i) Est-ce que les LXRs peuvent être activés encore plus efficacement en contexte *Pten^{lox}* ? ; ii) Est-ce que l'activité des récepteurs lors de la tumorigenèse, à l'image du modèle murin *Pten^{lox}*, est capable de freiner la dissémination métastatique ?

Il serait intéressant de réaliser des traitements avec des agonistes des LXRs (GW3965 et T0901317) dans les souris *Pten^{lox}*. Le niveau d'activation des récepteurs, l'agressivité tumorale dans le site primaire et la modulation de la fréquence métastatique devront être

évalués. L'événement de dissémination étant faible dans ce modèle, un grand nombre d'animaux devra être analysé. L'utilisation d'un modèle sauvage pour *Pten* et développant des métastases, telles que les souris TRAMP, nous permettra également de tester l'efficacité d'un traitement avec ces mêmes agonistes. Comme évoqué précédemment, cela nous permettra aussi de vérifier si la fonction protectrice des LXR α s est effective indépendamment de la perte de *Pten*.

Nos travaux montrent que dans le modèle *Pten*^{-/-}, l'anticorps anti-TGF β réduit la progression tumorale, et un co-traitement avec du GW3965 amplifie l'effet de l'anticorps neutralisant. Il est intéressant de se demander si une association entre des agonistes des LXR α s et un ciblage direct de la voie du TGF β serait pertinente d'un point de vue thérapeutique.

Globalement, les résultats obtenus lors de ma thèse confortent le rôle des LXR α s non seulement dans l'inhibition de la progression du cancer de la prostate, mais surtout dans la diminution des événements métastatiques. Comme il a été expliqué, ces mécanismes peuvent être intimement liés avec la modification du métabolisme du cholestérol et des oxystérols.

ANNEXES

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Lipids and prostate cancer adenocarcinoma

Due to their amphiphilic properties, lipids are able to form various biological structures through the development of specific vesicles. Fatty acids and cholesterol thus constitute important molecules for lipid membrane composition. Conversely lipid dysfunction, and more specifically cholesterol homeostasis dysregulation, is involved in a wide range of pathologies. Among these, cancerous lesions have been correlated with cholesterol accumulation. However, links between cholesterol and cancer promotion and progression are still poorly understood and characterized although it is now assumed that sensing and controlling cholesterol levels may be critical for cancer kinetics. This review will focus on lipid abnormalities associated with prostate cancer adenocarcinoma, as well as the mechanisms by which cholesterol may promote cancer progression. Pharmacologically, molecules inhibiting HMG-CoA reductase or activating liver X receptors, the nuclear receptors for oxysterols, could disrupt cholesterol contribution to prostate carcinogenesis.

Keywords: cholesterol • lipids • liver X receptors • prostate cancer • SLiMs

Lipids: biological functions & homeostasis regulation

Lipids form a diversified group of water-insoluble molecules such as sphingolipids, phospholipids, triacylglycerides and sterols, which all have essential roles at molecular, cellular and whole body levels. Their main functions include energy storage, signaling and cell membrane dynamics, depending on their classification (for an extensive review, see [1]).

Fatty acids are obtained from triglycerides or phospholipids, and establish the major building block for synthesis of triacylglycerides, mainly used for energy storage. Indeed, when metabolized, they generate large quantities of ATP. Phospholipids constitute a crucial cell membrane component as they can form lipid bilayers, providing membrane fluidity and mechanical strength together with sterol. Sphingolipids contain a backbone of sphingosine bases, a set of aliphatic amino alcohols including sphingosine: such a structure allows protection of cell surface against harmful environmental factors by

forming a mechanically stable and chemically resistant outer leaflet of plasma membrane lipid bilayer. Sterols and related compounds play essential roles in eukaryotic body physiology, especially for membrane cell permeability and fluidity. While phytosterols are found in plants, cholesterol is mainly found in animals, where it also serves as a messenger in developmental signaling pathways as well as precursor for steroid hormone, bile acid and vitamin D biosynthesis. Lipids are thus constantly broken down, metabolized, used for energy production and replenished from food or *de novo* synthesis. Imbalances or abnormal production can therefore lead to accumulation of fat, resulting in various pathologies, such as cardiovascular diseases, diabetes or metabolic syndrome.

Altogether, lipids are important in structural fate and cell signaling. Hence a dysregulation in their homeostasis has been proposed to be responsible for cancer progression, as these processes could be altered in this pathology. This is particularly true regarding

Anthony Alioui^{1,2,3,4},
Olivier Celhay^{1,2,3,4,5},
Silvère Baron^{†1,2,3,4}
& Jean-Marc
A Lobaccaro^{*,†1,2,3,4}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²CNRS, UMR 6293, GReD, F-63171 Aubiere, France

³INSERM, UMR 1103, GReD, F-63171 Aubiere, France

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁵Service d'Urologie, CHU Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France

*Author for correspondence:

Tel.: +33 473 407416

Fax: +33 473 407042

j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

† Authors contributed equally

cholesterol, which could be involved in prostate cancer development.

Lipids, critical membrane cell components

Because of its chemical structure, cholesterol is attracted by a portion of the fatty acid chain on the nearest phospholipid. This allows membrane immobilization, reducing its permeability to small soluble molecules that would otherwise easily pass through. Thus, in the absence of cholesterol, cell membranes would be too fluid and permeable to a great number of molecules. Cholesterol also promotes plasma membrane integrity by intercalating between phospholipids to prevent gathering of fatty acid and subsequent solidification [2].

Membrane fluidity is also crucial for cell signaling. Plasma membrane contains proteins that perform important functions such as channeling, pumping substances in and out of the cell and signal transduction.

Some of these proteins require a thicker phospholipid mat to sit in, and needs physical contact to function properly. They are found in specialized membrane structures that present high concentrations of cholesterol and sphingolipids containing longer and more saturated fatty acid tails [3]. That part of the membrane is also thicker, favoring accommodation of proteins. Cholesterol thus has a leading role in cell signaling and its ability to communicate with neighboring cells.

How is cholesterol kept under control?

In mammals, cholesterol is supplied through diet and *de novo* synthesis.

Dietary origin of cholesterol

Dietary cholesterol is first carried from small intestine to liver, which then redistributes it to other organs (Figure 1). From enterocytes, chylomicrons join intestinal lymphatic circulation and blood. ApoC-II proteins that they contain allow their recognition by the lipoprotein lipase (LPL), which hydrolyzes triglycerides. Released fatty acids rejoin underlying tissues and high-density lipoprotein (HDL) type structures, composed of phospholipids, cholesterol and apolipoproteins [4]. Remaining chylomicrons are taken up by hepatocytes via their ApoE receptor. In turn, hepatocytes synthesize very low density lipoprotein (VLDL) particles involved in the transport of triglycerides and cholesterol esters from the liver to peripheral tissues. VLDL are then degraded by the LPL, which recognizes ApoC-II, hydrolyzing triglycerides and causing ApoC departure. Low-density lipoproteins (LDL) enriched in cholesterol esters, Apo-B100 and ApoE are then formed: they can be degraded in the liver after LDL-receptor (LDLR) mediated internalization (Figure 1),

upon ApoB100 recognition [5]. The whole LDL/LDLR complex is internalized through endocytosis via clathrin-containing vesicles and transported to the acidic compartment in which cholesterol esters are hydrolyzed by acid lipase [6]. The LDLR/LDL complex is then dissociated in premature endosomes because of lower pH, and finally recycled at the membrane [7,8].

De novo cholesterol synthesis

The amount of dietary cholesterol is limited. Therefore, there is a requirement of *de novo* synthesis, which can be undertaken by most cell types in the body. Cholesterol is synthesized in endoplasmic reticulum (ER) and cytoplasm from acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) via the mevalonate pathway [9,10]. The rate-limiting enzyme is 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase (Figure 1) that catalyzes conversion of HMG-CoA to mevalonate [11]; this step is easily targeted by cholesterol-lowering drugs such as statins.

In the early stages of cholesterol synthesis, squalene is converted into lanosterol from which cholesterol will be obtained in 19 steps involving 9 different enzymes. The last steps are divided into two pathways, which can use lathosterol, 7-dehydrocholesterol or desmosterol (for a review see [12]).

Cholesterol and some precursors, such as lathosterol and desmosterol, leave the ER and are targeted to the plasma membrane through transfer proteins. To prevent accumulation of free cholesterol and subsequent cell toxicity, cholesterol is converted to cholesteryl esters by acyl-CoA acyltransferases (ACAT) 1 and 2 [13] and stored in cytoplasmic lipid droplets, but can be released by cholesterol ester hydrolase. This esterified/free cholesterol cycle is rapid and allows for easy cholesterol mobilization to cover cellular demand [14].

Transcription factors control cholesterol homeostasis

Schematically, two types of transcription factors are involved in the control of cholesterol homeostasis (Figure 1): sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) and liver X receptors (LXR). These two pathways have opposite effects as SREBP2 increases cholesterol synthesis and uptake while LXRs activate cholesterol efflux and inhibit its uptake [15].

In mammals, SREBP2 pathway promotes intracellular cholesterol accumulation by stimulating capture and *de novo* synthesis [16]. SREBP2 is a transcription factor encoded by the *Srebf-2* gene [16]. Mechanistically, SREBP2 is synthesized as an inactive precursor bound to the ER membrane [17,18]. After translation, SREBP2 binds to the SREBP cleavage-activating protein (SCAP), a transmembrane protein acting as a chaperone and sterol sensor [19]. The release of

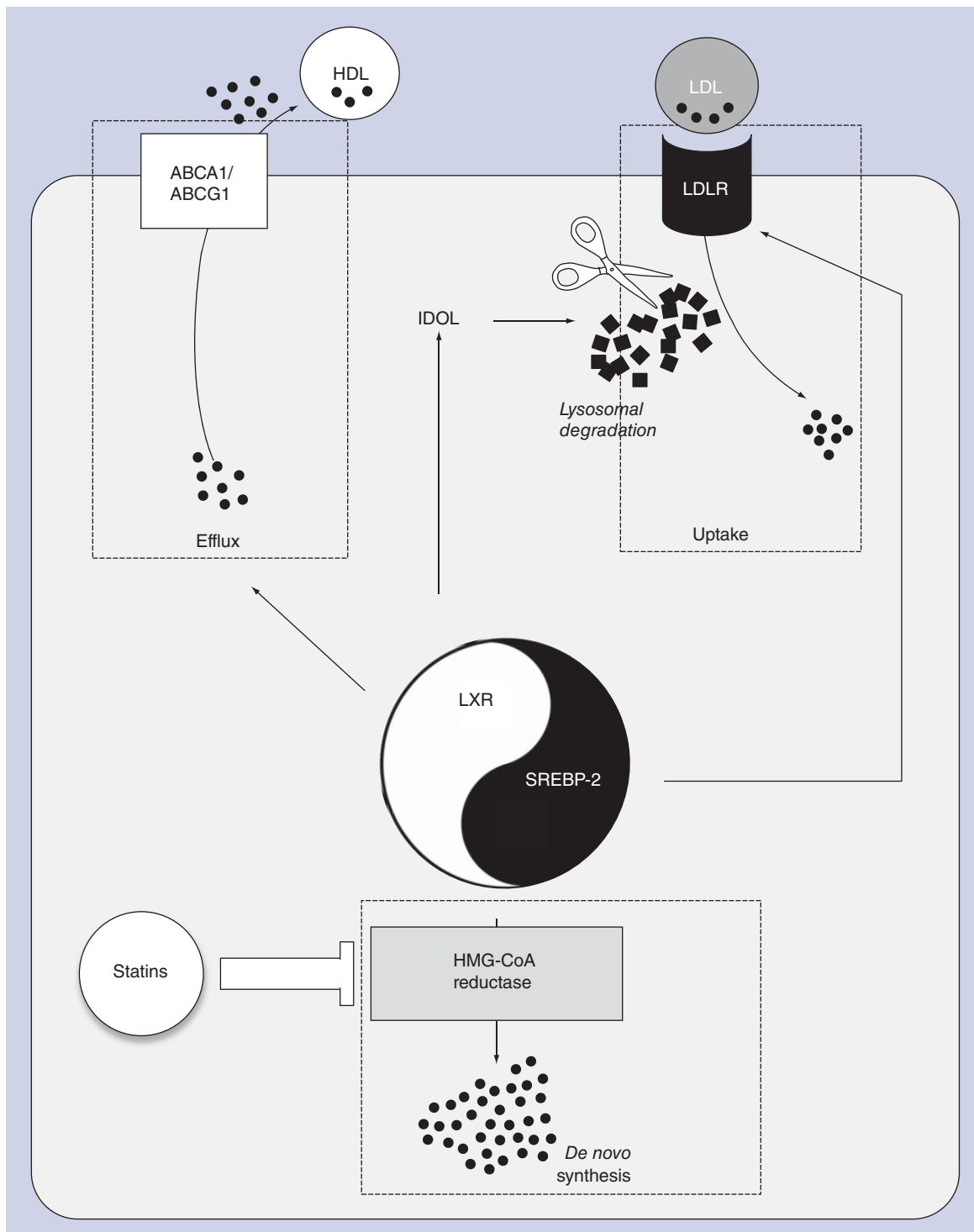


Figure 1. Cholesterol homeostasis regulation. Cell cholesterol levels largely depend on food intake which, after several rounds of modifications explained in this figure, will allow a constant cell supply via LDL particles. Within the cell, two main transcription factors directly regulate cholesterol homeostasis dependent upon its sensing. LXRs decrease intracellular cholesterol, favoring its efflux via ABC transporters, as well as activating LDLR lysosomal degradation, depending on IDOL. In contrast, a decrease in cholesterol levels induces SREBP-2 activity, which especially increases HMG-CoA reductase, a key enzyme in *de novo* cholesterol synthesis, and induces LDLR. LDLR: LDL-receptor; LXR: Liver X receptor; SREBP2: Sterol regulatory element-binding protein 2.

the complexes from the ER is controlled by a protein called insulin-induced gene (INSIG) which binds SCAP in the presence of cholesterol/sterol and prevents SCAP/SREBP complex to initiate ER-Golgi COPII-dependent traffic pathway [20,21]. When intracellular cholesterol levels are low, the interaction between SCAP and INSIG is interrupted [22], allowing SCAP/COPII interaction and release of SREBP2 at the Golgi where it is then cleaved by two membrane proteases, S1P and S2P [23]. These sequential cleavages salt out the active N-terminal membrane fragment which translocates to the nucleus and activates expression of related genes such as *HMGCR* or *LDLR* [24]. Upon sterols enrichment, SREBP2 is blocked in the ER by SCAP/INSIG complex, resulting in a decrease in cholesterol levels [25,26].

LXRs belong to the nuclear receptor superfamily [27,28]. They act as transcription factors whose activation is dependent on the binding of an oxysterol-type ligand, in other words, an oxidized derivative of cholesterol [29]. These receptors are declined in two isoforms present in mammals, LXR- α (NR1H3) and LXR- β (NR1H2) [30,31]. Phenotypic analysis of mice lacking both isoforms of LXRs as well as pharmacological studies showed that these receptors sense cell cholesterol concentration and control its homeostasis. When activated by oxidized cholesterol derivatives, LXRs are able to regulate genes involved in various levels of cholesterol homeostasis control.

- **Inhibition of *de novo* synthesis:** A first source of cholesterol results from the enzymatic reaction leading to Acetyl-CoA transformation in mevalonate by the HMG-CoA reductase [10], ultimately resulting in *de novo* formation of cholesterol. In mice lacking both *Lxrs*, higher expression of *Srebf2*, *Hmgcr* and *Sqs* has been observed [32], while T0901317 (a synthetic LXR agonist) treatment induces opposite effects [33];
- **Cholesterol uptake restraint:** A second way to modulate the pool of intracellular cholesterol involves its cellular import *via* LDLR. LXRs activate the expression of the E3 ubiquitin ligase Idol (inducible degrader of the LDLR), which results in LDLR-targeted degradation, and reduction of the intracellular cholesterol pool [34];
- **Reverse cholesterol transport initiation:** Several ATP-binding cassettes (ABCs) encoding genes are LXR *bona fide* targets [35,36]. ABCA1 and ABCG1 transporters actively export cholesterol to the extracellular HDL acceptor and increase reverse cholesterol transport. Likewise, ABCG5 and ABCG8 export sterols from the inner compartment

of hepatocytes to the bile duct, or from enterocytes to the intestinal lumen [37–39]. In addition, LXRs have also been shown to modulate ApoE level, an essential component of the VLDL particles [40];

- **Steroid synthesis:** We and others have shown that LXRs can regulate the rate of cholesterol transformation into steroids in various tissues such as the testis [41]. A decrease in the amount of circulating testosterone can be detected after LXR activation by the synthetic agonist T0901317. This well-identified mechanism is in part dependent on LXR-mediated activation of sulfotransferase 2a1 that deactivates androgens, and inhibition of the steroid sulfatase STS that activates androgens [42]. Interestingly, these hormones have a key role in prostate cancer development, and are therefore particularly targeted in the early stages of hormone-dependent prostate cancer development.

Cholesterol level, prostate cancer & tumor progression

Cholesterol & prostate cancer

As early as the beginning of the 1900s, White [43] observed abnormal lipid accumulation in solid tumors. Later on, Swyer identified these lipids as cholesterol accumulating in affected area of the prostates [44]. Since then, many studies have associated blood cholesterol level alterations with higher risk of prostate cancer development [45–48], more specifically high-grade subtype [49]. Furthermore, cancer mortality has been found higher in a population characterized by important cholesterol levels [50,51]. Conversely, use of cholesterol-lowering agents such as statins for a long period is correlated with reduced risk to develop aggressive prostate cancer [52,53]. It is important to note that these clinical observations have been reinforced by results obtained in human cell and mouse models (Table 1). In fact, addition of statins on prostate tumor cell lines results in a proliferation decrease. In parallel, inhibition of tumor growth *in vivo* is observed in immunodepressed mice xenografted with PCa cells in response to statins [54,55]. Overall, data obtained *in vivo* and *ex vivo* as well as patients observations converge toward a procarcinogenic role of cholesterol.

Controversy still exists regarding the link between excessive consumption of cholesterol, rates of circulating cholesterol and risk of PCa to develop [61]. However numerous cellular models, transgenic and knock-out mice involving cholesterol-regulated genes, many dietary experiments and ultimately epidemiological analyses performed on dietary habits as well as statin-treated patients are clearly in favor of a positive role of excess cholesterol in solid tumor progression. Today, the main issue is hence to understand if and how

Table 1. Summary of cholesterol content modulations *ex vivo* (cell lines) as well as *in vivo* (mouse models and epidemiological data).

Cholesterol levels	Cancer cell lines	Cancer models	Patients
High	High capture capacity in breast and prostate cell lines (LDLR dependent) [54,55] PCa cells: EGFR overactivation depending on lipid rafts cholesterol enrichment [56,57]	LNCaP xenografted + cholesterol-enriched diet: cell survival increase AKT dependent [58] TRAMP mice + cholesterol-rich diet: PCa aggravation [59] CRPC: AR activation dependent on lipid rafts activity [60]	Blood cholesterol enrichment and high-grade prostate cancer subtype and mortality [5,10,45]. De novo synthesis increase (HMGCR dependent) in CRC [61] Asian migrants (high cholesterol food): increase of PCa development CRPC: intratumoral and metastatic androgen synthesis [62,63]
Low	Statin treatment: proliferation decrease [13] LNCaP + T09 (LXR agonist): cell proliferation decrease and pro-apoptotic function dependent on lipid rafts [64,65]	Nude mice xenografted with PCa cells treated with statins: tumor growth inhibition [14] Inhibition of HMGCR in orthotopic grafts: delayed growth [66] SHH pro-carcinogenic pathway decrease by cholesterol lowering [67,68]	Statin treatment : PCa incidence decrease [11,12]

CRPC: Castration-resistant prostate cancer; EGFR: EGF receptor; PCa: Prostate cancer; T09: T0901317, a synthetic LXR agonist.

cholesterol could directly alter tumor progression, and to decipher the mechanisms underlying its enrichment and pro-carcinogenic role in a tumor context.

Molecular mechanisms accounting for cholesterol enrichment in prostate cancer

Various mechanisms have been proposed to explain how cholesterol could promote cancer development.

- In noncancer cells, addition of exogenous cholesterol downregulates both LDLR and SREBP2, allowing cholesterol level regulation. However, the capacity to capture cholesterol is increased in breast tumors and prostate cells lines [66,69], as a result of loss of LDLR expression regulatory mechanisms;
- Accumulation of *HMGCR* transcripts has been detected in colon cancer, promoting *de novo* cholesterol synthesis [70];
- Suppression of HMG-CoA reductase activity in various prostate tumor cell lines inhibits proliferation delays growth of orthotopic grafts [71].

Although genetic alterations account for some cholesterol enrichment in PCa, the first generation of Asian migrants living in the USA has a more important risk of developing PCa than those living in Asia [72]. This suggests that environmental factors, such as a lipid-enriched diet, contribute to the deleterious effects of cholesterol together with genetic disruption of protective mechanisms.

How can cholesterol support cancer progression?

As previously described, cholesterol has multiple functions, and their dysregulation could induce a favorable context for prostate tumorigenesis (Figure 2). It has been known for decades that cholesterol plays a major role in cell proliferation, and its synthesis is closely synchronized to cell cycle progression. In addition, cholesterol synthesis inhibition induces cell growth arrest [73]. Indeed, lipid rafts, which constitute microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids, represent significant structures in procarcinogens signaling pathways activation [74]. Furthermore, *de novo* synthesized cholesterol as well as synthesis precursors are involved in developmental signaling activity, which is frequently disrupted in tumor context [75]. Finally, cholesterol is used in steroid hormone synthesis, a key element in transition to castration-resistant prostate cancer (CRPC) [56].

Lipid rafts & cancer signaling overactivation

As described above, lipid rafts are structures composed of glycosphingolipids, cholesterol and protein receptors organized in glycolipoprotein microdomains. Lipid composition could thus influence membrane fluidity, protein activity and receptor trafficking [57]. Two types of lipid rafts may be involved in cancer. The 'Cer-rafts,' areas enriched with ceramides, sphingomyelins and proteins as FAS (or Apo-1, apoptosis antigen-1), FASL (FAS ligand) and DISC (death-inducing signaling complex), whose primary role is to induce

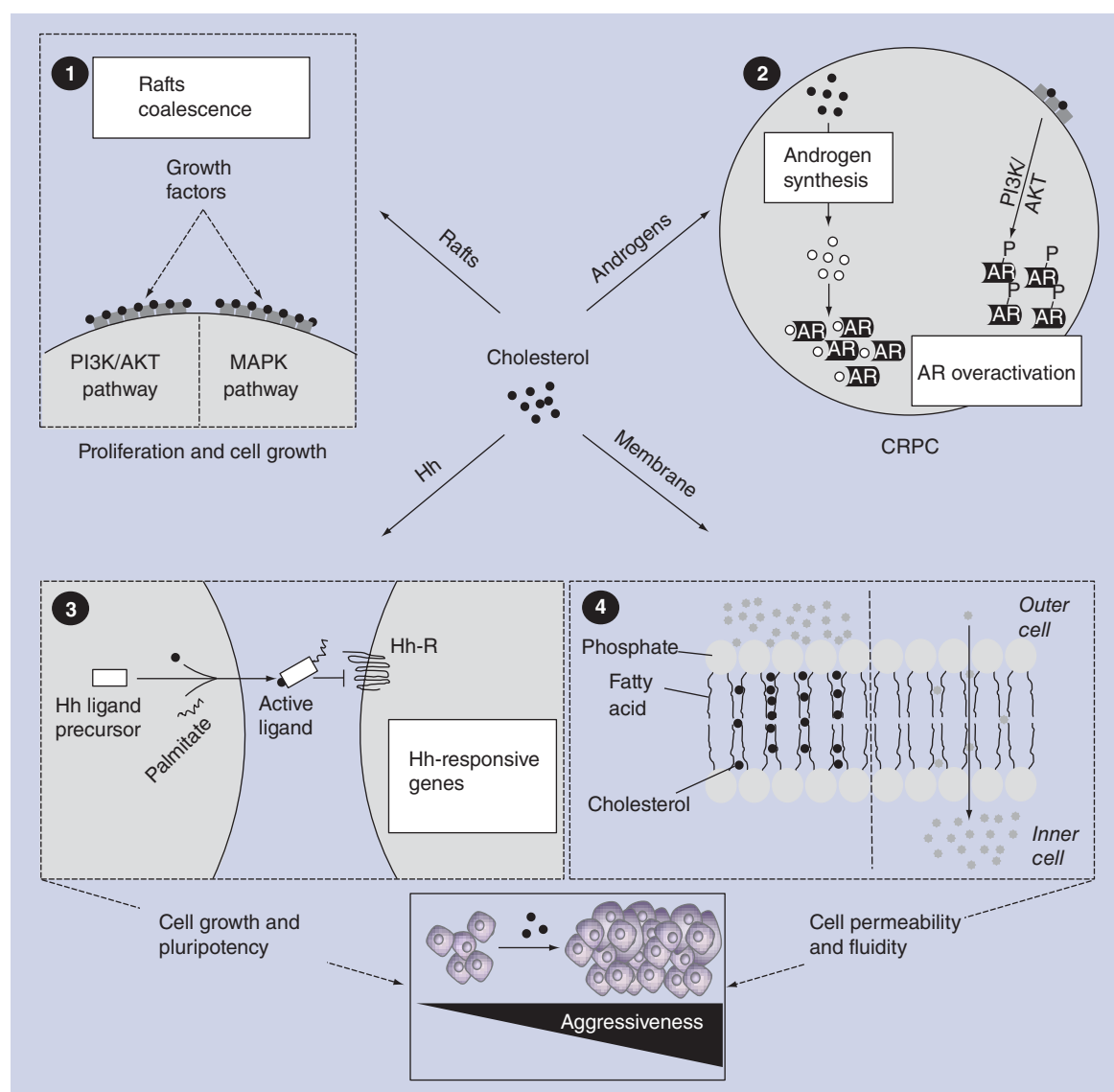


Figure 2. Cholesterol involvement in prostate carcinogenesis. Various molecular mechanisms may explain the growing link between cholesterol and cancer. Due to its involvement in lipid raft coalescence, cholesterol is able to stimulate pro-proliferative and growth pathways, such as PI3K/AKT and EGFR. Cholesterol is also positioned as a precursor of androgen synthesis and AR activator (phosphorylation rafts dependent), assigning it a function in the CRPC setting. Interestingly, this molecule is a key factor in maturation and signal transduction of the Hh pathway, critical in cell pluripotency and cancer aggressiveness. Finally, cholesterol is a structural component of cell membrane, regulating its permeability to extracellular molecules and cell communication with tumor environment.

CRPC: Castration-resistant prostate cancer; EGFR: EGF receptor; Hh: Hedgehog.

apoptosis. Conversely, the 'Chol-rafts' are enriched in cholesterol, sphingomyelin, gangliosides and proteins such as caveolin, CD44 and members of the receptor tyrosine kinase family, regulating cellular homeostasis. Interestingly, 'Chol-rafts' may promote malignant cell transformation, tumor progression, angiogenesis and metastasis [74]. Through its role in increasing signaling platform size (Figure 2), cholesterol thus stimulates raft coalescence and activity [58]. In tumor prostate cells,

EGF receptor is more active and phosphorylated within lipid rafts, allowing modulation of EGF receptor pathway when cholesterol is targeted [59,76].

Moreover, mice xenografted with LNCaP cells and fed with a cholesterol-enriched diet show increased AKT (protein kinase B [PKB], which is directly dependent on lipid rafts) phosphorylation that therefore promotes cell survival. Conversely, simvastatin reduces the phosphorylation of AKT in rafts [77]. Finally, TRAMP

mouse model of prostate cancer fed a cholesterol-rich diet exhibits aggravation of tumor phenotype [78].

Cholesterol & promotion of androgen signaling

Localized synthesis of androgens in prostate tumor environment (Figure 2) is a common step toward castration-resistant cancer installation [79]. Indeed, its development is tightly associated with androgens. The most abundant androgen in the circulation is testosterone (90%) produced by testes, which is able to diffuse into prostate cells. Testosterone is then converted into dihydrotestosterone (DHT) by the 5 α -reductase enzyme and binds the androgen receptor (AR) with high affinity. Androgens produced in the adrenal cortex, such as dehydroepiandrosterone and androstenedione, contribute to the remaining 10% [80].

As LXRs, AR is a member of the steroid receptor superfamily, and acts predominantly as a ligand-dependent transcription factor after binding to various DNA sites. Upon activation by DHT and conformational changes, AR translocates into nucleus, homodimerizes and activates target genes transcription [81]. Thus, AR gene expression signature in cancer context involves hundreds of transcripts, like IGF-1 promoting cell proliferation, motility and invasion, allowing higher cell aggressiveness [82].

Antiandrogens administration such as bicalutamide (Casodex®), flutamide (Eulexine®) or nilutamide (Anandron®) to inhibit androgens action on AR is usually the first line of pharmacological therapy in order to block early PCa development [60]. Although the majority of patients (70%) having prostate cancer respond to treatment, a therapeutic escape occurs within 2 to 3 years, resulting from hormone-resistant clone selection, which is a major problem to effectively prevent disease progression [62]. Besides AR mutations or its overexpression [63], two additional mechanisms involving cholesterol have been described:

- Crosstalk with growth factor and cytokine signaling pathways: In CRPC, the crosstalk between signaling pathways and AR provides a ligand-independent mechanism to sustain AR activation and promote cell growth. Thus, AR phosphorylation has been described on serine/threonine residues, allowing its translocation into the nucleus and alteration of AR-dependent transcriptional activity. MAPK, AKT, protein kinase A, protein kinase C, src-family kinases and Ack1 kinases have all been implicated in this process [83];
- Intracrine synthesis of androgens: CRPC tissue exhibits persistent levels of androgens, despite pharmacological treatment. Studies showed

upregulation of steroidogenic enzymes in model of CRPC and tissue from CRPC patients, suggesting an increase of intratumoral androgen synthesis [84]. Indeed, upregulation of androgen metabolism gene expression has been described in metastases of CRPC patients reactive to primary tumors [85].

Cholesterol & developmental signaling

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is essential for numerous processes during embryonic development including cell growth, differentiation, patterning and organogenesis (Figure 2). Hh exerts its activity by diffusing along a concentration gradient. In normal adult tissues, this pathway is involved in stem cell population maintenance, tissue repair and regeneration [86]. Activation of Hh signaling has been described in tumor development and progression, including prostate cancer [87], therapy-resistant state [88] and advanced prostate cancer [89]. Activated Hh has been linked with Gleason score and metastatic cancer [90]. In addition, a potential relationship between Hh signaling and androgen-independent prostate cancer has been described [67,68,91].

Cholesterol regulates the Hh pathway through a covalent binding, making this post-translational modification unique among all known proteins [92]. After enzymatic cleavage, the cholesterol-modified N-terminal fragment is further palmitoylated, producing a highly hydrophobic and active protein [93]. Cholesterol is therefore absolutely required to allow this cleavage, which results in the formation of a protein with low diffusion rate. In addition to receptor activation, cholesterol is also necessary for signal transduction. Indeed, pharmacological inhibition of cholesterol biosynthesis leads to defective responses to the Hh ligand, independent of receptor processing [92,94]. Moreover, VLDL increases survival of endothelial cells, which are exquisitely dependent on Hh ligands, suggesting that the circulating pool of these ligands could have a role in tumor angiogenesis [95].

Could reduction of intratumor cholesterol concentration inhibit malignant properties?

We and others have raised the question of targeting cholesterol and its regulating pathway in prostate cancer. Along with regulating diet cholesterol, two types of molecules could counteract cholesterol increase: statins, by inhibiting SREBP2 pathway and activators of LXR, involved as described before, in intracellular cholesterol availability.

Statins & cholesterol *de novo* synthesis inhibition: first defense against prostate cancer progression

Historically, statins have been used as cholesterol-lowering molecules [96,97] in patients with

cardiovascular disease risk [53]. Statins thus reduces cardiovascular risk [98]. As previously described, statins block *de novo* cholesterol synthesis and decrease cellular uptake [99]. Epidemiological studies showed a beneficial effect on reducing the incidence of prostate cancer among long-term statin users [52]. It is only very recently that statin potential effect on disease progression has become clear [53]. This is explained by the fact that the first patients treated with these molecules in the late 90s only today reach cancer development average age (71 years). Together with decreased incidence, less aggressive tumor formation has been described, compared with patients who had never taken statins [100].

The molecular underpinnings are not clear yet. However, hypotheses have been raised based on pleiotropic cholesterol effects, even though cholesterol-independent effects cannot be ruled out. Indeed, statins inhibit the procarcinogenic NF- κ B signaling pathway, involved in immunity and cellular response to stress [101]. Its activation then initiates transcription of antiapoptotic genes, cellular inflammatory mediators and metalloproteases, all involved in cancer progression [64]. In addition, antioxidant properties have also been shown and associated with reduction of cellular, which could also prevent cancer progression [65]. Experimentally, treatment with statins delays tumor growth in mice xenografted with a mammary tumor cell line [54]. Furthermore, addition of statins on prostate tumor cell lines shows antiproliferative effects [55]. The emerging idea of a statin anticancer potential is then increasingly supported, even if the hindsight of this new feature is still too recent. Indeed, despite their positive action, statins present potential severe side effects affecting muscle (up to rhabdomyolysis syndrome), liver (risk of diabetes) and kidney (acute renal failure after intensive treatment) [99].

LXR & cholesterol sensing & regulation

LXRs are hypocholesterolemic factors. Their activation triggers several pathways (Figure 3) that inhibit cholesterol cell uptake, increase cholesterol efflux and reverse transport to the liver. All of these parameters could potentially alter prostate cancer progression. In prostate adenocarcinoma cell models (LNCaP), LXRs are able to decrease cell proliferation, by regulating p27KIP1 degradation [102]. LXRs also have a pro-apoptotic role, *via* PI3K/AKT cell survival pathway repression, dependent of cholesterol decrease in rafts [103,104]. *In vivo*, animals fed a cholesterol-rich diet develop impaired lipid homeostasis regulation characterized by accumulation of intracellular cholesterol, and associated with PIN development [105]. Molecul-

arly, this phenotype is characterized by epithelial hyperproliferation and deregulation of key cell cycle (*Ccnd1* and *d2*) and tumor suppressor genes (*Nkx3.1* and *Msmb*), as well as oncogenes (like *Ezh2*). Thus, these data show that cholesterol overload, associated with loss of LXRs, can initiate early stages of tumor development, demonstrating their key role in prostate homeostasis. Interestingly, pharmacological activation of LXRs in the context of melanoma suppresses invasion, angiogenesis, tumor progression and metastasis. Molecular and genetic experiments revealed these effects to be mediated by LXR- β , through transcriptional induction of ApoE [106]. Further investigation is thus needed to extend these findings to PCa.

As for statins, LXR agonists could have some deleterious side effects. This is mainly associated with ubiquitous LXR expression and their ability to respond to agonists in a large variety of cells. LXR-623 agonist has been tested in healthy volunteers [107]. It resulted in accumulation of ABCA1 and ABCG1 in blood cells, in parallel with LDL and cholesterol level decrease in the serum. Unfortunately, the test was ended due to severe neurological side effects, showing that pharmacological activation of LXRs is not a trivial process. Therefore, screening for new isoform- and tissue-specific ligands called SLiMs (selective liver X modulators) [108] is an essential perspective and a solution of choice to address these problems and to allow to consider LXR-dependent pharmacological treatment of prostatic adenocarcinoma.

Questioning of this review was to determine whether & how cholesterol could influence cancer progression

Despite a controversy about the use of drugs for cholesterol lowering due to some serious side effects, emerging clear data indicate a strong association between cancer aggressiveness and cellular cholesterol enrichment. Although various functions of the latter could account for this (such as lipid rafts or androgen pathway), it is essential to understand the reasons for cholesterol homeostasis disruption in epithelial cells and to decipher the underlying molecular mechanisms. Besides, this review only focuses on the effect of cholesterol variation in tumor cells. It should be noted that tumor environment is crucial for tumor progression, aggressiveness and metastasis. Indeed, immune cells, especially tumor-associated macrophages, play a central role by differentiating into M1-like cytotoxic, pro-inflammatory and antiangiogenic phenotype, or into M2-like pro-angiogenic and protumoral phenotype. Unfortunately, oxysterols and LXRs may have a negative effect on cancer cells as they favor the M2 phenotype [109]. The development of SLiMs is thus more than a necessity.

Future perspective

Fundamental, clinical and epidemiological evidences demonstrating that high amount of cholesterol is associated with solid tumors, such as intestine, breast and prostate cancers, is almost a general consensus. However, controversy still exists regarding the way to decrease the levels of cholesterol as drug therapies could have side effects. Two main types of drugs can be used: statins and LXR activators. The future challenge will be to model new selective liver X modulators (SLiMs)

before any consideration of using LXR-dependent pharmacological treatment of prostatic adenocarcinoma.

Financial & competing interests disclosure

J-MA Lobaccaro's lab is supported by Fondation pour la Recherche Médicale and Fondation BNP-Paribas, Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comités Allier et Puy-de-Dôme), Association de Recherche contre le Cancer, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), Région Auvergne grants., Oncostarter

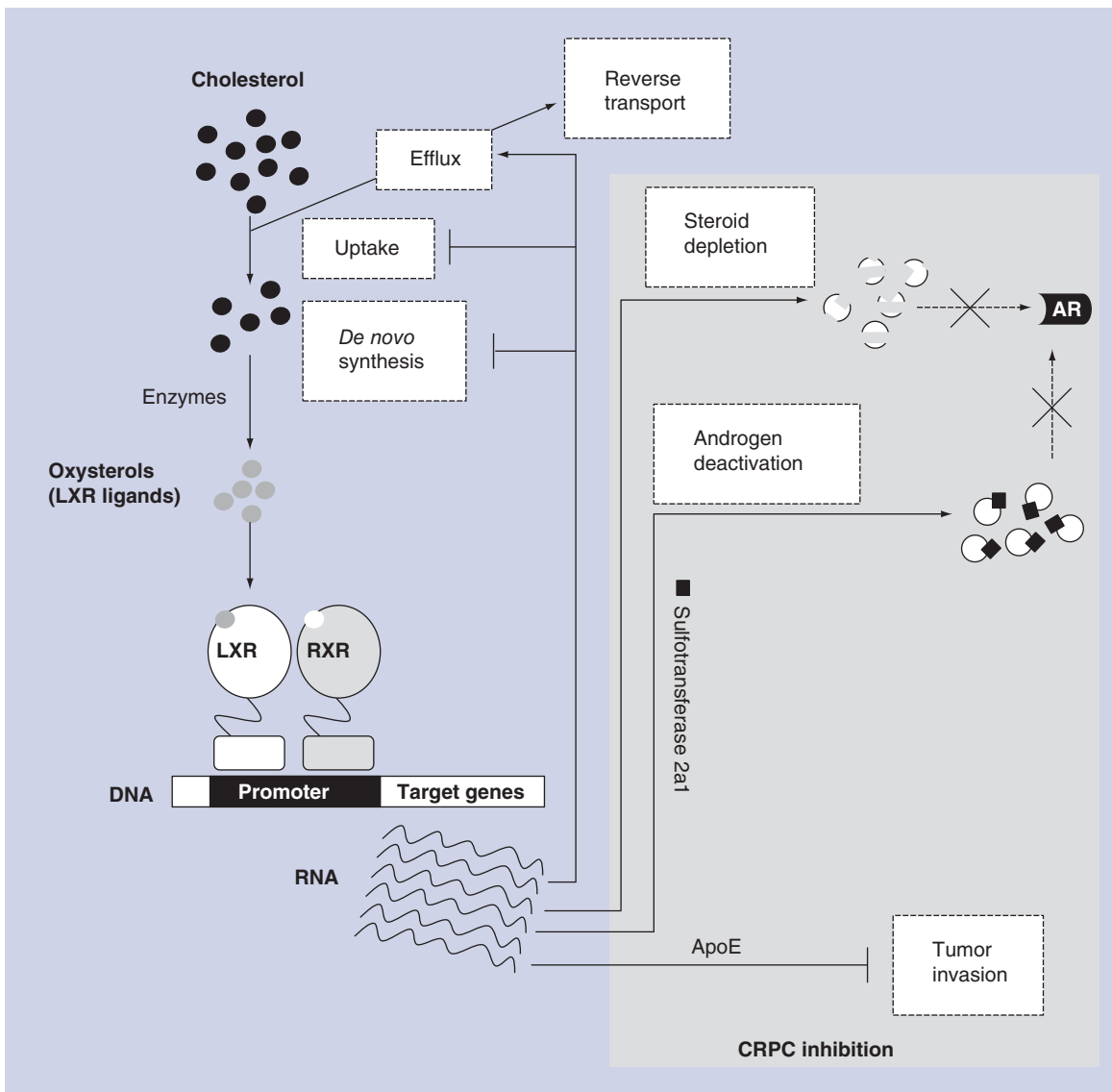


Figure 3. Liver X receptors and cancer: effect of liver X receptor activation on cholesterol concentration. LXRs efficiently reduce intracellular cholesterol levels through a diverse range of target genes. Considering emerging association between cholesterol and cancer, this first function could then provide a convincing explanation for involvement in tumor progression. This potential is even more relevant since LXRs can also affect androgen intracrine synthesis in prostate. Implication in prostate carcinogenesis inhibition could also affect functions totally independent of cholesterol as LXRs are able to regulate direct androgen degradation and metastatic spreading (ApoE dependent).

AR: Androgen receptor; CRPC: Castration-resistant prostate cancer; LXR: Liver X receptor; RXR: Retinoid X receptor.

Grant - ChoMeCaP (Canceropole Lyon Auvergne Rhone Alpes). J-MA Lobaccaro is Professor at the Université Blaise Pascal. The funders had no role in decision to publish or in the preparation of the manuscript. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or

entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

The authors deeply thank Pradeep Angus VAL (UMR GReD) for critically reading and editing the manuscript.

Executive summary

Lipids: biological functions & homeostasis regulation

- Fatty acids and cholesterol are important for cell membrane homeostasis and functioning.
- Two mechanisms regulate cholesterol uptake/efflux and synthesis: sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 2 and liver X receptors (LXRs). These two pathways have opposite effects as SREBP2 increases cholesterol synthesis and uptake while LXRs activate cholesterol efflux and inhibit its uptake.

Cholesterol level, prostate cancer & tumor progression

- As early as the beginning of the 1900s, cholesterol accumulation has been observed in solid tumors.
- Despite some controversy about the beneficial effects to regulate cholesterol concentration, numerous cellular models, transgenic and knock-out mice involving cholesterol-regulated genes, many dietary experiments and ultimately epidemiological analyses performed on dietary habits as well as statin-treated patients are clearly in favor of a positive role of excess cholesterol in solid tumor progression.
- The main issue is to understand if and how cholesterol could directly alter tumor progression, and to decipher the mechanisms underlying its enrichment and pro-carcinogenic role in a tumor context.

Could reduction of intratumor cholesterol concentration inhibit malignant properties?

- Blocking *de novo* synthesis reduces the incidence of prostate cancer in animal models and in epidemiological studies.
- Activating LXRs reduce prostate cancer development and progression in animal models.
- Statins and LXR activators have serious negative side effects.

Conclusion

- Screening selective liver X modulators is an essential perspective before any consideration of using LXR-dependent pharmacological treatment of prostatic adenocarcinoma.

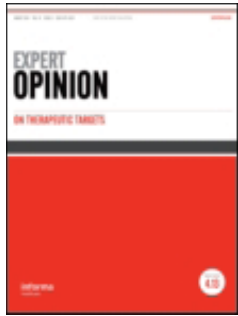
References

- 1 Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50(Suppl. 1), S9–S14 (2009).
- 2 Marsh D. Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* 1788(10), 2114–2123 (2009).
- 3 Sonnino S, Prinetti A. Membrane domains and the “lipid raft” concept. *Curr. Med. Chem.* 20(1), 4–21 (2013).
- 4 Grundy SM. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu. Rev. Nutr.* 3, 71–96 (1983).
- 5 Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191(4223), 150–154 (1976).
- 6 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232(4746), 34–47 (1986).
- 7 Holttä-Vuori M, Tanhuanpää K, Möbius W, Somerharju P, Ikonen E. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol. Biol. Cell* 13(9), 3107–3122 (2002).
- 8 Linder MD, Uronen RL, Holttä-Vuori M, Van Der Sluijs P, Peranen J, Ikonen E. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol. Biol. Cell* 18(1), 47–56 (2007).
- 9 Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150(3692), 19–28 (1965).
- 10 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343(6257), 425–430 (1990).
- 11 Rodwell VW, Nordstrom JL, Mitschelen JJ. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* 14, 1–74 (1976).
- 12 Bloch K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* 57(8), 378–383 (1992).
- 13 Chang TY, Chang CC, Cheng D. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 613–638 (1997).
- 14 Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21(5), 505–517 (1980).
- 15 De Bussac H, Pommier AJ, Dufour J *et al.* LXR, prostate cancer and cholesterol: the good, the bad and the ugly. *Am. J. Cancer Res.* 3(1), 58–69 (2013).
- 16 Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3), 331–340 (1997).
- 17 Hua X, Yokoyama C, Wu J *et al.* SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(24), 11603–11607 (1993).
- 18 Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL, Sakai J. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 272(19), 12778–12785 (1997).

- 19 Yang T, Espenshade PJ, Wright ME *et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110(4), 489–500 (2002).
- 20 Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(16), 6511–6518 (2007).
- 21 Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(16), 6519–6526 (2007).
- 22 Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275(42), 32379–32382 (2000).
- 23 Goldstein JL, Debose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124(1), 35–46 (2006).
- 24 Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J. Cell Sci.* 119(Pt 6), 973–976 (2006).
- 25 Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96(20), 11041–11048 (1999).
- 26 Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2), 139–148 (2002).
- 27 Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikstrom AC, Peltto-Huikko M, Gustafsson JA. OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92(6), 2096–2100 (1995).
- 28 Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9(9), 1033–1045 (1995).
- 29 Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383(6602), 728–731 (1996).
- 30 Williams S, Bledsoe RK, Collins JL *et al.* X-ray crystal structure of the liver X receptor beta ligand binding domain: regulation by a histidine-tryptophan switch. *J. Biol. Chem.* 278(29), 27138–27143 (2003).
- 31 Hoerer S, Schmid A, Heckel A, Budzinski RM, Nar H. Crystal structure of the human liver X receptor beta ligand-binding domain in complex with a synthetic agonist. *J. Mol. Biol.* 334(5), 853–861 (2003).
- 32 Alberti S, Schuster G, Parini P *et al.* Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107(5), 565–573 (2001).
- 33 Peet DJ, Turley SD, Ma W *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93(5), 693–704 (1998).
- 34 Zelcer N, Hong C, Boyadgian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325(5936), 100–104 (2009).
- 35 Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289(5484), 1524–1529 (2000).
- 36 Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(22), 12097–12102 (2000).
- 37 Wu JE, Basso F, Shamburek RD *et al.* Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 279(22), 22913–22925 (2004).
- 38 Yu L, York J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* 278(18), 15565–15570 (2003).
- 39 Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* 277(21), 18793–18800 (2002).
- 40 Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98(2), 507–512 (2001).
- 41 Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R *et al.* Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol. Endocrinol.* 21(5), 1014–1027 (2007).
- 42 Lee JH, Gong H, Khadem S *et al.* Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149(8), 3778–3788 (2008).
- 43 White C. The occurrence of crystals in tumors. *J. Pathol. Bacteriol.* 13, 3–10 (1909).
- 44 Swyer G. The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res.* 2, 372–375 (1942).
- 45 Magura L, Blanchard R, Hope B, Beal JR, Schwartz GG, Sahmoun AE. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 19(10), 1259–1266 (2008).
- 46 Mondul AM, Clipp SL, Helzlsouer KJ, Platz EA. Association between plasma total cholesterol concentration and incident prostate cancer in the CLUE II cohort. *Cancer Causes Control* 21(1), 61–68 (2010).
- 47 Platz EA, Till C, Goodman PJ *et al.* Men with low serum cholesterol have a lower risk of high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(11), 2807–2813 (2009).
- 48 Shafique K, McLoone P, Qureshi K, Leung H, Hart C, Morrison DS. Cholesterol and the risk of grade-specific prostate cancer incidence: Evidence from two large prospective cohort studies with up to 37 years' follow up. *BMC Cancer* 12, 25 (2012).
- 49 Dufour J, Viennois E, De Boussac H, Baron S, Lobaccaro JM. Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12(6), 724–728 (2012).

- 50 Huxley R. The impact of modifiable risk factors on mortality from prostate cancer in populations of the Asia-Pacific region. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 8(2), 199–205 (2007).
- 51 Batty GD, Kivimaki M, Clarke R, Davey Smith G, Shipley MJ. Modifiable risk factors for prostate cancer mortality in London: forty years of follow-up in the Whitehall study. *Cancer Causes Control* 22(2), 311–318 (2011).
- 52 Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M *et al.* Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 162(4), 318–325 (2005).
- 53 Boudreau DM, Yu O, Johnson J. Statin use and cancer risk: a comprehensive review. *Expert Opin. Drug Saf.* 9(4), 603–621 (2010).
- 54 Alonso DF, Farina HG, Skilton G, Gabri MR, De Lorenzo MS, Gomez DE. Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 50(1), 83–93 (1998).
- 55 Ukomadu C, Dutta A. Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J. Biol. Chem.* 278(7), 4840–4846 (2003).
- 56 Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K *et al.* Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15(2), 219–232 (2011).
- 57 Korade Z, Kenworthy AK. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55(8), 1265–1273 (2008).
- 58 Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and benign prostate disease. *Differentiation* 82(4–5), 244–252 (2011).
- 59 Freeman MR, Cinar B, Kim J *et al.* Transit of hormonal and EGF receptor-dependent signals through cholesterol-rich membranes. *Steroids* 72(2), 210–217 (2007).
- 60 Akaza H. Combined androgen blockade for prostate cancer: review of efficacy, safety and cost-effectiveness. *Cancer Sci.* 102(1), 51–56 (2011).
- 61 Jacobs EJ, Gapstur SM. Cholesterol and cancer: answers and new questions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(11), 2805–2806 (2009).
- 62 Egan A, Dong Y, Zhang H, Qi Y, Balk SP, Sartor O. Castration-resistant prostate cancer: adaptive responses in the androgen axis. *Cancer Treat. Rev.* 40(3), 426–433 (2014).
- 63 Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 360(1–2), 38–43 (2012).
- 64 Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86 (2013).
- 65 Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ *et al.* Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 108(4), 426–431 (2003).
- 66 Graziani SR, Igreja FA, Hegg R *et al.* Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol. Oncol.* 85(3), 493–497 (2002).
- 67 Azoulay S, Terry S, Chimingqi M *et al.* Comparative expression of Hedgehog ligands at different stages of prostate carcinoma progression. *J. Pathol.* 216(4), 460–470 (2008).
- 68 Ibuki N, Ghaffari M, Pandey M *et al.* TAK-441, a novel investigational smoothened antagonist, delays castration-resistant progression in prostate cancer by disrupting paracrine hedgehog signaling. *Int. J. Cancer* 133(8), 1955–1966 (2013).
- 69 Chen Y, Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int. J. Cancer* 91(1), 41–45 (2001).
- 70 Caruso MG, Notarnicola M, Santillo M, Cavallini A, Di Leo A. Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res.* 19(1A), 451–454 (1999).
- 71 Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 16(4), 508–519 (2002).
- 72 Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM, Weiss NS. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J. Urol.* 161(1), 152–155 (1999).
- 73 Pelton K, Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12(6), 751–759 (2012).
- 74 Patra SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1785(2), 182–206 (2008).
- 75 Karpen HE, Bukowski JT, Hughes T, Gratton JP, Sessa WC, Gailani MR. The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 276(22), 19503–19511 (2001).
- 76 Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62(8), 2227–2231 (2002).
- 77 Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Invest.* 115(4), 959–968 (2005).
- 78 Llaverias G, Danilo C, Wang Y *et al.* A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 177(6), 3180–3191 (2010).
- 79 Kim JH, Cox ME, Wasan KM. Effect of simvastatin on castration-resistant prostate cancer cells. *Lipids Health Dis.* 13, 56 (2014).
- 80 Zumsteg ZS, Zelefsky MJ. Short-term androgen deprivation therapy for patients with intermediate-risk prostate cancer undergoing dose-escalated radiotherapy: the standard of care? *Lancet Oncol.* 13(6), e259–e269 (2012).
- 81 Sharifi N. Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology* 154(11), 4010–4017 (2013).
- 82 Takayama K, Inoue S. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *Int. J. Urol.* 20(8), 756–768 (2013).

- 83 Culig Z. Androgen receptor cross-talk with cell signalling pathways. *Growth Factors* 22(3), 179–184 (2004).
- 84 Mostaghel EA, Nelson PS. Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22(2), 243–258 (2008).
- 85 Mitsiades N, Sung CC, Schultz N *et al.* Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Res.* 72(23), 6142–6152 (2012).
- 86 Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22(18), 2454–2472 (2008).
- 87 Xie J, Bartels CM, Barton SW, Gu D. Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments. *Onco. Targets Ther.* 6, 1425–1435 (2013).
- 88 Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *Int. J. Mol. Sci.* 14(7), 13979–14007 (2013).
- 89 Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B *et al.* Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with Sonic Hedgehog-GLI1 signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(34), 12561–12566 (2004).
- 90 Sheng T, Li C, Zhang X *et al.* Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol. Cancer* 3, 29 (2004).
- 91 Efsthathiou E, Karlou M, Wen S *et al.* Integrated Hedgehog signaling is induced following castration in human and murine prostate cancers. *Prostate* 73(2), 153–161 (2013).
- 92 Riobo NA. Cholesterol and its derivatives in Sonic Hedgehog signaling and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12(6), 736–741 (2012).
- 93 Pepinsky RB, Zeng C, Wen D *et al.* Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273(22), 14037–14045 (1998).
- 94 Stottmann RW, Turbe-Doan A, Tran P *et al.* Cholesterol metabolism is required for intracellular hedgehog signal transduction in vivo. *PLoS Genet.* 7(9), e1002224 (2011).
- 95 Queiroz KC, Tio RA, Zeebregts CJ *et al.* Human plasma very low density lipoprotein carries Indian hedgehog. *J. Proteome Res.* 9(11), 6052–6059 (2010).
- 96 Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 29(12), 1346–1348 (1976).
- 97 Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am. J. Cardiol.* 62(15), J10–J15 (1988).
- 98 Pharoah PD, Hollingworth W. Cost effectiveness of lowering cholesterol concentration with statins in patients with and without pre-existing coronary heart disease: life table method applied to health authority population. *BMJ* 312(7044), 1443–1448 (1996).
- 99 Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol. Res.* 88C, 3–11 (2014).
- 100 Roy M, Kung HJ, Ghosh PM. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am. J. Cancer Res.* 1(4), 542–561 (2011).
- 101 Holschermann H, Schuster D, Parviz B, Haberbosch W, Tillmanns H, Muth H. Statins prevent NF-kappaB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 185(2), 240–245 (2006).
- 102 Dufour J, Pommier A, Alves G *et al.* Lack of liver X receptors leads to cell proliferation in a model of mouse dorsal prostate epithelial cell. *PLoS ONE* 8(3), e58876 (2013).
- 103 Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chu CP, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64(21), 7686–7689 (2004).
- 104 Pommier AJ, Alves G, Viennois E *et al.* Liver X receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29(18), 2712–2723 (2010).
- 105 Pommier AJ, Dufour J, Alves G *et al.* Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* 9(5), e1003483 (2013).
- 106 Pencheva N, Buss CG, Posada J, Merghoub T, Tavazoie SF. Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation. *Cell* 156(5), 986–1001 (2014).
- 107 Katz A, Udata C, Ott E *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J. Clin. Pharmacol.* 49(6), 643–649 (2009).
- 108 Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol. Cell. Endocrinol.* 351(2), 129–141 (2012).
- 109 Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D *et al.* Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat. Med.* 16(1), 98–105 (2010).



Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions

Hugues De Boussac, Anthony Alioui, Emilie Viennois, Julie Dufour, Amalia Trousson, Aurélie Vega, Laurent Guy, David H Volle, Jean-Marc A. Lobaccaro & Silvère Baron

To cite this article: Hugues De Boussac, Anthony Alioui, Emilie Viennois, Julie Dufour, Amalia Trousson, Aurélie Vega, Laurent Guy, David H Volle, Jean-Marc A. Lobaccaro & Silvère Baron (2013) Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 17:9, 1029-1038, DOI: [10.1517/14728222.2013.820708](https://doi.org/10.1517/14728222.2013.820708)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2013.820708>



Published online: 22 Jul 2013.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 324



View related articles [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

EXPERT OPINION

1. Oxysterols, liver X receptors, and cholesterol homeostasis
2. LXRs and cancer: preamble
3. LXRs and cancer: current knowledge
4. Dual role of LXRs in cancer: the yin-yang concept in antitumor response
5. Conclusion
6. Expert opinion

informa
healthcare

Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions

Hugues De Boussac, Anthony Alioui, Emilie Viennois, Julie Dufour, Amalia Trousson, Aurélie Vega, Laurent Guy, David H Volle, Jean-Marc A. Lobaccaro & Silvere Baron[†]

[†]Laboratoire GRéD, UMR CNRS 6293-Clermont Université-INSERM U1103, Aubière Cedex, France

Introduction: Oxysterols are implicated in various cellular processes. Among their target proteins, liver X receptors (LXRs) α and β modulate the cell cycle in a large range of cancer cell lines. Besides their role as cholesterol sensors, LXRs are also involved in the proliferation/apoptosis balance regulation in various types of cancers.

Areas covered: This review covers oxysterols and derivatives of cholesterol as well as synthetic or natural ligands (agonist/antagonist) of LXRs. Most tumor cell lines are sensitive to LXR activation. Indeed various cancers are concerned such as prostate, breast, glioblastoma, colorectal, and ovary tumors, and leukemia.

Expert opinion: Developing the use of LXR ligands in human health, especially in the field of cancer, represents a novel and promising strategy. Despite a wide spectrum of applications, numerous adverse effects of LXR activation need to be solved before genuine clinical trials in humans. Future directions will be based on the engineering of selective LXRs modulators (SLiMs) as already done for nuclear steroid receptors.

Keywords: Cancer therapy, cholesterol homeostasis, liver X receptors, oxysterols

Expert Opin. Ther. Targets (2013) 17(9):1029-1038

1. Oxysterols, liver X receptors, and cholesterol homeostasis

Oxysterols are naturally oxidized metabolites of cholesterol and correspond to hydroxy, keto, hydroperoxy, epoxy, and carboxy derivatives. These compounds are generated through autoxidation like 7-ketocholesterol (7-KC), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC), or through enzymatic reactions within the tissue such as 24(S)-, 25-, or 27-OHC. They remain accumulated at very low levels compared to cholesterol itself. Oxysterols exert pleiotropic actions into the cell that could be divided into three categories: membrane dynamics, protein interactions, and nuclear receptor binding (Figure 1) [1-3]. First, oxysterols insert in cell membranes by their lipophilic properties and modulate membrane fluidity [4-6]. By this way, oxysterols modify activity of resident proteins of the plasma membrane, change permeability of lipid bilayer to specific compounds, and finally could interfere with lipid raft structure [7-9]. Second, oxysterols interact with various proteins into the cell, they regulate sterol response element binding protein (SREBP) function by binding to insulin-induced gene (INSIG) proteins [10], control sterol biosynthesis [11,12], interfere with Hedgehog signaling [13-15], and bind key proteins involved in cholesterol metabolism such as Niemann-Pick C1 (NPC1) [16,17] and oxysterol-binding protein family (OSBP/ORP) [18]. Third, oxysterols have also been identified as signaling molecules as they could bind to receptors. To date, oxysterols have been demonstrated to bind and activate various nuclear receptors such as RORs

Article highlights.

- Natural oxysterols and synthetic agonists control cell proliferation through the modulation of LXR activity. Several cellular processes are affected.
- Inhibition of cell multiplication by LXRs has been demonstrated in established cancer cell cultures. In few cases, mice models showed the efficacy of LXR agonists in reducing the tumor growth.
- Ligand activation of LXRs leads to a paradoxical situation *in vivo*: slowing down of cancer progression and inhibition of the immune system. This could ultimately lead to an escape of the immunomodulation of the cancer progression.
- LXRs are promising pharmacological targets in the field of cancer treatment. However, limitations should be overpassed before using SLiMs in patients.

This box summarizes key points contained in the article.

(RAR-related orphan receptors, NR1F1, 2 and 3) [19,20], FXR (farnesoid X receptor, NR1H4) [21], PXR (pregnane X receptor, NR1I2) [22-24], ERs (estrogen receptors, NR3A1 and NR3A2) [25,26], and LXRs (liver X receptors, NR1H2 and 3) [27-29]. Since LXRs have been proved to be *in vivo* the *bona fide* targets of oxysterols, they are considered as the “canonical” receptors for oxysterols. This review thus focuses on the current state of knowledge regarding LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) implication in cancer.

LXRs are receptors that belong to the nuclear receptor superfamily. Both isoforms share a high identity up to 80% in human and mouse, especially in the ligand-binding domain [30]. These receptors heterodimerize with their prerequisite partner retinoid X receptor (RXR, NR2B1, 2, and 3), and bind oxysterols in their hydrophobic ligand-binding pocket [31]. The two LXR isoforms are differentially distributed [27]. Transgenic mice lacking LXR α and/or β [32,33], and synthetic modulators of their activity as T0901317 [34] and GW3965 [35] have been extensively used to investigate physiological role of these receptors throughout the organism, their transcriptional target genes and their potential involvement in pathological troubles and diseases. One of the major and initially identified functions of LXRs regards cholesterol homeostasis [32]. They stimulate the cell cholesterol efflux to their extracellular acceptor HDL, supported reverse cholesterol transport, by inducing the expression of the ABC transporter genes *ABCA1* and *ABCG1* [33,36-38], or export sterols from hepatocytes or enterocytes via the induction of *ABCG5/ABCG8* [39-41]. They can block the uptake of circulating low-density level particles (LDL) by inducing the expression of *Idol* whose product mediates the degradation of the LDL receptor (LDLR) in mouse and human [42]. Additionally, LXRs exhibit other tissue-specific control mechanism of cholesterol. Indeed, cholesterol is a precursor of numerous metabolic pathways and their modulation could modify

cholesterol amount into the cell. In mouse liver, LXR α controls *Cyp7a1* expression and therefore cholesterol catabolism through bile acid secretion [32]. In adrenal [43] and testis [44] LXRs have been demonstrated to modulate the production of steroids by controlling the expression of genes encoding key players of steroidogenesis such as *StAR* and *Cyp11a1* [43,44]. In parallel, LXRs have been recently reported to be associated with a decrease of *Sts* gene expression encoding a steroid-sulfatase and an increase of *Sult2a1* expression encoding sulfotransferase 2A1, respectively involved in hepatic anabolism and catabolism of androgens. Indeed, transgenic expression of a constitutive form of LXR α (LXR α -VP16) in the liver leads to impaired circulating testosterone levels [45]. Altogether, activation of LXRs thus leads to the diminution of the intracellular pool of cholesterol. Since the first description of their involvement in cholesterol homeostasis by Peet *et al.* [32]. LXRs have been associated with various other functions such as fatty acid homeostasis, steroidogenesis (as mentioned above), glucose homeostasis [46-48], inflammation [49], and immunity [50].

2. LXRs and cancer: preamble

LXRs clearly have the potential to inhibit the proliferation of multiple cancer cell lines from prostate, breast, liver, lung, cervical, epidermis, skin melanoma, bone and squamous carcinoma [51], as well as leukemia T cells (Figure 2) [52]. Altogether this activity on various tumor cells suggests a global and ubiquitous effect of LXRs on proliferation and apoptosis, not only on cells with a tumor origin. On that line, Dufour *et al.* indeed recently demonstrated that LXR activation decreases the proliferation of non-tumor prostate epithelial cells [53], which leans toward a general effect of LXRs on cell cycle control. Another potential important role of LXRs in cancer development is the ability of these receptors to reduce angiogenesis and therefore invasion of cancer cells by impairing both localization and signaling of vascular endothelial growth factor 2 (VEGF-2) *in vitro* and *in vivo* [54].

3. LXRs and cancer: current knowledge

First, LXRs are thus potential pharmacological targets in cancer development despite that it is noteworthy LXR-deficient mice are not prone to develop specific cancers. This fact points out that both LXRs cannot be considered as anti-oncogenes. Second, the majority of the works have been done on established cancer cell lines while few *in vivo*. The present review aggregates current knowledge of the effect of LXRs in various cancers.

3.1 Colorectal cancer

Colorectal cancer is respectively the second and the third cancer diagnosed in female and male. Multiple risk factors exist such as genetics, obesity and diet, and particularly high fat intake. Moreover, retrospective study on the effect of statin

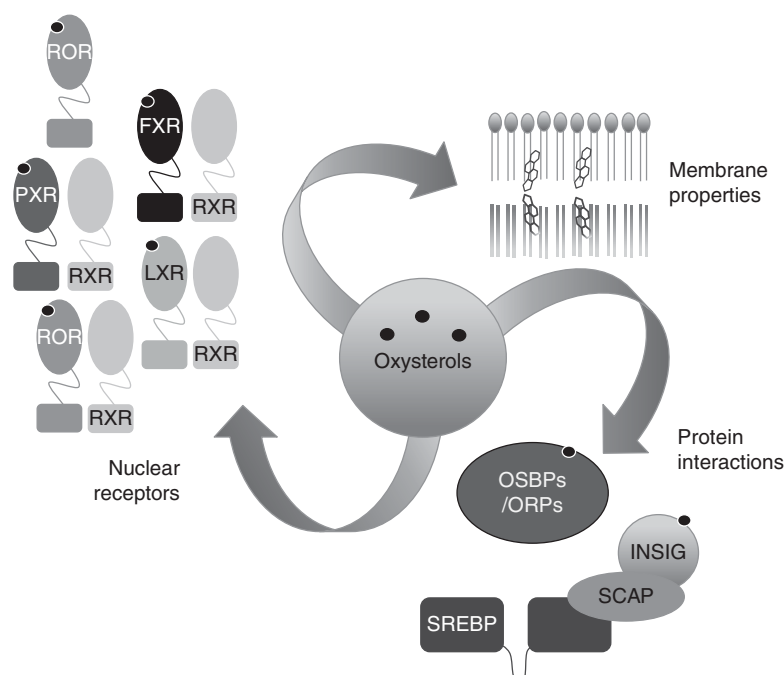


Figure 1. Cell targets of oxysterols. Oxidized derivatives of cholesterol, known as oxysterols, could target i) cellular membrane, and modify its fluidity; ii) proteins such as OSBPs/ORPs or INSIG, which will block SREBP to the reticulum membrane; iii) various nuclear receptors. Among them, liver X receptors (LXRs) are the *bona fide* receptors *in vivo*. Most of them are heterodimerized with RXR while ROR could also bind DNA as monomere.

FXR: Farnesoid X receptor; INSIG: Insulin-induced gene; LXR: Liver X receptor; ORP: OSBP-related protein; OSBP: oxysterol-binding protein; PXR: Pregnane X receptor; ROR: Retinoic acid-related orphan receptor; RXR: Retinoid X receptor; SCAP: SREBP cleavage-activating protein; SREBP: Sterol regulatory element binding protein.

treatment on cancer development showed a correlation between depletion of cholesterol by these drugs and a decreased risk in developing colorectal cancer [55]. Considering LXRs in the control of cholesterol metabolism, an association between colorectal cancer and LXR activity has been logically suspected. Uno *et al.* were the first to investigate that potential link. They demonstrated in colorectal cancer cell line HCT116 that LXR activation was sufficient to inhibit the accumulation of *c-MYC*, *MMP7* or *BMP4*, three targets of the pro-oncogenic β -catenin signaling pathway [56]. This observation is highly significant since colorectal cancer has often been associated with an abnormal accumulation of β -catenin [57]. Logan and Nusse postulated that the observed downregulation of β -catenin activity was consecutive of a direct binding of activated LXRs on the β -catenin, rather than a phosphorylation or a degradation of β -catenin. In parallel, a slow proliferation rate of the human HCT116 cancer cell line was observed after the activation of LXRs by the synthetic agonist T0901317 [56]. Similar anti-proliferative effects of LXRs were observed in the two human colorectal cancer cell lines colo205 and HCT116 [58]. Activation of LXRs by the synthetic agonist GW3965 inhibits the expression of cell cycle gene such as *SKP2* and *c-MYC*, and reduces the amount of the inactive/phosphorylated form of Rb (Retinoblastoma)

protein, a negative modulator of E2F involved in restriction point overcome. Finally, the activation of LXRs in wild-type mice is followed by a significant decrease in intestinal proliferation although no correlation was demonstrated between this decrease and the observation made on the cell cycle in colorectal cancer cell lines. However *Lxr* deficient mice exhibit an increase in intestinal proliferation compared to wild-type mice, highlighting the potential role of LXRs *per se* in intestinal epithelium proliferation [58]. Finally, Lo Sasso *et al.* elegantly demonstrated the positive role of LXR α on the colorectal cancer mouse model APC^{min/+} [59]. They observed that LXR activation as well as constitutive transcriptional active form of LXR α (LXR α -VP16) overexpression blocks the cell cycle at G1/G0 phase in the human colorectal cancer cell line HT29, paralleled with an accumulation of cyclin D1 and SKP2, and the induction of a caspase-dependent apoptosis [59]. Interestingly, xenografted mice with HT29 cells showed a decreased tumor growth and increased apoptosis cells when the tumor was infected with an adenovirus containing LXR α -VP16. Chemically induction of colitis carcinogenesis by dextran sulfate sodium and azoxymethane was less efficient in mice overexpressing LXR α -VP16 in intestine. Additionally, Lo Sasso *et al.* observed a decrease in tumor number in siblings of APC^{min/+} crossed

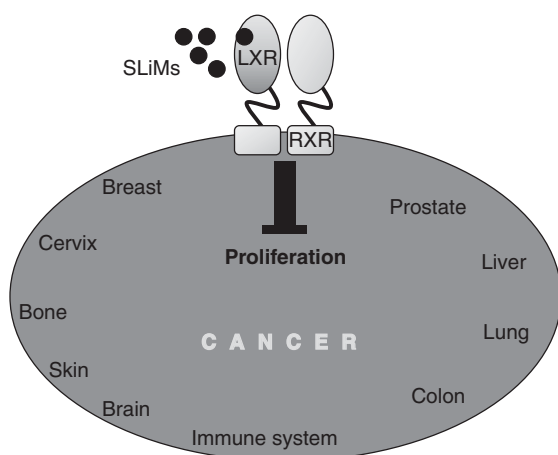


Figure 2. Target tissues where LXR–RXR has been shown to modulate cancer cell proliferation.

LXR: Liver X receptor; RXR: Retinoid X receptor; SLiMs: Selective liver X receptor modulators.

with LXR α -VP16 [59]. In human, no LXR SNP has been associated with the risk of developing colon cancer so far.

3.2 Ovarian cancer

Ovarian cancer is a relatively rare disease, and according to cancer statistics published by NCI's SEER Cancer Statistics Review, 1 in 72 women born today will be diagnosed with it. Once again a link exists between cholesterol and this cancer since, as for other cancers, statin treatment decreases the incidence of this cancer [60]. Interestingly the potential role of LXRs in this condition has been only recently investigated, and solely *ex vivo*. Activation of LXRs by T0901317 inhibits the proliferation of ovarian cancer cell lines OVCAR3, SKOV3, and CaOV3 in a dose-dependent manner [61]. Besides, T0901317 reverses the pro-proliferative effect of oxLDL on these cell lines. Rough *et al.* [62] showed that this effect was through the induction of cell cycle inhibitors p21 and p27, reduction in phospho-Rb protein levels and consequent cell cycle arrest in G1/G0, associated with an increase in apoptosis and in the expression of the pro-apoptotic factors Bax and Caspase 3. They also pointed out the putative role of FXR α (NR1H4) that could also be activated by oxysterols in cell culture. The role of FXR α is in accordance with previous published data on the role of the FXR agonist apomine on ovarian cancer development [63]. However Miller *et al.* [64] found contradictory results as T0901317 reverses the effect of cisplatin on IGROV-1, OVCAR-8, and A2780 ovarian cancer cell lines. The authors explained this discrepancy by the fact that less T0901317 was used in their study. Finally, further *ex vivo* and *in vivo* investigations need to be done to clarify the impact of LXR activation on ovary cancer.

3.3 Breast cancer

Approximately 10% of women will be diagnosed with a breast cancer in the future according to NCI's SEER Cancer Statistics Review. Its development has been associated with cholesterol, and a meta-analysis study showed that the use of cholesterol-lowering agents reduces this risk [65]. The potential anti-proliferative effect of LXRs on breast cancer has been investigated by various groups [66–68]. The studies were very promising and the mechanism of cell cycle arrest was further investigated in MCF7 and potentially correlated with the depletion of intracellular and membrane associated cholesterol due to an upregulation of ABCG1 [66–68].

The effect of LXRs seems partially dependent on ER α since LXR activation has been shown to have less pronounced effect on cell cycle arrest in the ER α -negative cells MDA-MB231 and SK-BR3 than in MCF7 and T47D, both ER α -positive cell lines. The presence of an ER α inhibitor reduces the effects of LXR ligands. LXRs act on the reduction of SKP2, CYCLIN A2, CYCLIN D1, ER α and Phospho RB protein levels, and on the increase of p53 protein [69]. Interestingly, Gong *et al.* [70], showed that estrogen sulfotransferase (*EST* or *SULT1E1*), an enzyme that deactivates estrogen, is under the positive modulation of LXRs in the liver *in vivo*; this linked the potential tumor suppressor role of LXRs in breast cancer and their effects on estrogen availability. Hence activating LXRs could potentially decrease estrogen-dependent tumor growth, as well as induce cell cycle arrest and apoptosis of the tumor cells, altogether leading to a decrease in the tumor size. However, as for ovarian cancer, *in vivo* validation is necessary.

3.4 Gallbladder cancer

Gallbladder cancer is far to be the most studied and the most frequent tumor. Its incidence is dependent on the geographical location: only 3/100,000 per year in US, while it increases dramatically in South America, India, China, or Central Europe. This cancer is much more frequent in women [71]. Gabbi *et al.* in 2010 investigated the potential link between LXRs and this cancer. The authors observed that mouse females lacking LXR β spontaneously develop gallbladder cancer [72]. Furthermore, inflammation increases in adenomas of Lxr β ^{-/-}. Interestingly, ovariectomized Lxr β ^{-/-} mice do not develop gallbladder cancer suggesting a dependency and a pro-oncogenic activity of estrogens in this process. Lxr α ^{-/-} or Lxr α ^{-/-} mice seem protected from this tumor, therefore suggesting a LXR β -specific activity within the gallbladder.

3.5 Prostate cancer

Prostate cancer is the second cause of death from cancer in male, and it is considered that one in six men born today will be diagnosed with this condition. The correlation between prostate cancer and cholesterol is not new and multiple studies describe the negative role of cholesterol as well as the positive effect of statin treatment in its development [73].

Historically the first study linking LXRs and prostate cancer was published by Fukuchi *et al.* in 2004 [67]. The authors reported that activation of LXRs by T0901317 in LNCaP prostate cancer cell line induces a G1/G0 phase cycle arrest. This effect was mediated by a decrease in SKP2 accumulation, associated with a reduction in p27^{Kip1} degradation. The potential effect of LXRs on tumor growth was finally showed *in vivo* [67]. In another set of experiments, the same group demonstrated that androgens inhibit the expression of ABCA1 responsible for the export of cholesterol in cells [74]. Interestingly, oral treatment with T0901317 delays the tumor growth and the progression from androgen-dependent to androgen-independent state [75]. It is well known that androgen status is essential in prostate cancer progression. Hence, Lee *et al.* observed that activated LXRs inhibit androgen-dependent prostate regeneration after castration. More importantly, LXRs significantly decrease the amount of circulating testosterone [45] by the induction of *Sult2A1* and the decrease of *Sts*, encoding two enzymes involved respectively in androgen inactivation and androgen reactivation [45]. LXRs may also affect the prostate physiology by lowering the amount of circulating testosterone [76].

Various scenarios have been proposed to explain the action of LXRs on cell cycle and apoptosis, and the fact that ABC transporters were connected to LNCaP cell proliferation. Pommier *et al.* pointed out that treatment of LNCaP cells with T0901317 induces apoptosis and inhibits the AKT survival pathway *in vivo* [77]. Actually tumor is deprived in cholesterol due to the overexpression of the export pump ABCG1. The decrease of intracellular and membrane cholesterol ultimately reduces the amount and the size of membrane lipid rafts, and therefore inhibits the AKT survival pathway, inducing apoptosis [77]. Considering the importance of the AKT pathway in prostate cancer, this result pleads in favor of a treatment targeting both LXR and AKT pathway [78]. No study was however available regarding the effect of the lack of LXRs on prostate physiology *in vivo*. To study the connection between cholesterol and prostate development, Pommier *et al.* fed the mice a cholesterol-enriched diet. *Lxrαβ*^{-/-} mice develop prostatic intra-epithelial neoplasia while wild types do not [79]. This phenotype was associated with the down-modulation of anti-oncogenic factors *Nkx3.1* and *Msmb*, whereas pro-oncogenic factors, such as *CyclinD1* and *CyclinD2*, were overexpressed. The *primus movens* seems to be the increase of the accumulation of the histone methyltransferase EZH2, which epigenetically represses *Nkx3.1* and *Msmb* expression [79]. This study enlightens for the first time the protective role of LXRs in the initial stages of prostate cancer.

3.6 Glioblastoma

Glioblastoma is a relatively rare cancer in global population with approximately 1 in 100,000 new cases per year, but it is still the most aggressive and the most frequent brain tumor. Guo *et al.* [80] demonstrated that glioblastoma cell growth is

dependent on the presence of extracellular cholesterol. Activation of LXRs in these cells leads to intracellular cholesterol deprivation, due to the induction of *IDOL* and the concomitant degradation of the LDLR. Glioblastoma cells thus died *via* an impairment of the epidermal growth factor receptor/AKT/SREBP1/LDLR pathway. Using xenografted mice, the authors finally confirmed *in vivo* that a LXR ligand reduces tumor growth and promotes cell death. More importantly they correlated the AKT/phosphoinositide 3-kinase activation with a LDLR-increased expression in clinical samples of glioblastoma, emphasizing the clinical relevance of these results for subsequent treatments as pointed by Moschetta [81].

3.7 Cancer of immune system cells

Leukemia is a very common cancer, equivalently in men and women worldwide, and encompasses multiple cancers affecting the immune system. B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent leukemia found in Western countries. Survival of B cells is highly dependent on the presence of various cytokines since these cells enter into apoptosis when no cytokine is added in the media. B cells from CLL are characterized by their resistance to apoptosis. According to the role of LXRs in controlling immune system and their action on the expression of various cytokines in lymphocytes, Geyeregger *et al.* investigated how LXRs could affect T- and B-cell survival [82]. LXR activation inhibits interleukin induction of T-cell proliferation, without increasing their apoptosis. Furthermore, the authors highlighted that LXR ligands block cell cycle progression of T lymphocytes at the G1 phase and promote early apoptosis of B cells from CLL patients. Altogether, results of this study suggest that LXR could be important either in immunotherapy to prevent allograft rejection by modulating the amount of T lymphocytes, or in leukemia by inducing death of B cells.

4. Dual role of LXRs in cancer: the yin-yang concept in antitumor response

LXRs and the immune system is an old story [49,50] as activation of LXRs has been shown to decrease the inflammation. The potential role of LXR activity in a tumor context has recently been extensively investigated by Villablanca *et al.* [83]. The authors have shown that various tumors produce oxysterols. These can activate LXRα and increase the level of ABCG1 as well as inhibit the accumulation of C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) in dendritic cells. This lower level of CCR7 impairs dendritic cell migration to the lymph nodes and T-cell priming [83]. Interestingly, the authors inhibited *in vivo* cholesterol synthesis with zaragozic acid, a specific inhibitor of the squalene synthase, and tumor growth was delayed. Furthermore tumors overexpressing *SULT2B1b*, an enzyme that inactivates oxysterols by sulfurylation, were rejected in 60% of mice compared to control tumor. These mice showed a better survival, correlated with a functional immune system [83]. The authors further demonstrated that

these mice successfully controlled wild-type tumor growth by regaining dendritic cell migration to tumor-draining lymph nodes and by developing over inflammation within tumors, suggesting a long-lasting immune response. T0901317 treatment of *SULT2B1b* tumor in mice partially decreases the beneficial effect of oxysterol inactivation on tumor growth. Lastly, *Lxr α* ^{-/-} bone marrow-transplanted mice were able to control more efficiently tumor growth than the wild-type bone marrow-transplanted mice. Altogether activation of LXR α by tumor-produced oxysterols inhibits CCR7 expression and dendritic cell migration to the lymph nodes. Consequently, antitumor T cells are less activated and therefore less efficient to promote tumor rejection [83]. The main finding of that study was that endogenous LXR activators produced by tumors themselves can inhibit antitumor immune response. Zaragozic acid permits to reduce oxysterol production by the tumor and therefore increases antitumor immune response. If statins have been shown to decrease the immune response, they could also inhibit the levels of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate, important signaling molecules for tumor growth [83].

5. Conclusion

The present review points out LXRs as relevant targets for cancer therapy in humans, although knowledge of LXR involvement in the cancer field mostly comes from cell line studies. Challenging such findings on *in vivo* models represents the first step toward potential use in humans. Investigations conducted in a colon cancer mice model are a good example of trail to follow [59]. To conclude, targeting cholesterol homeostasis to fight cancer development represents a promising strategy since this molecule is a key metabolic crossroad into the cell. In this way, LXRs are putative good candidates because of their properties of inducible transcription factor, which implies to find specific ligands.

6. Expert opinion

Based on what is known about LXRs and the cell cycle of cancer cells, the use of LXR modulating molecules is attractive for therapy. However, identified barriers need to be overcome for future therapeutic trials.

6.1 Can LXR ligands be used in human health?

The use of LXR ligands in human is a complex question that needs considering the subtle equilibrium between benefic and adverse effects of such treatment [30]. In patients suffering of advanced cancer with a narrow therapeutic panel, targeting LXRs could represent a relevant trail. To date, LXR agonist treatment has not been used in human disease. Although this therapeutic option has been extensively studied for its strong hypocholesterolemic potential, numerous side effects presently prevent the use of the currently developed LXR agonists. The major problem is the hepatic activation of genes

involved in fatty acid synthesis [84], which secondly increases the circulating blood triglycerides. Using chronically such drugs in human could lead to hepatic damages and deep metabolic disorders. Extensive efforts have been made to develop ligands that reduce this impact on the liver. So far, clinical trials using these LXR agonists have been unsuccessful. LXR623, a specific LXR agonist, strongly enhances accumulation of ABCA1 and ABCG1 that sustains cholesterol efflux without inducing a hypertriglyceridemia; unfortunately, its use in non-affected men leads to neurological troubles [85,86]. Nevertheless, research on selective liver X receptor modulators (SLiMs) such as YT32 [87] or GW6340 [88] needs to be carried on since this strategy is still promising. Moreover, development of LXR ligands for human health extends beyond cancer therapy as LXRs have been identified as drugable targets in other pathologies such as X-linked adrenoleukodystrophy [89], Alzheimer's disease [90-93] or pathologies affecting myelin development [94,95].

6.2 Are LXRs relevant therapeutic targets in cancer?

Most of the studies cited in this review demonstrate the antiproliferative effects of LXR agonists. The concept of using these molecules for cancer therapy is thus very attractive. Xenografts and cell culture experiments support the antitumor properties of LXRs [75,77]. However, they also present a biased approach since, in both cases, immune system was absent or impaired. Indeed, as already shown, LXR stimulation inhibits dendritic cell recruitment in tumor through the inhibition of *Ccr7* expression [83]. This action paradoxically enhances the tumor growth by decreasing the antigen processing and presentation to the immune system. This phenomenon results from endogenous production of oxysterols [83]. To get rid off that negative effect, a treatment activating the immune system could be considered before giving a LXR agonist in order to limit the inhibition of dendritic cell activity. Indeed, as described by Villablanca *et al.* [83], LXR activation only limits the first steps of the immune response but will have no effect if a preliminary T-cell activation occurred. Finally, the two opposite activities of LXRs in cancer, that is, proliferation *vs.* immune depression, need to be carefully addressed by *in vitro* and *in vivo* approaches in order to tune these adverse paradigms.

6.3 What about the putative interactions with the neurologic/endocrine functions?

Besides their activity in proliferation/apoptosis balance regulation, LXRs have pleiotropic physiological roles in endocrine processes [96] and nervous system physiology [24]. As LXRs regulate glucocorticoid [43], androgen [44] and estrogen synthesis [97], it could be hypothesized that a non-specific and 'pan-agonist' LXR ligand would enhance the production of steroids that should be deleterious in cases of breast or prostate cancer. Furthermore, emerging role of LXRs rises from studies done on peripheral and central nervous systems. Since

the blood–brain barrier efficiently prevents cholesterol uptake from the circulation, *de novo* synthesis is responsible for the main need of cholesterol in the brain [93]. As enlightened by LXR623 ligand that induced neurological troubles in treated men, non-specific LXR ligand could have dramatic secondary effects. Once again, the development of SLiMs seems mandatory before any use in cancer and more largely in human diseases. As for YT32 or GW6340 (see above), which probably do not cross the basolateral intestine barrier, blood–brain as well as blood–testis barriers could be used as a way to prevent any contact between the LXR agonists and the brain and the testis, even though in this organ Leydig cells, which produces testosterone, would not be isolated.

Another possibility would be to use a vector-mediated drug delivery to the tumors. This however needs to have specific markers of tissue-specificity. Prostate-specific membrane antigen is an ideal target for prostate cancer; indeed, it is nearly only expressed in prostate cancer and the levels of expression greatly increase with grade, stage, and hormonal therapy [98]. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) could be targeted to deliver specific LXR agonists to breast or ovarian cancers [99]. Using trastuzumab has already been proved to efficiently deliver drugs to HER2-positive breast and prostate tumors [100,101]. A tremendous work of chemistry will have

before to be done in order to test that the modifications added to target the tissue will not modify both isoforms and tissue specificities of the SLiMs. A long way thus before targeting LXRs in cancers!

Acknowledgements

We thank PA Val (UMR GReD, Aubière, France) for his help in manuscript editing and fruitful scientific discussions.

Declaration of interest

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligues Allier et Puy-de-Dôme contre le Cancer, Fondation ARC de recherche contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas research grants. HD Boussac was funded by Région Auvergne Programme Nouveau Chercheur; E Viennois was funded by Région Auvergne, Fond Européen de Développement Regional (FEDER) and Fondation ARC; J Dufour was funded by Ministry of Education, Research and Technology (MNERT) and Fondation ARC. The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Björkhem I, Diczfalussy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:734-42
- Javitt NB. Oxysterols: novel biologic roles for the 21st century. *Steroids* 2008;73:149-57
- Schroepfer GJ. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 2000;80:361-554
- Rooney MW, Yachnin S, Kucuk O, et al. Oxygenated cholesterol synergistically immobilize acyl chains and enhance protein helical structure in human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1985;820:33-9
- Kucuk O, Stoner-Picking J, Yachnin S, et al. Inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity by oxysterols. *Cell Immunol* 1992;139:541-9
- Vejux A, Guyot S, Montange T, et al. Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *J Nutr Biochem* 2009;20:45-61
- Moog C, Deloulme JC, Baudier J, et al. Membrane-related oxysterol function: preliminary results on the modification of protein kinase C activity and substrate phosphorylation by 7 beta,25-dihydroxycholesterol. *Biochimie* 1991;73:1321-6
- Duran MJ, Pierre SV, Lesnik P, et al. 7-ketocholesterol inhibits Na,K-ATPase activity by decreasing expression of its α 1-subunit and membrane fluidity in human endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2010;56(Suppl):OL1434-41
- Ragot K, Mackrill JJ, Zarrouk A, et al. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem Pharmacol* 2013;doi:10.1016/j.bcp.2013.02.028
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006;124:35-46
- Janowski BA, Shan B, Russell DW. The hypocholesterolemic agent LY295427 reverses suppression of sterol regulatory element-binding protein processing mediated by oxysterols. *J Biol Chem* 2001;276:45408-16
- Mark M, Muller P, Maier R, et al. Effects of a novel 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitor on the regulation of cholesterol biosynthesis in HepG2 cells. *J Lipid Res* 1996;37:148-58
- Corcoran RB, Scott MP. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8408-13
- Dwyer JR, Sever N, Carlson M, et al. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2007;282:8959-68
- Jeong J, McMahon AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest* 2002;110:591-6
- Infante RE, Abi-Mosleh L, Radhakrishnan A, et al. Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein. *J Biol Chem* 2008;283:1052-63
- Infante RE, Radhakrishnan A, Abi-Mosleh L, et al. Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *J Biol Chem* 2008;283:1064-75

18. Yan D, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins. *Int Rev Cytol* 2008;265:253-85
19. Wang Y, Kumar N, Crumbley C, et al. A second class of nuclear receptors for oxysterols: regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:917-23
20. Wada T, Kang HS, Jetten AM, et al. The emerging role of nuclear receptor RORalpha and its crosstalk with LXR in xeno- and endobiotic gene regulation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:1191-201
21. Deng R, Yang D, Yang J, et al. Oxysterol 22(R)-hydroxycholesterol induces the expression of the bile salt export pump through nuclear receptor farnesoid X receptor but not liver X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:317-25
22. Shenoy SD, Spencer TA, Mercer-Haines NA, et al. CYP3A induction by liver x receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 2004;32:66-71
23. Langmade SJ, Gale SE, Frolov A, et al. Pregnane X receptor (PXR) activation: a mechanism for neuroprotection in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13807-12
24. Trousson A, Bernard S, Petit PX, et al. 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J Neurochem* 2009;109:945-58
25. Umetani M, Domoto H, Gormley AK, et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med* 2007;13:1185-92
26. DuSell CD, Umetani M, Shaul PW, et al. 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Mol Endocrinol* 2008;22:65-77
27. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, et al. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383:728-31
28. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997;272:3137-40
29. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:266-71
30. Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, et al. Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 2011;15:219-32
31. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:459-81
32. Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;93:693-704
33. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289:1524-9
34. Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:2831-8
35. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 2002;45:1963-6
36. Repa JJ, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000;14:2819-30
37. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12097-102
38. Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, et al. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 2000;275:14700-7
39. Wu JE, Basso F, Shamburek RD, et al. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2004;279:22913-25
40. Yu L, York J, Von Bergmann K, et al. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003;278:15565-70
41. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, et al. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002;277:18793-800
42. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, et al. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 2009;325:100-4
43. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, et al. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 2006;116:1902-12
44. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007;21:1014-27
45. Lee JH, Gong H, Khadem S, et al. Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 2008;149:3778-88
46. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5419-24
47. Dalen KT, Ulven SM, et al. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 2003;278:48283-91
48. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282:743-51
49. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003;9:213-19
50. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2003;12:805-16

51. Chuu C-P, Lin H-P. Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22 (R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. *Anticancer Res* 2010;30:3643-8
52. Mehrotra A, Kaul D, Joshi K. LXR- α selectively reprogrammes cancer cells to enter into apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011;349:41-55
53. Dufour J, Pommier A, Alves G, et al. Lack of liver x receptors leads to cell proliferation in a model of mouse dorsal prostate epithelial cell. *PLoS One* 2013;8:e58876
54. Noghero A, Perino A, Seano G, et al. Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2280-8
55. Farwell WR, Scranton RE, Lawler EV, et al. The association between statins and cancer incidence in a veterans population. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:134-9
56. Uno S, Endo K, Jeong Y, et al. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol* 2009;77:186-95
57. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810
58. Vedin L-L, Gustafsson J-Å, Steffensen KR. The oxysterol receptors LXR α and LXR β suppress proliferation in the colon. *Mol Carcinog* 2012;doi:10.1002/mc.21924
59. Lo Sasso GL, Bovenga F, Murzilli S, et al. Liver X. Receptors Inhibit Proliferation of Human Colorectal Cancer Cells and Growth of Intestinal Tumors in Mice. *Gastroenterology* 2013;doi:10.1053/j.gastro.2013.02.005
- **This article demonstrated the antiproliferative role of LXR α in intestinal tumors both *ex vivo* using HT29 human colon cancer cell line and *in vivo* using APC^{min/+} mice models.**
60. Elmore RG, Ioffe Y, Scoles DR, et al. Impact of statin therapy on survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;111:102-5
61. Scoles DR, Xu X, Wang H, et al. Liver X receptor agonist inhibits proliferation of ovarian carcinoma cells stimulated by oxidized low density lipoprotein. *Gynecol Oncol* 2010;116:109-16
62. Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, et al. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res* 2010;3:13
63. Alberts DS, Hallum AV III, Stratton-Custis M, et al. Phase I pharmacokinetic trial and correlative in vitro phase II tumor kinetic study of Apomine (SR-45023A), a novel oral bisphosphonate anticancer drug. *Clin Cancer Res* 2001;7:1246-50
64. Miller DH, Fischer AK, Chu KF, et al. T0901317 inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells [corrected]. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:1350-6
65. Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, et al. Statins and cancer risk: a meta-analysis. *JAMA* 2006;295:74-80
66. Vigushin DM, Dong Y, Inman L, et al. The nuclear oxysterol receptor LXR α is expressed in the normal human breast and in breast cancer. *Med Oncol* 2004;21:123-31
67. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, et al. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:7686-9
- **This article exhibits for the first time that LXR control cell cycle in human prostatic cell lines.**
68. El Roz A, Bard J-M, Huvelin J-M, et al. LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 2012;32:3007-13
69. Vedin L-L, Lewandowski SA, Parini P, et al. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009;30:575-9
70. Gong H, Guo P, Zhai Y, et al. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol Endocrinol* 2007;21:1781-90
71. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, et al. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin* 2001;51:349-64
72. Gabbi C, Kim H-J, Barros R, et al. Estrogen-dependent gallbladder carcinogenesis in LXR β -/- female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14763-8
- **This paper reports hypersensitivity to gallbladder carcinogenesis of Lxr β -/- mice, dependent of estrogen in female.**
73. De Boussac H, Pommier AJ, Dufour J, et al. LXR, prostate cancer and cholesterol: the Good, the Bad and the Ugly. *Am J Cancer Res* 2013;3:58-69
74. Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, et al. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:7682-5
75. Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, et al. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 2006;66:6482-6
76. Viennois E, Esposito T, Dufour J, et al. Lxr α regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* 2012;153:3211-23
77. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 2010;29:2712-23
78. Dufour J, Viennois E, De Boussac H, et al. Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12:724-8
79. Pommier AJC, Dufour J, Alves G, et al. Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet* 2013;9:e1003483
- **This article shows for the first time the effect of LXRs on prostate tumorigenesis *in vivo*.**
80. Guo D, Reinitz F, Youssef M, et al. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov* 2011;1:442-56
- **This article shows that activation of LXR with GW3965 promotes tumor cell death through LDLR (IDOL)-mediated degradation and ABCA1 cholesterol efflux transporter activation in glioblastoma.**
81. Moschetta A. Nuclear receptor LXR as a novel therapeutic antitumoral target in

- glioblastoma. *Cancer Discov* 2011;1:381-2
82. Geyeregger R, Shehata M, Zeyda M, et al. Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2009;86:1039-48
83. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, et al. Tumor-mediated liver X receptor- α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 2010;16:98-105
- **This study shows that CC chemokine receptor-7 inhibition by LXR α on dendritic cells governs antitumor responses.**
84. Viennois E, Mouzat K, Dufour J, et al. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol Cell Endocrinol* 2012;351:129-41
85. DiBlasio-Smith EA, Arai M, Quinet EM, et al. Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J Transl Med* 2008;6:59
86. Katz A, Udata C, Ott E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 2009;49:643-9
- **This article reports the first results of LXR623 (synthetic ligand) in healthy patients.**
87. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, et al. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003;278:36091-8
88. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:781-6
89. Weinhofer I, Kunze M, Rampler H, et al. Liver X receptor α interferes with SREBP1c-mediated Abcd2 expression. Novel cross-talk in gene regulation. *J Biol Chem* 2005;280:41243-51
90. Sun Y, Yao J, Kim T-W, et al. Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion. *J Biol Chem* 2003;278:27688-94
91. Koldamova RP, Lefterov IM, Staufienbiel M, et al. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2005;280:4079-88
92. Zelcer N, Khanlou N, Clare R, et al. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:10601-6
93. Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids* 2011;164:515-24
94. Wang L, Schuster GU, Hultenby K, et al. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13878-83
95. Makoukji J, Shackelford G, Meffre D, et al. Interplay between LXR and Wnt/ β -catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J Neurosci* 2011;31:9620-9
96. Volle DH, Lobaccaro JM. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the 'foie gras', the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 2007;265-266:183-9
97. Mouzat K, Volat F, Baron S, et al. Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* 2009;150:3369-75
98. Kosuri S, Akhtar NH, Smith M, et al. Review of salvage therapy for biochemically recurrent prostate cancer: the role of imaging and rationale for systemic salvage targeted anti-prostate-specific membrane antigen radioimmunotherapy. *Adv Urol* 2012;2012:921674
99. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release* 2010;146:264-75
100. Chiu S-J, Ueno NT, Lee RJ. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine. *J Control Release* 2004;97:357-69
101. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* 2002;8:1172-81

Affiliation

Hugues De Boussac^{1,2,3,4}, Anthony Alioui^{1,2,3,4}, Emilie Viennois^{1,2,3,4,5}, Julie Dufour^{1,2,3,4}, Amalia Trousson^{1,2,3,4}, Aurélie Vega^{1,2,3,4}, Laurent Guy⁶, David H Volle^{1,2,3,4}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{1,2,3,4} & Silvere Baron^{†1,2,3,4}

[†]Author for correspondence

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²CNRS, UMR 6293, GReD, Clermont Université-INSERM U1103, 24, Avenue des Landais BP80026, 63171 Aubière Cedex, France

³INSERM, UMR 1103, GReD, BP 80026, F-63171 Aubière, France

E-mail: silvere.baron@univ-bpclermont.fr

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

⁵Georgia State University, Department of Biology, Center for Diagnostics and Therapeutics, Atlanta, GA, USA

⁶Service d'Urologie, Hôpital Gabriel Montpied, F-63003 Clermont-Ferrand, France

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aalinkeel, R., Nair, B.B., Reynolds, J.L., Sykes, D.E., Mahajan, S.D., Chadha, K.C., and Schwartz, S.A. (2011). Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP. *Immunol. Invest.* *40*, 447–464.
- Aalinkeel, R., Nair, M.P.N., Sufrin, G., Mahajan, S.D., Chadha, K.C., Chawda, R.P., and Schwartz, S.A. (2004). Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 5311–5321.
- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* *14*, 2410–2434.
- Abate-Shen, C., Shen, M.M., and Gelmann, E. (2008). Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* *76*, 717–727.
- Abdulkadir, S.A., Magee, J.A., Peters, T.J., Kaleem, Z., Naughton, C.K., Humphrey, P.A., and Milbrandt, J. (2002). Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1495–1503.
- Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C.A., Economides, A.N., Stahl, N., Jilka, R.L., and Manolagas, S.C. (2000). Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J. Bone Miner. Res.* *15*, 663–673.
- Acevedo, V.D., Gangula, R.D., Freeman, K.W., Li, R., Zhang, Y., Wang, F., Ayala, G.E., Peterson, L.E., Ittmann, M., and Spencer, D.M. (2007). Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell* *12*, 559–571.
- D'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 512–522.
- Adjei, A.A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1062–1074.
- Akhurst, R.J. (2012). The paradoxical TGF- β vasculopathies. *Nat Genet* *44*, 838–839.
- Alavanja, M.C.R., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C.F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J.A., Barker, J., et al. (2003). Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am. J. Epidemiol.* *157*, 800–814.
- Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalussy, U., Rudling, M., Angelin, B., Björkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J.A. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRBeta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *107*, 565–573.
- Alex, A.B., Pal, S.K., and Agarwal, N. (2016). CYP17 inhibitors in prostate cancer: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* *8*, 267–275.
- Algarté-Génin, M., Cussenot, O., and Costa, P. (2004). Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur. Urol.* *46*, 285–294; discussion 294–

295.

Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* 222, 155–161.

Alonso, D.F., Farina, H.G., Skilton, G., Gabri, M.R., De Lorenzo, M.S., and Gomez, D.E. (1998). Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 50, 83–93.

Anai, S., Goodison, S., Shiverick, K., Iczkowski, K., Tanaka, M., and Rosser, C.J. (2006). Combination of PTEN gene therapy and radiation inhibits the growth of human prostate cancer xenografts. *Hum. Gene Ther.* 17, 975–984.

Anassi, E., and Ndefo, U.A. (2011). Sipuleucel-T (Provenge) Injection. *P T* 36, 197–202.

Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515–31524.

Ando, K., Mori, K., Rédini, F., and Heymann, D. (2008). RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol* 5, 263–268.

Angadi, P., and Kale, A. (2015). Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. *Indian Journal of Health Sciences* 8, 77.

Angelucci, A., Festuccia, C., D'Andrea, G., Teti, A., and Bologna, M. (2002). Osteopontin modulates prostate carcinoma invasive capacity through RGD-dependent upregulation of plasminogen activators. *Biol. Chem.* 383, 229–234.

Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., and Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol* 14, 7025–7035.

Aronson, W.J., Kobayashi, N., Barnard, R.J., Henning, S., Huang, M., Jardack, P.M., Liu, B., Gray, A., Wan, J., Konijeti, R., et al. (2011). Phase II prospective randomized trial of a low-fat diet with fish oil supplementation in men undergoing radical prostatectomy. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 2062–2071.

Arya, M., Bott, S.R., Shergill, I.S., Ahmed, H.U., Williamson, M., and Patel, H.R. (2006). The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol* 15, 117–128.

Arya, M., Patel, H.R.H., McGurk, C., Tatoud, R., Klocker, H., Masters, J., and Williamson, M. (2004). The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J. Exp. Ther. Oncol.* 4, 291–303.

Asatiani, E., Huang, W.-X., Wang, A., Rodriguez Ortner, E., Cavalli, L.R., Haddad, B.R., and Gelmann, E.P. (2005). Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene

in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* 65, 1164–1173.

Aumais, J.P., Lee, H.S., DeGannes, C., Horsford, J., and White, J.H. (1996). Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 271, 12568–12577.

Aykan, N.F. (2015). Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncol Rev* 9, 288.

Azoulay, S., Terry, S., Chimingqi, M., Sirab, N., Faucon, H., Gil Diez de Medina, S., Moutereau, S., Maillé, P., Soyeux, P., Abbou, C., et al. (2008). Comparative expression of Hedgehog ligands at different stages of prostate carcinoma progression. *J. Pathol.* 216, 460–470.

Backman, S.A., Ghazarian, D., So, K., Sanchez, O., Wagner, K.-U., Hennighausen, L., Suzuki, A., Tsao, M.-S., Chapman, W.B., Stambolic, V., et al. (2004). Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1725–1730.

Barbier, O., Trottier, J., Kaeding, J., Caron, P., and Verreault, M. (2009). Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol. Cell. Biochem.* 326, 3–8.

Bardia, A., Platz, E.A., Yegnasubramanian, S., De Marzo, A.M., and Nelson, W.G. (2009). Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Curr Opin Pharmacol* 9, 419–426.

Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699–704.

Bassett, J.K., Severi, G., Hodge, A.M., MacInnis, R.J., Gibson, R.A., Hopper, J.L., English, D.R., and Giles, G.G. (2013). Plasma phospholipid fatty acids, dietary fatty acids and prostate cancer risk. *Int. J. Cancer* 133, 1882–1891.

Bavik, C., Coleman, I., Dean, J.P., Knudsen, B., Plymate, S., and Nelson, P.S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 66, 794–802.

Bedolla, R., Prihoda, T.J., Kreisberg, J.I., Malik, S.N., Krishnegowda, N.K., Troyer, D.A., and Ghosh, P.M. (2007). Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin. Cancer Res.* 13, 3860–3867.

Begley, L., Monteleon, C., Shah, R.B., Macdonald, J.W., and Macoska, J.A. (2005). CXCL12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human prostate epithelial proliferation in vitro. *Aging Cell* 4, 291–298.

Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274–277.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France

over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159–175.

Berx, G., Becker, K.F., Höfler, H., and Van Roy, F. (1998). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum. Mutat.* 12, 226–237.

Bethel, C.R., Faith, D., Li, X., Guan, B., Hicks, J.L., Lan, F., Jenkins, R.B., Bieberich, C.J., and De Marzo, A.M. (2006). Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res.* 66, 10683–10690.

Bistulfi, G., Foster, B.A., Karasik, E., Gillard, B., Miecznikowski, J., Dhiman, V.K., and Smiraglia, D.J. (2011). Dietary folate deficiency blocks prostate cancer progression in the TRAMP model. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 1825–1834.

Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F.M., and Carnero, A. (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28, 1379–1386.

Bloch, K. (1965). The Biological Synthesis of Cholesterol. *Science* 150, 19–28.

Bloch, K. (1992). Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* 57, 378–383.

Blum, D.L., Koyama, T., M’Koma, A.E., Iturregui, J.M., Martinez-Ferrer, M., Uwamariya, C., Smith, J.A., Clark, P.E., and Bhowmick, N.A. (2008). Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy. *Clin. Cancer Res.* 14, 7790–7797.

Bohrer, L.R., Chen, S., Hallstrom, T.C., and Huang, H. (2010). Androgens suppress EZH2 expression via retinoblastoma (RB) and p130-dependent pathways: a potential mechanism of androgen-refractory progression of prostate cancer. *Endocrinology* 151, 5136–5145.

Borowsky, A.D., Dingley, K.H., Ubick, E., Turteltaub, K.W., Cardiff, R.D., and Devere-White, R. (2006). Inflammation and atrophy precede prostatic neoplasia in a PhIP-induced rat model. *Neoplasia* 8, 708–715.

Bostwick, D.G., Alexander, E.E., Singh, R., Shan, A., Qian, J., Santella, R.M., Oberley, L.W., Yan, T., Zhong, W., Jiang, X., et al. (2000). Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 89, 123–134.

Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J., et al. (2004a). Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101, 2371–2490.

Bostwick, D.G., Liu, L., Brawer, M.K., and Qian, J. (2004b). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 6, 171–179.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 375, 377–382.

- Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., et al. (2000). Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* *60*, 6111–6115.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* *423*, 337–342.
- Bratt, O. (2002). Hereditary Prostate Cancer: Clinical Aspects. *The Journal of Urology* *168*, 906–913.
- Brooke, G.N., Parker, M.G., and Bevan, C.L. (2008). Mechanisms of androgen receptor activation in advanced prostate cancer: differential co-activator recruitment and gene expression. *Oncogene* *27*, 2941–2950.
- Brooks, J.D., Bova, G.S., and Isaacs, W.B. (1995). Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate* *26*, 35–39.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* *142*, 1–28.
- Brown, M.D., Hart, C., Gazi, E., Gardner, P., Lockyer, N., and Clarke, N. (2009). Influence of omega-6 PUFA arachidonic acid and bone marrow adipocytes on metastatic spread from prostate cancer. *Br J Cancer* *102*, 403–413.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* *191*, 150–154.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* *21*, 505–517.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* *232*, 34–47.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* *89*, 331–340.
- Buijs, J.T., Rentsch, C.A., Van der Horst, G., Van Overveld, P.G.M., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Henriquez, N.V., Ten Dijke, P., Borovecki, F., Markwalder, R., et al. (2007). BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am. J. Pathol.* *171*, 1047–1057.
- Calpe-Berdiel, L., Rotllan, N., Fiévet, C., Roig, R., Blanco-Vaca, F., and Escolà-Gil, J.C. (2008). Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *J. Lipid Res.* *49*, 1904–1911.
- Candelaria, N.R., Addanki, S., Zheng, J., Nguyen-Vu, T., Karaboga, H., Dey, P., Gabbi, C., Vedin, L.-L., Liu, K., Wu, W., et al. (2014). Antiproliferative effects and mechanisms of liver X receptor ligands in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *PLoS ONE* *9*, e106289.

Cao, G., Beyer, T.P., Yang, X.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Bensch, W.R., Kauffman, R.F., Gao, H., Ryan, T.P., Liang, Y., et al. (2002). Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 39561–39565.

Cao, Q., Yu, J., Dhanasekaran, S.M., Kim, J.H., Mani, R.-S., Tomlins, S.A., Mehra, R., Laxman, B., Cao, X., Yu, J., et al. (2008). Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* 27, 7274–7284.

Cao, Z., and Kyprianou, N. (2015). Mechanisms navigating the TGF- β pathway in prostate cancer. *Asian Journal of Urology* 2, 11–18.

Carthy, J.M., Stöter, M., Bellomo, C., Vanlandewijck, M., Heldin, A., Morén, A., Kardassis, D., Gahman, T.C., Shiau, A.K., Bickle, M., et al. (2016). Chemical regulators of epithelial plasticity reveal a nuclear receptor pathway controlling myofibroblast differentiation. *Sci Rep* 6, 29868.

Caruso, M.G., Notarnicola, M., Santillo, M., Cavallini, A., and Di Leo, A. (1999). Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res.* 19, 451–454.

Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S.A., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G., and Tontonoz, P. (2003). Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol. Cell* 12, 805–816.

Castro, P., Giri, D., Lamb, D., and Ittmann, M. (2003). Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 55, 30–38.

Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., and Von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 655–666.

Celhay, O., Laurent, G., Alioui, A., Trousson, A., Kemeny, L., Pereira, B., Leoni, V., Lobaccaro, J., and Baron, S. (2015). [Not Available]. *Prog. Urol.* 25, 727–728.

Cha, J.-Y., and Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* 282, 743–751.

Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.

Chang, T.Y., Chang, C.C., and Cheng, D. (1997). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 613–638.

Chaudhry, P., Fabi, F., Singh, M., Parent, S., Leblanc, V., and Asselin, E. (2014). Prostate apoptosis response-4 mediates TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 5, e1044.

Chavarro, J.E., Stampfer, M.J., Campos, H., Kurth, T., Willett, W.C., and Ma, J. (2008). A prospective study of trans-fatty acid levels in blood and risk of prostate cancer. *Cancer*

Epidemiol. Biomarkers Prev. 17, 95–101.

Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–1870.

Chen, C.-L., Mahalingam, D., Osmulski, P., Jadhav, R.R., Wang, C.-M., Leach, R.J., Chang, T.-C., Weitman, S.D., Kumar, A.P., Sun, L., et al. (2013). Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate* 73, 813–826.

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

Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.

Chen, L., Ambrosone, C.B., Lee, J., Sellers, T.A., Pow-Sang, J., and Park, J.Y. (2006a). Association between polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and APE1, and the risk of prostate cancer in white and black Americans. *J. Urol.* 175, 108–112; discussion 112.

Chen, M., Bradley, M.N., Beaven, S.W., and Tontonoz, P. (2006b). Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Letters* 580, 4835–4841.

Chen, R., Ren, S., Yiu, M.K., Fai, N.C., Cheng, W.S., Ian, L.H., Naito, S., Matsuda, T., Kehinde, E., Kural, A., et al. (2014). Prostate cancer in Asia: A collaborative report. *Asian Journal of Urology* 1, 15–29.

Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5, 73–79.

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

Chen, Y., and Hughes-Fulford, M. (2001). Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int. J. Cancer* 91, 41–45.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.

Cher, M.L., Biliran, H.R., Bhagat, S., Meng, Y., Che, M., Lockett, J., Abrams, J., Fridman, R., Zachareas, M., and Sheng, S. (2003). Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7847–7852.

Chiang, J.Y., Kimmel, R., and Stroup, D. (2001). Regulation of cholesterol 7alpha-

hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 262, 257–265.

Chiao, J.W., Moonga, B.S., Yang, Y.M., Kancherla, R., Mittelman, A., Wu-Wong, J.R., and Ahmed, T. (2000). Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br. J. Cancer* 83, 360–365.

Cho, K.H., Jeong, K.J., Shin, S.C., Kang, J., Park, C.G., and Lee, H.Y. (2013). STAT3 mediates TGF- β 1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion. *Cancer Lett.* 336, 167–173.

Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E.F., Katz, A.E., and Benson, M.C. (2000). Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 56, 160–166.

Chu, K., Cheng, C.-J., Ye, X., Lee, Y.-C., Zurita, A.J., Chen, D.-T., Yu-Lee, L.-Y., Zhang, S., Yeh, E.T., Hu, M.C.-T., et al. (2008). Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol. Cancer Res.* 6, 1259–1267.

Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C., and Ntambi, J.M. (2006). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6786–6798.

Chung, L.W. (1995). The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv.* 23, 33–42.

Clendening, J.W., Pandya, A., Boutros, P.C., Ghamrasni, S.E., Khosravi, F., Trentin, G.A., Martirosyan, A., Hakem, A., Hakem, R., Jurisica, I., et al. (2010). Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15051–15056.

Clines, G.A., Mohammad, K.S., Bao, Y., Stephens, O.W., Suva, L.J., Shaughnessy, J.D., Fox, J.W., Chirgwin, J.M., and Guise, T.A. (2007). Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol. Endocrinol.* 21, 486–498.

Coffer, P.J., and Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* 201, 475–481.

Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., and McGregor, J.L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 75, 468–477.

Connelly, M.A. (2009). SR-BI-mediated HDL cholesteryl ester delivery in the adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 83–88.

Connolly, R.M., Carducci, M.A., and Antonarakis, E.S. (2012). Use of androgen deprivation therapy in prostate cancer: indications and prevalence. *Asian J Androl* 14, 177–186.

Contreras, H.R., Ledezma, R.A., Vergara, J., Cifuentes, F., Barra, C., Cabello, P., Gallegos, I., Morales, B., Huidobro, C., and Castellón, E.A. (2010). The expression of syndecan-1 and -2

is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol. Oncol.* 28, 534–540.

Coppola, D., Szabo, M., Boulware, D., Muraca, P., Alsarraj, M., Chambers, A.F., and Yeatman, T.J. (2004). Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin. Cancer Res.* 10, 184–190.

Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 28240–28245.

Courtois-Cox, S., Jones, S.L., and Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27, 2801–2809.

Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387–2392.

Covey, T.M., Edes, K., and Fitzpatrick, F.A. (2007). Akt activation by arachidonic acid metabolism occurs via oxidation and inactivation of PTEN tumor suppressor. *Oncogene* 26, 5784–5792.

Cramer, S.D., Chen, Z., and Peehl, D.M. (1996). Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J. Urol.* 156, 526–531.

Crawford, E.D. (1992). Challenges in the management of prostate cancer. *Br J Urol* 70 *Suppl* 1, 33–38.

Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2001). Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat. Genet.* 27, 222–224.

Crowe, F.L., Allen, N.E., Appleby, P.N., Overvad, K., Aardestrup, I.V., Johnsen, N.F., Tjønneland, A., Linseisen, J., Kaaks, R., Boeing, H., et al. (2008). Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1353–1363.

Curry, F.E. (1992). Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J.* 6, 2456–2466.

Cybulski, C., Górski, B., Debniak, T., Gliniewicz, B., Mierzejewski, M., Masojć, B., Jakubowska, A., Matyjasik, J., Złowocka, E., Sikorski, A., et al. (2004a). NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 64, 1215–1219.

Cybulski, C., Huzarski, T., Górski, B., Masojć, B., Mierzejewski, M., Debniak, T., Gliniewicz, B., Matyjasik, J., Złowocka, E., Kurzawski, G., et al. (2004b). A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res.* 64, 2677–2679.

Dai, J., Keller, J., Zhang, J., Lu, Y., Yao, Z., and Keller, E.T. (2005). Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res.* 65, 8274–8285.

Dang, C.V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 26, 877–890.

Das, R., Gregory, P.A., Hollier, B.G., Tilley, W.D., and Selth, L.A. (2014). Epithelial plasticity in prostate cancer: principles and clinical perspectives. *Trends in Molecular Medicine* 20, 643–651.

Dawson, M.I., and Xia, Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 21–56.

Dehm, S.M., Schmidt, L.J., Heemers, H.V., Vessella, R.L., and Tindall, D.J. (2008). Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* 68, 5469–5477.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11211–11216.

Delvecchio, C.J., and Capone, J.P. (2008). Protein kinase C alpha modulates liver X receptor alpha transactivation. *J. Endocrinol.* 197, 121–130.

Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P.J., Van Der Smissen, P., Colau, D., Luescher, I.F., Hivroz, C., Nicaise, J., Squifflet, J.-L., Mourad, M., et al. (2008). Restoring the Association of the T Cell Receptor with CD8 Reverses Anergy in Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Immunity* 28, 414–424.

Demotte, N., Wieërs, G., Van Der Smissen, P., Moser, M., Schmidt, C., Thielemans, K., Squifflet, J.-L., Weynand, B., Carrasco, J., Lurquin, C., et al. (2010). A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Res.* 70, 7476–7488.

Denhardt, D.T., Giachelli, C.M., and Rittling, S.R. (2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 723–749.

Denmeade, S.R., Lin, X.S., and Isaacs, J.T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28, 251–265.

DeSantis, C.E., Siegel, R.L., Sauer, A.G., Miller, K.D., Fedewa, S.A., Alcaraz, K.I., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities. *CA Cancer J Clin.*

DeWeese, T.L., Hruszkewycz, A.M., and Marnett, L.J. (2001). Oxidative stress in chemoprevention trials. *Urology* 57, 137–140.

DiBlasio-Smith, E.A., Arai, M., Quinet, E.M., Evans, M.J., Kornaga, T., Basso, M.D., Chen, L., Feingold, I., Halpern, A.R., Liu, Q.-Y., et al. (2008). Discovery and implementation of

transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J Transl Med* 6, 59.

Dietschy, J.M., Turley, S.D., and Spady, D.K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* 34, 1637–1659.

Dijkers, A., Freak de Boer, J., Annema, W., Groen, A.K., and Tietge, U.J.F. (2013). Scavenger receptor BI and ABCG5/G8 differentially impact biliary sterol secretion and reverse cholesterol transport in mice. *Hepatology* 58, 293–303.

Dillard, P.R., Lin, M.-F., and Khan, S.A. (2008). Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 295, 115–120.

Driscoll, S.G., and Taylor, S.H. (1980). Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstet Gynecol* 56, 537–542.

Du, X., Kristiana, I., Wong, J., and Brown, A.J. (2006). Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Mol. Biol. Cell* 17, 2735–2745.

Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 272, 12778–12785.

Duncan, R.E., El-Sohemy, A., and Archer, M.C. (2004). Mevalonate promotes the growth of tumors derived from human cancer cells in vivo and stimulates proliferation in vitro with enhanced cyclin-dependent kinase-2 activity. *J. Biol. Chem.* 279, 33079–33084.

Dunn, M.W., and Kazer, M.W. (2011). Prostate cancer overview. *Semin Oncol Nurs* 27, 241–250.

Duque, J.L., Loughlin, K.R., Adam, R.M., Kantoff, P.W., Zurakowski, D., and Freeman, M.R. (1999). Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 54, 523–527.

Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J.-C., Fievet, C., Clavey, V., Staels, B., and Lestavel, S. (2006). Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1259–1263.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.

Edwards, S.M., and Eeles, R.A. (2004). Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 129C, 65–73.

Efstathiou, E., Karlou, M., Wen, S., Hoang, A., Pettaway, C.A., Pisters, L.L., Maity, S., Troncoso, P., and Logothetis, C.J. (2013). Integrated Hedgehog signaling is induced following castration in human and murine prostate cancers. *Prostate* 73, 153–161.

- Efstathiou, E., and Logothetis, C.J. (2010). A new therapy paradigm for prostate cancer founded on clinical observations. *Clin. Cancer Res.* *16*, 1100–1107.
- Egan, A., Dong, Y., Zhang, H., Qi, Y., Balk, S.P., and Sartor, O. (2014). Castration-resistant prostate cancer: adaptive responses in the androgen axis. *Cancer Treat. Rev.* *40*, 426–433.
- El Roz, A., Bard, J.-M., Huvelin, J.-M., and Nazih, H. (2012). LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Res.* *32*, 3007–3013.
- El Roz, A., Bard, J.-M., Valin, S., Huvelin, J.-M., and Nazih, H. (2013). Macrophage apolipoprotein E and proliferation of MCF-7 breast cancer cells: role of LXR. *Anticancer Res.* *33*, 3783–3789.
- Ellis, M.J., Singer, C., Hornby, A., Rasmussen, A., and Cullen, K.J. (1994). Insulin-like growth factor mediated stromal-epithelial interactions in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *31*, 249–261.
- Ellwood-Yen, K., Graeber, T.G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M.L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G.V., and Sawyers, C.L. (2003). Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* *4*, 223–238.
- Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J., and Giwercman, A. (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.* *17*, 2904–2911.
- English, H.F., Kyprianou, N., and Isaacs, J.T. (1989). Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* *15*, 233–250.
- Espenshade, P.J. (2006). SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J. Cell. Sci.* *119*, 973–976.
- Ettinger, S.L., Sobel, R., Whitmore, T.G., Akbari, M., Bradley, D.R., Gleave, M.E., and Nelson, C.C. (2004). Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res.* *64*, 2212–2221.
- Evan, G.I., and D'Adda di Fagagna, F. (2009). Cellular senescence: hot or what? *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 25–31.
- Feeley, B.T., Gamradt, S.C., Hsu, W.K., Liu, N., Krenek, L., Robbins, P., Huard, J., and Lieberman, J.R. (2005). Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J. Bone Miner. Res.* *20*, 2189–2199.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* *9*, 669–676.
- Fizazi, K., Carducci, M., Smith, M., Damião, R., Brown, J., Karsh, L., Milecki, P., Shore, N., Rader, M., Wang, H., et al. (2011). Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone

metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 377, 813–822.

Fontaine, C., Rigamonti, E., Pourcet, B., Duez, H., Duhem, C., Fruchart, J.-C., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2008). The nuclear receptor Rev-erb α is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol. Endocrinol.* 22, 1797–1811.

Foufelle, F., Hegarty, B., Bobard, A., Hainault, I., Bossard, P., and Ferré, P. (2005). [A new role for insulin in the control of energetic metabolism in liver]. *Med Sci (Paris)* 21, 569–571.

Franck-Lissbrant, I., Häggström, S., Damberg, J.E., and Bergh, A. (1998). Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology* 139, 451–456.

Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665–668.

Freeman, M.R., Cinar, B., Kim, J., Mukhopadhyay, N.K., Di Vizio, D., Adam, R.M., and Solomon, K.R. (2007). Transit of hormonal and EGF receptor-dependent signals through cholesterol-rich membranes. *Steroids* 72, 210–217.

Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2004). Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 91, 54–69.

Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 14–23.

Frohlich, D.A., McCabe, M.T., Arnold, R.S., and Day, M.L. (2008). The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene* 27, 4353–4362.

Fukuchi, J., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Chuu, C.-P., and Liao, S. (2004). Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64, 7686–7689.

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 941–952.

Galbraith, S.M., and Duchesne, G.M. (1997). Androgens and prostate cancer: Biology, pathology and hormonal therapy. *European Journal of Cancer* 33, 545–554.

Gan, Y., Shi, C., Inge, L., Hibner, M., Balducci, J., and Huang, Y. (2010). Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 4947–4958.

Gao, H., Ouyang, X., Banach-Petrosky, W.A., Gerald, W.L., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2006). Combinatorial activities of Akt and B-Raf/Erk signaling in a mouse model of androgen-independent prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14477–14482.

- Georgescu, M.-M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 1, 1170–1177.
- Gerstenfeld, L.C. (1999). Osteopontin in skeletal tissue homeostasis: An emerging picture of the autocrine/paracrine functions of the extracellular matrix. *J. Bone Miner. Res.* 14, 850–855.
- Geyeregger, R., Shehata, M., Zeyda, M., Kiefer, F.W., Stuhlmeier, K.M., Porpaczy, E., Zlabinger, G.J., Jäger, U., and Stulnig, T.M. (2009). Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1039–1048.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.-E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* 25, 57–70.
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., and Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* 70, 6945–6956.
- Gil, J., Kerai, P., Lleonaart, M., Bernard, D., Cigudosa, J.C., Peters, G., Carnero, A., and Beach, D. (2005). Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res.* 65, 2179–2185.
- Giniger, E. (2002). How do Rho family GTPases direct axon growth and guidance? A proposal relating signaling pathways to growth cone mechanics. *Differentiation* 70, 385–396.
- Gioeli, D., Mandell, J.W., Petroni, G.R., Frierson, H.F., and Weber, M.J. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59, 279–284.
- Giri, D., Ropiquet, F., and Ittmann, M. (1999). Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 5, 1063–1071.
- Gladson, C.L., and Welch, D.R. (2008). New Insights into the Role of CXCR4 in Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Biol Ther* 7, 1849–1851.
- Gleason, D.F., and Mellinger, G.T. (2002). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of Urology* 167, 953–958.
- Glomset, J.A., and Norum, K.R. (1973). The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives form pathology. *Adv. Lipid Res.* 11, 1–65.
- Goedeke, L., and Fernández-Hernando, C. (2012). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 915–930.
- Goel, H.L., Breen, M., Zhang, J., Das, I., Aznavoorian-Cheshire, S., Greenberg, N.M., Elgavish, A., and Languino, L.R. (2005). beta1A integrin expression is required for type 1

insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts. *Cancer Res.* 65, 6692–6700.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.

Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35–46.

Goltzman, D. (2001). Osteolysis and cancer. *J Clin Invest* 107, 1219–1220.

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.

Gong, Y., Chippada-Venkata, U.D., and Oh, W.K. (2014). Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Prostate Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 6, 1298–1327.

Gonnissen, A., Isebaert, S., and Haustermans, K. (2013). Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *Int J Mol Sci* 14, 13979–14007.

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.

Gori, F., Thomas, T., Hicok, K.C., Spelsberg, T.C., and Riggs, B.L. (1999). Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1522–1535.

Gottlieb, B., Beitel, L.K., Nadarajah, A., Paliouras, M., and Trifiro, M. (2012). The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum. Mutat.* 33, 887–894.

Graaf, M.R., Beiderbeck, A.B., Egberts, A.C.G., Richel, D.J., and Guchelaar, H.-J. (2004). The risk of cancer in users of statins. *J. Clin. Oncol.* 22, 2388–2394.

Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F., Isaacs, W.B., Pitha, P.M., Davidson, N.E., and Baylin, S.B. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 55, 5195–5199.

Graham, T.R., Zhau, H.E., Odero-Marah, V.A., Osunkoya, A.O., Kimbro, K.S., Tighiouart, M., Liu, T., Simons, J.W., and O'Regan, R.M. (2008). Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 68, 2479–2488.

Graziani, S.R., Igreja, F.A.F., Hegg, R., Meneghetti, C., Brandizzi, L.I., Barboza, R., Amâncio, R.F., Pinotti, J.A., and Maranhão, R.C. (2002). Uptake of a cholesterol-rich

emulsion by breast cancer. *Gynecol. Oncol.* 85, 493–497.

Gregory, C.W., Hamil, K.G., Kim, D., Hall, S.H., Pretlow, T.G., Mohler, J.L., and French, F.S. (1998). Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes. *Cancer Res.* 58, 5718–5724.

Grundy, S.M. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu. Rev. Nutr.* 3, 71–96.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Saitoh, M., Kinkel, S., Crosby, K., Sheen, J.-H., Mullholland, D.J., Magnuson, M.A., Wu, H., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 15, 148–159.

Guisse, T.A., Yin, J.J., and Mohammad, K.S. (2003). Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 97, 779–784.

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.

Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., Nesheiwat, I., Kong, X., Melamed, J., Handratta, V.D., et al. (2006). Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* 10, 309–319.

Gupta, A., Zhou, C.Q., and Chellaiah, M.A. (2013). Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF Expression/Secretion and Angiogenesis in PC3 Prostate Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 5, 617–638.

Gurel, B., Ali, T.Z., Montgomery, E.A., Begum, S., Hicks, J., Goggins, M., Eberhart, C.G., Clark, D.P., Bieberich, C.J., Epstein, J.I., et al. (2010). NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 1097–1105.

Gurel, B., Iwata, T., Koh, C.M., Jenkins, R.B., Lan, F., Van Dang, C., Hicks, J.L., Morgan, J., Cornish, T.C., Sutcliffe, S., et al. (2008). Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod. Pathol.* 21, 1156–1167.

Haas, G.P., Delongchamps, N., Brawley, O.W., Wang, C.Y., and De la Roza, G. (2008). The Worldwide Epidemiology of Prostate Cancer: Perspectives from Autopsy Studies. *Can J Urol* 15, 3866–3871.

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

Haidar, B., Kiss, R.S., Sarov-Blat, L., Brunet, R., Harder, C., McPherson, R., and Marcel, Y.L. (2006). Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. *J. Biol. Chem.* 281, 39971–39981.

- Halbleib, J.M., and Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20, 3199–3214.
- Hall, C.L., Bafico, A., Dai, J., Aaronson, S.A., and Keller, E.T. (2005). Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res.* 65, 7554–7560.
- Hall, C.L., Daignault, S.D., Shah, R.B., Pienta, K.J., and Keller, E.T. (2008). Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate* 68, 1396–1404.
- Hall, C.L., Kang, S., MacDougald, O.A., and Keller, E.T. (2006). Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J. Cell. Biochem.* 97, 661–672.
- Ham, W.S., Cho, N.H., Kim, W.T., Ju, H.J., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2009). Pathological effects of prostate cancer correlate with neuroendocrine differentiation and PTEN expression after bicalutamide monotherapy. *J. Urol.* 182, 1378–1384.
- Hamilton, Z., and Parsons, J.K. (2016). Prostate Cancer Prevention: Concepts and Clinical Trials. *Curr Urol Rep* 17, 35.
- Han, G., Buchanan, G., Ittmann, M., Harris, J.M., Yu, X., DeMayo, F.J., Tilley, W., and Greenberg, N.M. (2005). Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *PNAS* 102, 1151–1156.
- Harris, W.P., Mostaghel, E.A., Nelson, P.S., and Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* 6, 76–85.
- Hart, C.A., Brown, M., Bagley, S., Sharrard, M., and Clarke, N.W. (2005). Invasive characteristics of human prostatic epithelial cells: understanding the metastatic process. *Br. J. Cancer* 92, 503–512.
- Haute Autorité de Santé (2012). Cancer de la prostate : identification des facteurs de risque et pertinence d'un dépistage par dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA) de populations d'hommes à haut risque.
- Haverkamp, J., Charbonneau, B., and Ratliff, T.L. (2008). Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: a current review. *J. Cell. Biochem.* 103, 1344–1353.
- Hay, E.D. (2005a). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* 233, 706–720.
- Hay, R.T. (2005b). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* 18, 1–12.
- He, M.-L., Jiang, A.-L., Zhang, P.-J., Hu, X.-Y., Liu, Z.-F., Yuan, H.-Q., and Zhang, J.-Y. (2005). Identification of androgen-responsive element ARE and Sp1 element in the maspin promoter. *Chin J Physiol* 48, 160–166.
- Heemers, H., Maes, B., Foulfelle, F., Heyns, W., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2001). Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the

sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol. Endocrinol.* *15*, 1817–1828.

Henschler, R., Piiper, A., Bistran, R., and Möbest, D. (2003). SDF-1 α -induced intracellular calcium transient involves Rho GTPase signalling and is required for migration of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *311*, 1067–1071.

Hernandez, D.J., Nielsen, M.E., Han, M., and Partin, A.W. (2007). Contemporary evaluation of the D'Amico risk classification of prostate cancer. *Urology* *70*, 931–935.

Hessels, D., Klein Gunnewiek, J.M.T., Van Oort, I., Karthaus, H.F.M., Van Leenders, G.J.L., Van Balken, B., Kiemeny, L.A., Witjes, J.A., and Schalken, J.A. (2003). DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.* *44*, 8–15; discussion 15–16.

Hessvik, N.P., Bakke, S.S., Smith, R., Ravna, A.W., Sylte, I., Rustan, A.C., Thoresen, G.H., and Kase, E.T. (2012). The liver X receptor modulator 22(S)-hydroxycholesterol exerts cell-type specific effects on lipid and glucose metabolism. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *128*, 154–164.

Hirbe, A.C., Morgan, E.A., and Weilbaecher, K.N. (2010). The CXCR4/SDF-1 chemokine axis: a potential therapeutic target for bone metastases? *Curr. Pharm. Des.* *16*, 1284–1290.

Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.* *153*, 333–339.

Holen, I., Croucher, P.I., Hamdy, F.C., and Eaton, C.L. (2002). Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.* *62*, 1619–1623.

Hölttä-Vuori, M., Tanhuanpää, K., Möbius, W., Somerharju, P., and Ikonen, E. (2002). Modulation of Cellular Cholesterol Transport and Homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* *13*, 3107–3122.

Hooper, N.M. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* *16*, 145–156.

Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., and Glass, C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* *377*, 397–404.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* *109*, 1125–1131.

Horton, J.D., and Shimomura, I. (1999). Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol.* *10*, 143–150.

Horvath, L.G., Henshall, S.M., Lee, C.-S., Kench, J.G., Golovsky, D., Brenner, P.C., O'Neill, G.F., Kooner, R., Stricker, P.D., Grygiel, J.J., et al. (2005). Lower levels of nuclear beta-catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Int. J. Cancer* *113*, 415–422.

- Houck, K.A., Borchert, K.M., Hepler, C.D., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Michael, L.F., and Burris, T.P. (2004). T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* 83, 184–187.
- Hu, S., Yu, W., Lv, T.-J., Chang, C.-S., Li, X., and Jin, J. (2014). Evidence of TGF- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in immortalized benign prostatic hyperplasia cells. *Mol. Membr. Biol.* 31, 103–110.
- Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D.S. (2003). Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol. Endocrinol.* 17, 1019–1026.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11603–11607.
- Huang, C.J., Feltkamp, D., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1998). Synergistic activation of RLD-1 by agents triggering PKA and PKC dependent signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 657–663.
- Huang, J., Powell, W.C., Khodavirdi, A.C., Wu, J., Makita, T., Cardiff, R.D., Cohen, M.B., Sucov, H.M., and Roy-Burman, P. (2002a). Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res.* 62, 4812–4819.
- Huang, L., Cheng, Y.Y., Chow, L.T.C., Zheng, M.H., and Kumta, S.M. (2002b). Tumour cells produce receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in skeletal metastases. *J. Clin. Pathol.* 55, 877–878.
- Huang, S., Pettaway, C.A., Uehara, H., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (2001). Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 20, 4188–4197.
- Huggins, C. (1967). Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Res.* 27, 1925–1930.
- Huggins, C., and Hodges, C.V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J. Urol.* 168, 9–12.
- Hurwitz, A.A., Foster, B.A., Allison, J.P., Greenberg, N.M., and Kwon, E.D. (2001). The TRAMP mouse as a model for prostate cancer. *Curr Protoc Immunol Chapter 20*, Unit 20.5.
- Ibrahim, T., Flamini, E., Mercatali, L., Sacanna, E., Serra, P., and Amadori, D. (2010). Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer* 116, 1406–1418.
- Ibuki, N., Ghaffari, M., Pandey, M., Iu, I., Fazli, L., Kashiwagi, M., Tojo, H., Nakanishi, O., Gleave, M.E., and Cox, M.E. (2013). TAK-441, a novel investigational smoothened antagonist, delays castration-resistant progression in prostate cancer by disrupting paracrine hedgehog signaling. *Int. J. Cancer* 133, 1955–1966.
- Iizumi, M., Bandyopadhyay, S., Pai, S.K., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T.,

- Miura, K., Saito, K., Furuta, E., et al. (2008). RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 7613–7620.
- Incrocci, L. (2015). Radiotherapy for prostate cancer and sexual health. *Transl Androl Urol* 4, 124–130.
- Isaacs, J.T., and Isaacs, W.B. (2004). Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nat. Med.* 10, 26–27.
- Iwamura, M., Hellman, J., Cockett, A.T., Lilja, H., and Gershagen, S. (1996). Alteration of the hormonal bioactivity of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a result of limited proteolysis by prostate-specific antigen. *Urology* 48, 317–325.
- Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D., and Kleinman, H.K. (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res.* 59, 4453–4457.
- Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqahtani, M.H., and Shay, J.W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine* 8, 69.
- Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å., and Steffensen, K.R. (2012). Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 394–404.
- 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.
- Jasińska, M., Owczarek, J., and Orszulak-Michalak, D. (2007). Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 59, 483–499.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M.J. (2008). Cancer Statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 58, 71–96.
- Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M., and Bostwick, D.G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 57, 524–531.
- Jennbacken, K., Tesan, T., Wang, W., Gustavsson, H., Damber, J.-E., and Welén, K. (2010). N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 469–479.
- Jennbacken, K., Vallbo, C., Wang, W., and Damber, J.-E. (2005). Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 65, 110–116.
- Jeon, J.C., Park, J., Park, S., Moon, K.H., Cheon, S.H., and Park, S. (2016). Hypercholesterolemia Is Associated with a Shorter Time to Castration-Resistant Prostate Cancer in Patients Who Have Undergone Androgen Deprivation Therapy. *World J Mens Health* 34, 28–33.

- Jeong, J.H., Wang, Z., Guimaraes, A.S., Ouyang, X., Figueiredo, J.L., Ding, Z., Jiang, S., Guney, I., Kang, G.H., Shin, E., et al. (2008). BRAF activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma. *PLoS ONE* 3, e3949.
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272, 20982–20985.
- Jiao, J., Wang, S., Qiao, R., Vivanco, I., Watson, P.A., Sawyers, C.L., and Wu, H. (2007). Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development. *Cancer Res.* 67, 6083–6091.
- John, E.M., Stern, M.C., Sinha, R., and Koo, J. (2011). Meat consumption, cooking practices, meat mutagens, and risk of prostate cancer. *Nutr Cancer* 63, 525–537.
- Johnston, S.R. (2001). Farnesyl transferase inhibitors: a novel targeted therapy for cancer. *Lancet Oncol.* 2, 18–26.
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 245–256.
- Joniau, S., Goeman, L., Pennings, J., and Van Poppel, H. (2005). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur. Urol.* 48, 379–385.
- 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.
- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., et al. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7604–7609.
- Joshua, A.M., Evans, A., Van der Kwast, T., Zielenska, M., Meeker, A.K., Chinnaiyan, A., and Squire, J.A. (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 156–181.
- Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M., Mammen, P.P.A., Kitazume, T., Peterson, J.A., Horton, J.D., Garry, D.J., Bianco, A.C., and Mangelsdorf, D.J. (2005). LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* 1, 231–244.
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1417–1419.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428.
- Kandutsch, A.A., and Russell, A.E. (1960). Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J. Biol. Chem.* 235, 2256–2261.
- Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I., and Makishima, M.

(2003). Induction of Intestinal ATP-binding Cassette Transporters by a Phytosterol-derived Liver X Receptor Agonist. *J. Biol. Chem.* 278, 36091–36098.

Kang-Park, S., Lee, Y.I., and Lee, Y.I. (2003). PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Lett.* 545, 203–208.

Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., and Beachy, P.A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707–712.

Kasper, B., Brandt, E., Brandau, S., and Petersen, F. (2007). Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J. Immunol.* 179, 2584–2591.

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.

Kelley, M.R., Cheng, L., Foster, R., Tritt, R., Jiang, J., Broshears, J., and Koch, M. (2001). Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 824–830.

Khafagy, R., Stephens, T., Hart, C., Ramani, V., Brown, M., and Clarke, N. (2004). In vitro effects of the prenyl transferase inhibitor AZD3409 on prostate cancer epithelial cells. *ASCO Meeting Abstracts* 22, 4744.

Khalili, M., Mutton, L.N., Gurel, B., Hicks, J.L., De Marzo, A.M., and Bieberich, C.J. (2010). Loss of Nkx3.1 expression in bacterial prostatitis: a potential link between inflammation and neoplasia. *Am. J. Pathol.* 176, 2259–2268.

Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., and Koul, H.K. (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.* 282, 125–136.

Khodavirdi, A.C., Song, Z., Yang, S., Zhong, C., Wang, S., Wu, H., Pritchard, C., Nelson, P.S., and Roy-Burman, P. (2006). Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. *Cancer Res.* 66, 883–888.

Kim, H.-J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2009). Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 558–563.

Kim, H.-J., Yoon, K.-A., Yoon, H.-J., Hong, J.M., Lee, M.-J., Lee, I.-K., and Kim, S.-Y. (2013). Liver X receptor activation inhibits osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B activity and c-Fos induction and prevents inflammatory bone loss in mice. *J. Leukoc. Biol.* 94, 99–107.

Kim, J.H., Cox, M.E., and Wasan, K.M. (2014). Effect of simvastatin on castration-resistant prostate cancer cells. *Lipids Health Dis* 13, 56.

- Kim, K.H., Lee, G.Y., Kim, J.I., Ham, M., Won Lee, J., and Kim, J.B. (2010). Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J. Lipid Res.* 51, 3425–3433.
- Kim, M.J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W.A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Cardiff, R.D., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2002). Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 2999–3004.
- King, T.E., Pawar, S.C., Majuta, L., Sroka, I.C., Wynn, D., Demetriou, M.C., Nagle, R.B., Porreca, F., and Cress, A.E. (2008). The role of alpha 6 integrin in prostate cancer migration and bone pain in a novel xenograft model. *PLoS ONE* 3, e3535.
- Klein, E.A., and Silverman, R. (2008). Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol* 18, 315–319.
- Kleyer, A., Scholtysek, C., Bottesch, E., Hillienhof, U., Beyer, C., Distler, J.H., Tuckermann, J.P., Schett, G., and Krönke, G. (2012). Liver X receptors orchestrate osteoblast/osteoclast crosstalk and counteract pathologic bone loss. *J Bone Miner Res* 27, 2442–2451.
- Klotz, L. (2006). Combined androgen blockade: an update. *Urol. Clin. North Am.* 161–166.
- Koeneman, K.S., Pan, C.X., Jin, J.K., Pyle, J.M., Flanigan, R.C., Shankey, T.V., and Diaz, M.O. (1998). Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *J. Urol.* 160, 1533–1539.
- De Kok, J.B., Verhaegh, G.W., Roelofs, R.W., Hessels, D., Kiemeney, L.A., Aalders, T.W., Swinkels, D.W., and Schalken, J.A. (2002). DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 62, 2695–2698.
- Kopper, L., and Tímár, J. (2005). Genomics of prostate cancer: is there anything to “translate”? *Pathol. Oncol. Res.* 11, 197–203.
- Korade, Z., and Kenworthy, A.K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273.
- Kotokorpi, P., Ellis, E., Parini, P., Nilsson, L.-M., Strom, S., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.-A., and Mode, A. (2007). Physiological differences between human and rat primary hepatocytes in response to liver X receptor activation by 3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl)amino]propyloxy]phenylacetic acid hydrochloride (GW3965). *Mol. Pharmacol.* 72, 947–955.
- Krycer, J.R., Phan, L., and Brown, A.J. (2012). A key regulator of cholesterol homeostasis, SREBP-2, can be targeted in prostate cancer cells with natural products. *Biochem. J.* 446, 191–201.
- Kwabi-Addo, B., Ozen, M., and Ittmann, M. (2004). The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 709–724.
- Kwok, W.K., Ling, M.-T., Lee, T.-W., Lau, T.C.M., Zhou, C., Zhang, X., Chua, C.W., Chan, K.W., Chan, F.L., Glackin, C., et al. (2005). Up-regulation of TWIST in prostate cancer and

its implication as a therapeutic target. *Cancer Res.* 65, 5153–5162.

Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S.B., Castrillo, A., Wilpitz, D.C., Mangelsdorf, D.J., Collins, J.L., et al. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5419–5424.

Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 507–512.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.

Lau, B., Shah, T.T., Valerio, M., Hamid, S., Ahmed, H.U., and Arya, M. (2015). Technological aspects of delivering cryotherapy for prostate cancer. *Expert Rev Med Devices* 12, 183–190.

Lawson, K.A., Wright, M.E., Subar, A., Mouw, T., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., and Leitzmann, M.F. (2007). Multivitamin use and risk of prostate cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 754–764.

Lee, J.H., Gong, H., Khadem, S., Lu, Y., Gao, X., Li, S., Zhang, J., and Xie, W. (2008). Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149, 3778–3788.

Lee, S.H., Johnson, D., Luong, R., and Sun, Z. (2015). Crosstalk between androgen and PI3K/AKT signaling pathways in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 290, 2759–2768.

Lee, Y.-C., Cheng, C.-J., Huang, M., Bilen, M.A., Ye, X., Navone, N.M., Chu, K., Kao, H.-H., Yu-Lee, L.-Y., Wang, Z., et al. (2010). Androgen depletion up-regulates cadherin-11 expression in prostate cancer. *J. Pathol.* 221, 68–76.

Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 3137–3140.

Lepor, H. (2005). A Review of Surgical Techniques for Radical Prostatectomy. *Rev Urol* 7, S11–S17.

Lesko, S.M., Rosenberg, L., and Shapiro, S. (1996). Family history and prostate cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 144, 1041–1047.

Lessard, L., Karakiewicz, P.I., Bellon-Gagnon, P., Alam-Fahmy, M., Ismail, H.A., Mes-Masson, A.-M., and Saad, F. (2006). Nuclear localization of nuclear factor-kappaB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* 12, 5741–5745.

Levine, M.E., Suarez, J.A., Brandhorst, S., Balasubramanian, P., Cheng, C.-W., Madia, F., Fontana, L., Mirisola, M.G., Guevara-Aguirre, J., Wan, J., et al. (2014). Low Protein Intake is

Associated with a Major Reduction in IGF-1, Cancer, and Overall Mortality in the 65 and Younger but Not Older Population. *Cell Metab* 19, 407–417.

Lewalle, J.M., Cataldo, D., Bajou, K., Lambert, C.A., and Foidart, J.M. (1998). Endothelial cell intracellular Ca²⁺ concentration is increased upon breast tumor cell contact and mediates tumor cell transendothelial migration. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 21–29.

Li, X., Wu, J.B., Li, Q., Shigemura, K., Chung, L.W.K., and Huang, W.-C. (2016). SREBP-2 promotes stem cell-like properties and metastasis by transcriptional activation of c-Myc in prostate cancer. *Oncotarget* 7, 12869–12884.

Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28, 91–106.

Lian, J.B., Stein, G.S., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Hassan, M.Q., Gaur, T., and Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 8, 212–227.

Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 277, 9520–9528.

Liang, Y., Mafuvadze, B., Aebi, J.D., and Hyder, S.M. (2016). Cholesterol biosynthesis inhibitor RO 48-8071 suppresses growth of hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer cells. *Onco Targets Ther* 9, 3223–3232.

Liao, J., Li, X., Koh, A.J., Berry, J.E., Thudi, N., Rosol, T.J., Pienta, K.J., and McCauley, L.K. (2008). Tumor expressed PTHrP facilitates prostate cancer-induced osteoblastic lesions. *Int. J. Cancer* 123, 2267–2278.

Liao, J., and McCauley, L.K. (2006). Skeletal metastasis: Established and emerging roles of parathyroid hormone related protein (PTHrP). *Cancer Metastasis Rev.* 25, 559–571.

Lilja, H., Ulmert, D., Björk, T., Becker, C., Serio, A.M., Nilsson, J.-A., Abrahamsson, P.-A., Vickers, A.J., and Berglund, G. (2007). Long-term prediction of prostate cancer up to 25 years before diagnosis of prostate cancer using prostate kallikreins measured at age 44 to 50 years. *J. Clin. Oncol.* 25, 431–436.

Lin, H.-K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S.-W., Chan, C.-H., Chan, C.-H., Yang, W.-L., Wang, J., Egia, A., et al. (2010). Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* 464, 374–379.

Lind, A.J., Wikström, P., Granfors, T., Egevad, L., Stattin, P., and Bergh, A. (2005). Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer. *Prostate* 62, 394–399.

Linder, M.D., Uronen, R.-L., Hölttä-Vuori, M., Van der Sluijs, P., Peränen, J., and Ikonen, E. (2007). Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 47–56.

Linja, M.J., Savinainen, K.J., Saramäki, O.R., Tammela, T.L., Vessella, R.L., and Visakorpi, T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 3550–3555.

Linsel-Nitschke, P., and Tall, A.R. (2005). HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 4, 193–205.

Litvinov, I.V., De Marzo, A.M., and Isaacs, J.T. (2003). Is the Achilles' Heel for Prostate Cancer Therapy a Gain of Function in Androgen Receptor Signaling? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 2972–2982.

Liu, Y.-N., Liu, Y., Lee, H.-J., Hsu, Y.-H., and Chen, J.-H. (2008). Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7096–7108.

Llaverias, G., Danilo, C., Wang, Y., Witkiewicz, A.K., Daumer, K., Lisanti, M.P., and Frank, P.G. (2010). A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 177, 3180–3191.

Loblaw, D.A., Virgo, K.S., Nam, R., Somerfield, M.R., Ben-Josef, E., Mendelson, D.S., Middleton, R., Sharp, S.A., Smith, T.J., Talcott, J., et al. (2007). Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J. Clin. Oncol.* 25, 1596–1605.

Locke, J.A., Wasan, K.M., Nelson, C.C., Guns, E.S., and Leon, C.G. (2008). Androgen-mediated cholesterol metabolism in LNCaP and PC-3 cell lines is regulated through two different isoforms of acyl-coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase (ACAT). *Prostate* 68, 20–33.

Logothetis, C.J., and Lin, S.-H. (2005). Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5, 21–28.

Lokeshwar, B.L., Selzer, M.G., Block, N.L., and Gunja-Smith, Z. (1993). Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. *Cancer Res.* 53, 4493–4498.

Luchman, H.A., Benediktsson, H., Villemaire, M.L., Peterson, A.C., and Jirik, F.R. (2008). The pace of prostatic intraepithelial neoplasia development is determined by the timing of Pten tumor suppressor gene excision. *PLoS ONE* 3, e3940.

Lynch, C.C., Hikosaka, A., Acuff, H.B., Martin, M.D., Kawai, N., Singh, R.K., Vargo-Gogola, T.C., Begtrup, J.L., Peterson, T.E., Fingleton, B., et al. (2005). MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* 7, 485–496.

Ma, X., Ziel-van der Made, A.C., Autar, B., Van der Korput, H.A., Vermeij, M., Van Duijn, P., Cleutjens, K.B., De Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A., et al. (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res.* 65, 5730–5739.

- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* *273*, 13375–13378.
- Maier, D., Jones, G., Li, X., Schönthal, A.H., Gratzl, O., Van Meir, E.G., and Merlo, A. (1999). The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res.* *59*, 5479–5482.
- Majumder, P.K., Yeh, J.J., George, D.J., Febbo, P.G., Kum, J., Xue, Q., Bikoff, R., Ma, H., Kantoff, P.W., Golub, T.R., et al. (2003). Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7841–7846.
- Manes, T., Zheng, D.-Q., Tognin, S., Woodard, A.S., Marchisio, P.C., and Languino, L.R. (2003). Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J. Cell Biol.* *161*, 817–826.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* *83*, 841–850.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436–444.
- Markowski, M.C., Bowen, C., and Gelmann, E.P. (2008). Inflammatory cytokines induce phosphorylation and ubiquitination of prostate suppressor protein NKX3.1. *Cancer Res.* *68*, 6896–6901.
- Martelli, A.M., Tazzari, P.L., Evangelisti, C., Chiarini, F., Blalock, W.L., Billi, A.M., Manzoli, L., McCubrey, J.A., and Cocco, L. (2007). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* *14*, 2009–2023.
- De Marzo, A.M., Marchi, V.L., Epstein, J.I., and Nelson, W.G. (1999). Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate. *Am J Pathol* *155*, 1985–1992.
- De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Zha, S., Luo, J., Nakayama, M., Platz, E.A., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* *62*, 55–62.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.
- Meeker, A.K., Hicks, J.L., Iacobuzio-Donahue, C.A., Montgomery, E.A., Westra, W.H., Chan, T.Y., Ronnett, B.M., and De Marzo, A.M. (2004). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* *10*, 3317–3326.
- Meeker, A.K., Hicks, J.L., Platz, E.A., March, G.E., Bennett, C.J., Delannoy, M.J., and De Marzo, A.M. (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human

prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 62, 6405–6409.

Memarzadeh, S., Xin, L., Mulholland, D.J., Mansukhani, A., Wu, H., Teitell, M.A., and Witte, O.N. (2007). Enhanced paracrine FGF10 expression promotes formation of multifocal prostate adenocarcinoma and an increase in epithelial androgen receptor. *Cancer Cell* 12, 572–585.

Miao, B., Zondlo, S., Gibbs, S., Cromley, D., Hosagrahara, V.P., Kirchgessner, T.G., Billheimer, J., and Mukherjee, R. (2004). Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J. Lipid Res.* 45, 1410–1417.

Minelli, A., Bellezza, I., Conte, C., and Culig, Z. (2009). Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? *Biochim. Biophys. Acta* 1795, 83–91.

Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A., and Saez, E. (2007a). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219–223.

Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A., and Saez, E. (2007b). T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* 581, 1721–1726.

Mizokami, A., Koh, E., Fujita, H., Maeda, Y., Egawa, M., Koshida, K., Honma, S., Keller, E.T., and Namiki, M. (2004). The adrenal androgen androstenediol is present in prostate cancer tissue after androgen deprivation therapy and activates mutated androgen receptor. *Cancer Res.* 64, 765–771.

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

Mo, J., Fang, S.J., Chen, W., and Blobe, G.C. (2002). Regulation of ALK-1 Signaling by the Nuclear Receptor LXR β . *J. Biol. Chem.* 277, 50788–50794.

Molinié, V., Hervé, J.-M., Lugagne, P.-M., Yonneau, L., Ellard, S., Lebreton, T., and Botto, H. (2005). [Value of new prostate cancer markers: alpha methylacyl CoA racemase (P504S) and p63]. *Prog. Urol.* 15, 611–615.

Mondul, A.M., Clipp, S.L., Helzlsouer, K.J., and Platz, E.A. (2010). Association between Plasma Total Cholesterol Concentration and Incident Prostate Cancer in the CLUE II Cohort. *Cancer Causes Control* 21, 61–68.

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

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

Morello, F., De Boer, R.A., Steffensen, K.R., Gneccchi, M., Chisholm, J.W., Boomsma, F., Anderson, L.M., Lawn, R.M., Gustafsson, J.-Åke, Lopez-Illasaca, M., et al. (2005). Liver X receptors α and β regulate renin expression in vivo. *J Clin Invest* 115, 1913–1922.

Morimoto, K., Tanaka, T., Nitta, Y., Ohnishi, K., Kawashima, H., and Nakatani, T. (2014). NEDD9 crucially regulates TGF- β -triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: involvement in cancer progressiveness. *Prostate* 74, 901–910.

Mostaghel, E.A., and Nelson, P.S. (2008). Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22, 243–258.

Mulholland, D.J., Kobayashi, N., Ruscetti, M., Zhi, A., Tran, L.M., Huang, J., Gleave, M., and Wu, H. (2012). Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 72, 1878–1889.

Mulholland, D.J., Tran, L.M., Li, Y., Cai, H., Morim, A., Wang, S., Plaisier, S., Garraway, I.P., Huang, J., Graeber, T.G., et al. (2011). Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. *Cancer Cell* 19, 792–804.

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.

Mundy, G.R. (1997). Mechanisms of bone metastasis. *Cancer* 80, 1546–1556.

Murray, N.P., Reyes, E., Tapia, P., Badínez, L., and Orellana, N. (2012). Differential Expression of Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Disseminated Tumor Cells and Micrometastasis in Bone Marrow of Patients with Nonmetastatic and Metastatic Prostate Cancer: Theoretical Considerations and Clinical Implications—An Immunocytochemical Study. *Bone Marrow Res* 2012,.

Muscat, G.E.O., Wagner, B.L., Hou, J., Tangirala, R.K., Bischoff, E.D., Rohde, P., Petrowski, M., Li, J., Shao, G., Macondray, G., et al. (2002). Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 40722–40728.

Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13513–13518.

Nacusi, L.P., and Tindall, D.J. (2011). Targeting 5 α -reductase for prostate cancer prevention and treatment. *Nat Rev Urol* 8, 378–384.

Naik, S.U., Wang, X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 113, 90–97.

Nandi, S., Ma, L., Denis, M., Karwatsky, J., Li, Z., Jiang, X.-C., and Zha, X. (2009). ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes

governed by membrane rigidity. *J. Lipid Res.* 50, 456–466.

Nauseef, J.T., and Henry, M.D. (2011). Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol* 8, 428–439.

Nelius, T., Filleur, S., Yemelyanov, A., Budunova, I., Shroff, E., Mirochnik, Y., Aurora, A., Veliceasa, D., Xiao, W., Wang, Z., et al. (2007). Androgen receptor targets NFkappaB and TSP1 to suppress prostate tumor growth in vivo. *Int. J. Cancer* 121, 999–1008.

Nelson, E.R., Wardell, S.E., Jasper, J.S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M.K., Carver, N.J., Pillai, R.V., Sullivan, P.M., Sondhi, V., et al. (2013). 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* 342, 1094–1098.

Nelson, J.B. (2003). Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. *J. Urol.* 170, S65–67; discussion S67–68.

Nelson, J.B., Hedican, S.P., George, D.J., Reddi, A.H., Piantadosi, S., Eisenberger, M.A., and Simons, J.W. (1995). Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med.* 1, 944–949.

Neuhouser, M.L., Barnett, M.J., Kristal, A.R., Ambrosone, C.B., King, I.B., Thornquist, M., and Goodman, G.G. (2009). Dietary supplement use and prostate cancer risk in the Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 2202–2206.

Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., and De Gramont, A. (2015). Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 147, 22–31.

Nishiyama, T., Hashimoto, Y., and Takahashi, K. (2004). The influence of androgen deprivation therapy on dihydrotestosterone levels in the prostatic tissue of patients with prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 7121–7126.

Niu, Y., Altuwaijri, S., Lai, K.-P., Wu, C.-T., Ricke, W.A., Messing, E.M., Yao, J., Yeh, S., and Chang, C. (2008a). Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12182–12187.

Niu, Y., Altuwaijri, S., Yeh, S., Lai, K.-P., Yu, S., Chuang, K.-H., Huang, S.-P., Lardy, H., and Chang, C. (2008b). Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12188–12193.

Noghero, A., Perino, A., Seano, G., Saglio, E., Lo Sasso, G., Veglio, F., Primo, L., Hirsch, E., Bussolino, F., and Morello, F. (2012). Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2280–2288.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61.

Ogawa, D., Stone, J.F., Takata, Y., Blaschke, F., Chu, V.H., Towler, D.A., Law, R.E., Hsueh, W.A., and Bruemmer, D. (2005). Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced

osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ. Res.* 96, e59–67.

Van Oort, I.M., Tomita, K., Van Bokhoven, A., Bussemakers, M.J.G., Kiemeny, L.A., Karthaus, H.F.M., Witjes, J.A., and Schalken, J.A. (2007). The prognostic value of E-cadherin and the cadherin-associated molecules alpha-, beta-, gamma-catenin and p120ctn in prostate cancer specific survival: a long-term follow-up study. *Prostate* 67, 1432–1438.

Oram, J.F., and Yokoyama, S. (1996). Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* 37, 2473–2491.

Ouyang, X., DeWeese, T.L., Nelson, W.G., and Abate-Shen, C. (2005). Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 65, 6773–6779.

Oxford, G., and Theodorescu, D. (2003). Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett.* 189, 117–128.

Pakkanen, S., Baffoe-Bonnie, A.B., Matikainen, M.P., Koivisto, P.A., Tammela, T.L., Deshmukh, S., Ou, L., Bailey-Wilson, J.E., and Schleutker, J. (2007). Segregation analysis of 1,546 prostate cancer families in Finland shows recessive inheritance. *Hum Genet* 121, 257–267.

Palomino, D.C.T., Marti, L.C., Palomino, D.C.T., and Marti, L.C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)* 13, 469–473.

Parisotto, M., and Metzger, D. (2013). Genetically engineered mouse models of prostate cancer. *Molecular Oncology* 7, 190–205.

Patra, S.K. (2008). Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 182–206.

Patriarca, C., Petrella, D., Campo, B., Colombo, P., Giunta, P., Parente, M., Zucchini, N., Mazzucchelli, R., and Montironi, R. (2003). Elevated E-cadherin and alpha/beta-catenin expression after androgen deprivation therapy in prostate adenocarcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 199, 659–665.

Pearson, H.B., Phesse, T.J., and Clarke, A.R. (2009). K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res.* 69, 94–101.

Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704.

Pelton, K., Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2012). Cholesterol and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 12, 751–759.

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.

- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., et al. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* *273*, 14037–14045.
- Perlino, E., Lovecchio, M., Vacca, R.A., Fornaro, M., Moro, L., Ditunno, P., Battaglia, M., Selvaggi, F.P., Mastropasqua, M.G., Bufo, P., et al. (2000). Regulation of mRNA and protein levels of beta1 integrin variants in human prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* *157*, 1727–1734.
- Pickup, M., Novitskiy, S., and Moses, H.L. (2013). The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* *13*, 788–799.
- Pinero, G.J., Farach-Carson, M.C., Devoll, R.E., Aubin, J.E., Brunn, J.C., and Butler, W.T. (1995). Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Arch. Oral Biol.* *40*, 145–155.
- Platz, E.A., Till, C., Goodman, P.J., Parnes, H.L., Figg, W.D., Albanes, D., Neuhausser, M.L., Klein, E.A., Thompson, I.M., and Kristal, A.R. (2009). Men with low serum cholesterol have a lower risk of high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *18*, 2807–2813.
- Plösch, T., Kok, T., Bloks, V.W., Smit, M.J., Havinga, R., Chimini, G., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2002). Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J. Biol. Chem.* *277*, 33870–33877.
- Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Cattoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1563–1568.
- Polascik, T.J., and Mouraviev, V. (2008). Zoledronic acid in the management of metastatic bone disease. *Ther Clin Risk Manag* *4*, 261–268.
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C., and Birembaut, P. (2004). Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *49*, 179–186.
- Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 265–273.
- Pommier, A.J.C., 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.
- Pommier, A.J.C., Dufour, J., Alves, G., Viennois, E., De Boussac, H., Trousson, A., Volle, D.H., Caira, F., Val, P., Arnaud, P., et al. (2013). Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* *9*, e1003483.
- Pontes, J., Srougi, M., Borra, P.M.A., Dall’Oglio, M.F., Ribeiro-Filho, L.A., and Leite, K.R.M. (2010). E-cadherin and beta-catenin loss of expression related to bone metastasis in

prostate cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* *18*, 179–184.

Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., and Grippo, P.J. (2014). TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* *106*, djt369.

Prins, G.S., and Birch, L. (1993). Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology* *132*, 169–178.

Prins, G.S., Birch, L., Couse, J.F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., and Korach, K.S. (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res.* *61*, 6089–6097.

Prins, G.S., Birch, L., and Greene, G.L. (1991). Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* *129*, 3187–3199.

Pritchard, C., Mecham, B., Dumpit, R., Coleman, I., Bhattacharjee, M., Chen, Q., Sikes, R.A., and Nelson, P.S. (2009). Conserved gene expression programs integrate mammalian prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res.* *69*, 1739–1747.

Priulla, M., Calastretti, A., Bruno, P., Azzariti, A., Amalia, A., Paradiso, A., Canti, G., and Nicolini, A. (2007). Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *Prostate* *67*, 782–789.

Pu, H., Collazo, J., Jones, E., Gayheart, D., Sakamoto, S., Vogt, A., Mitchell, B., and Kyprianou, N. (2009). Dysfunctional transforming growth factor-beta receptor II accelerates prostate tumorigenesis in the TRAMP mouse model. *Cancer Res.* *69*, 7366–7374.

Queiroz, K.C.S., Tio, R.A., Zeebregts, C.J., Bijlsma, M.F., Zijlstra, F., Badlou, B., De Vries, M., Ferreira, C.V., Spek, C.A., Peppelenbosch, M.P., et al. (2010). Human plasma very low density lipoprotein carries Indian hedgehog. *J. Proteome Res.* *9*, 6052–6059.

Quinet, E.M., Savio, D.A., Halpern, A.R., Chen, L., Schuster, G.U., Gustafsson, J.-A., Basso, M.D., and Nambi, P. (2006). Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRA-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol. Pharmacol.* *70*, 1340–1349.

Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 267–296.

Raccosta, L., Fontana, R., Maggioni, D., Lanterna, C., Villablanca, E.J., Paniccia, A., Musumeci, A., Chiricozzi, E., Trincavelli, M.L., Daniele, S., et al. (2013). The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. *J. Exp. Med.* *210*, 1711–1728.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 6511–6518.

Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H., and Georgescu, M.-M. (2003). PTEN

induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6139–6149.

Ramsay, A.G., Marshall, J.F., and Hart, I.R. (2007). Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 567–578.

Ratnacaram, C.K., Teletin, M., Jiang, M., Meng, X., Chambon, P., and Metzger, D. (2008). Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2521–2526.

Ray, M.E., Mehra, R., Sandler, H.M., Daignault, S., and Shah, R.B. (2006). E-cadherin protein expression predicts prostate cancer salvage radiotherapy outcomes. *J. Urol.* 176, 1409–1414; discussion 1414.

Remen, K.M.R., Henning, P., Lerner, U.H., Gustafsson, J.-Å., and Andersson, G. (2011). Activation of liver X receptor (LXR) inhibits receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation in an LXR β -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 33084–33094.

Remen, K.M.R., Lerner, U.H., Gustafsson, J.-Å., and Andersson, G. (2013). Activation of the liver X receptor- β potently inhibits osteoclastogenesis from lipopolysaccharide-exposed bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 93, 71–82.

Ren, B., Yu, Y.P., Tseng, G.C., Wu, C., Chen, K., Rao, U.N., Nelson, J., Michalopoulos, G.K., and Luo, J.-H. (2007). Analysis of integrin α 7 mutations in prostate cancer, liver cancer, glioblastoma multiforme, and leiomyosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 868–880.

Renahan, A.G., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S.T., Shalet, S.M., and Egger, M. (2004). Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363, 1346–1353.

Rennert, H., Bercovich, D., Hubert, A., Abeliovich, D., Rozovsky, U., Bar-Shira, A., Soloviov, S., Schreiber, L., Matzkin, H., Rennert, G., et al. (2002). A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 981–984.

Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors α and β . *J. Biol. Chem.* 277, 18793–18800.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev.* 14, 2819–2830.

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.

Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. (2000b). Regulation of absorption and ABC1-

mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524–1529.

Richmond, P.J., Karayiannakis, A.J., Nagafuchi, A., Kaisary, A.V., and Pignatelli, M. (1997). Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res.* 57, 3189–3193.

Rigamonti, E., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2008). Regulation of Macrophage Functions by PPAR- α , PPAR- γ , and LXRs in Mice and Men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 1050–1059.

Rigamonti, E., Helin, L., Lestavel, S., Mutka, A.L., Lepore, M., Fontaine, C., Bouhrel, 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.

Riobo, N.A. (2012). Cholesterol and its derivatives in Sonic Hedgehog signaling and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 12, 736–741.

Robbins, C., Torres, J.B., Hooker, S., Bonilla, C., Hernandez, W., Candreva, A., Ahaghotu, C., Kittles, R., and Carpten, J. (2007). Confirmation study of prostate cancer risk variants at 8q24 in African Americans identifies a novel risk locus. *Genome Res* 17, 1717–1722.

Roberts, E., Cossigny, D.A.F., Quan, G.M.Y., Roberts, E., Cossigny, D.A.F., and Quan, G.M.Y. (2013). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton, The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. *Prostate Cancer, Prostate Cancer* 2013, 2013, e418340.

Robzyk, K., Oen, H., Buchanan, G., Butler, L.M., Tilley, W.D., Mandal, A.K., Rosen, N., and Caplan, A.J. (2007). Uncoupling of hormone-dependence from chaperone-dependence in the L701H mutation of the androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 268, 67–74.

Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L., and Mitschelen, J.J. (1976). Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* 14, 1–74.

Rohrmann, S., Nimptsch, K., Sinha, R., Willett, W.C., Giovannucci, E.L., Platz, E.A., and Wu, K. (2015). Intake of Meat Mutagens and Risk of Prostate Cancer in a Cohort of U.S. Health Professionals. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 1557–1563.

Romanowski, R., Jundt, G., Termine, J.D., Von der Mark, K., and Schulz, A. (1990). Immunoelectron microscopy of osteonectin and type I collagen in osteoblasts and bone matrix. *Calcif. Tissue Int.* 46, 353–360.

Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* 76, 69–125.

Roobol, M.J., Schröder, F.H., Van Leeuwen, P., Wolters, T., Van den Bergh, R.C.N., Van Leenders, G.J.L.H., and Hessels, D. (2010). Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur. Urol.* 58, 475–481.

- Rough, J.J., Monroy, M.A., Yerrum, S., and Daly, J.M. (2010). Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res* 3, 13.
- Russo, A., Bronte, G., Rizzo, S., Fanale, D., Di Gaudio, F., Gebbia, N., and Bazan, V. (2010). Anti-endothelin drugs in solid tumors. *Expert Opin Emerg Drugs* 15, 27–40.
- Sabol, S.L., Brewer, H.B., and Santamarina-Fojo, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J. Lipid Res.* 46, 2151–2167.
- Salmena, L., Carracedo, A., and Pandolfi, P.P. (2008). Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133, 403–414.
- Salomon, L., Azria, D., Bastide, C., Beuzeboc, P., Cormier, L., Cornud, F., Eiss, D., Eschwège, P., Gaschignard, N., Hennequin, C., et al. (2010). [Recommendations Onco-Urology 2010: Prostate cancer]. *Prog. Urol.* 20 Suppl 4, S217–251.
- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., D’Andrea, G., Occhiogrosso, G., Pichierri, A., and Caroli, E. (2005). Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 24, 203–207.
- Sanchez, P., Hernández, A.M., Stecca, B., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M.W., Datta, S., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12561–12566.
- Sato, M., Kawata, Y., Erami, K., Ikeda, I., and Imaizumi, K. (2008). LXR agonist increases the lymph HDL transport in rats by promoting reciprocally intestinal ABCA1 and apo A-I mRNA levels. *Lipids* 43, 125–131.
- Schaeffer, E.M., Marchionni, L., Huang, Z., Simons, B., Blackman, A., Yu, W., Parmigiani, G., and Berman, D.M. (2008). Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. *Oncogene* 27, 7180–7191.
- Schleutker, J. (2012). Polymorphisms in androgen signaling pathway predisposing to prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 360, 25–37.
- Schilling, D., Todenhöfer, T., Hennenlotter, J., Schwentner, C., Fehm, T., and Stenzl, A. (2012). Isolated, disseminated and circulating tumour cells in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 9, 448–463.
- Schmelz, M., Cress, A.E., Scott, K.M., Bürger, F., Cui, H., Sallam, K., McDaniel, K.M., Dalkin, B.L., and Nagle, R.B. (2002). Different phenotypes in human prostate cancer: alpha6 or alpha3 integrin in cell-extracellular adhesion sites. *Neoplasia* 4, 243–254.
- Schock, F., and Perrimon, N. (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 463–493.
- Schörghofer, D., Kinslechner, K., Preitschopf, A., Schütz, B., Röhrli, C., Hengstschläger, M., Stangl, H., and Mikula, M. (2015). The HDL receptor SR-BI is associated with human

prostate cancer progression and plays a possible role in establishing androgen independence. *Reprod Biol Endocrinol* 13,.

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.

Schulze, A., and Harris, A.L. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 491, 364–373.

Schuster, G.U., Parini, P., Wang, L., Alberti, S., Steffensen, K.R., Hansson, G.K., Angelin, B., and Gustafsson, J.-A. (2002). Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation* 106, 1147–1153.

Schwartz, K., Lawn, R.M., and Wade, D.P. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 794–802.

Scott, G.K. (1997). Proteinases and proteinase inhibitors in tumour cell growth and metastasis. *The Cancer journal* 10, 80–86.

Selman, S.H. (2011). The McNeal Prostate: A Review. *Urology* 78, 1224–1228.

Sfanos, K.S., Sauvageot, J., Fedor, H.L., Dick, J.D., De Marzo, A.M., and Isaacs, W.B. (2008). A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms. *Prostate* 68, 306–320.

Shafique, K., McLoone, P., Qureshi, K., Leung, H., Hart, C., and Morrison, D.S. (2012). Cholesterol and the risk of grade-specific prostate cancer incidence: evidence from two large prospective cohort studies with up to 37 years' follow up. *BMC Cancer* 12, 25.

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

Shannon, J.M., and Cunha, G.R. (1983). Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* 4, 367–373.

Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., and Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128, 157–170.

Sheng, T., Li, C., Zhang, X., Chi, S., He, N., Chen, K., McCormick, F., Gatalica, Z., and Xie, J. (2004). Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol. Cancer* 3, 29.

Shenoy, S.D., Spencer, T.A., Mercer-Haines, N.A., Alipour, M., Gargano, M.D., Runge-Morris, M., and Kocarek, T.A. (2004). CYP3A induction by liver x receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab. Dispos.* 32, 66–71.

- Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., and Schmidt, A. (1994). NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* 147, 273–276.
- Shiota, M., Itsumi, M., Takeuchi, A., Imada, K., Yokomizo, A., Kuruma, H., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Uchiumi, T., Oda, Y., et al. (2015). Crosstalk between epithelial-mesenchymal transition and castration resistance mediated by Twist1/AR signaling in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 22, 889–900.
- Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Inokuchi, J., Kashiwagi, E., Masubuchi, D., Eto, M., Uchiumi, T., and Naito, S. (2010). Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression. *Oncogene* 29, 237–250.
- Shiota, M., Zardan, A., Takeuchi, A., Kumano, M., Beraldi, E., Naito, S., Zoubeidi, A., and Gleave, M.E. (2012). Clusterin mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 72, 5261–5272.
- Sica, A., and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* 117, 1155–1166.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63, 11–30.
- Silva Neto, B., Koff, W.J., Biolchi, V., Brenner, C., Biolo, K.D., Spritzer, P.M., and Brum, I.S. (2008). Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest.* 26, 74–80.
- Simard, J., Dumont, M., Labuda, D., Sinnett, D., Meloche, C., El-Alfy, M., Berger, L., Lees, E., Labrie, F., and Tavitian, S.V. (2003). Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 225–259.
- Singh, S.B., Ondeyka, J.G., Liu, W., Chen, S., Chen, T.S., Li, X., Bouffard, A., Dropinski, J., Jones, A.B., McCormick, S., et al. (2005). Discovery and development of dimeric podocarpic acid leads as potent agonists of liver X receptor with HDL cholesterol raising activity in mice and hamsters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 2824–2828.
- Slabáková, E., Pernicová, Z., Slavíčková, E., Staršíchová, A., Kozubík, A., and Souček, K. (2011). TGF- β 1-induced EMT of non-transformed prostate hyperplasia cells is characterized by early induction of SNAI2/Slug. *Prostate* 71, 1332–1343.
- Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D., Grönberg, H., Xu, J., Isaacs, S.D., Brownstein, M.J., Bova, G.S., Guo, H., Bujnovszky, P., et al. (1996). Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 274, 1371–1374.
- Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11, 279–303.
- Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (1994). Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. *91*, 10809–10813.

Song, M.S., Carracedo, A., Salmena, L., Song, S.J., Egia, A., Malumbres, M., and Pandolfi, P.P. (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* *144*, 187–199.

Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 283–296.

Souidi, M., Dubrac, S., Parquet, M., Volle, D.H., Lobaccaro, J.-M.A., Mathé, D., Combes, O., Scanff, P., Lutton, C., and Aigueperse, J. (2004). [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *28*, 279–293.

Sparrow, C.P., Baffic, J., Lam, M.-H., Lund, E.G., Adams, A.D., Fu, X., Hayes, N., Jones, A.B., Macnaul, K.L., Ondeyka, J., et al. (2002). A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1 mRNA and stimulating cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* *277*, 10021–10027.

Spann, N.J., and Glass, C.K. (2013). Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol* *14*, 893–900.

Spencer, L., Mann, C., Metcalfe, M., Webb, M., Pollard, C., Spencer, D., Berry, D., Steward, W., and Dennison, A. (2009). The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur. J. Cancer* *45*, 2077–2086.

Sreekumar, A., Laxman, B., Rhodes, D.R., Bhagavathula, S., Harwood, J., Giacherio, D., Ghosh, D., Sanda, M.G., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2004). Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 834–843.

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* *200*, 448–464.

Steelman, L.S., Abrams, S.L., Whelan, J., Bertrand, F.E., Ludwig, D.E., Bäsecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2008). Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* *22*, 686–707.

Steinkamp, M.P., O'Mahony, O.A., Brogley, M., Rehman, H., LaPensee, E.W., Dhanasekaran, S., Hofer, M.D., Kuefer, R., Chinnaiyan, A., Rubin, M.A., et al. (2009). treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res* *69*, 4434–4442.

Stewart, D.A., Cooper, C.R., and Sikes, R.A. (2004). Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *2*, 2.

Stokoe, D. (2001). PTEN. *Current Biology* *11*, R502.

Stottmann, R.W., Turbe-Doan, A., Tran, P., Kratz, L.E., Moran, J.L., Kelley, R.I., and Beier, D.R. (2011). Cholesterol metabolism is required for intracellular hedgehog signal

transduction in vivo. *PLoS Genet.* 7, e1002224.

Sugiyama, N., Varjosalo, M., Meller, P., Lohi, J., Hyytiäinen, M., Kilpinen, S., Kallioniemi, O., Ingvarsen, S., Engelholm, L.H., Taipale, J., et al. (2010). Fibroblast growth factor receptor 4 regulates tumor invasion by coupling fibroblast growth factor signaling to extracellular matrix degradation. *Cancer Res.* 70, 7851–7861.

Sun, L.-P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6519–6526.

Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tsichlis, P.N., Nicosia, S.V., et al. (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am. J. Pathol.* 159, 431–437.

Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R.S., Pienta, K.J., and Wang, J. (2010). CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Rev* 29, 709–722.

Sun, Y.-X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Wang, J., Cook, K., Osman, N.I., Koh-Paige, A.J., Shim, H., et al. (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 20, 318–329.

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

Szarvas, T., Becker, M., Vom Dorp, F., Meschede, J., Scherag, A., Bánkfalvi, A., Reis, H., Schmid, K.W., Romics, I., Rübber, H., et al. (2011). Elevated serum matrix metalloproteinase 7 levels predict poor prognosis after radical prostatectomy. *Int. J. Cancer* 128, 1486–1492.

Taichman, R.S., Cooper, C., Keller, E.T., Pienta, K.J., Taichman, N.S., and McCauley, L.K. (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 62, 1832–1837.

Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., and Wang, N. (2008). HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* 7, 365–375.

Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* 19, 1438–1449.

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.

Tanaka, H., Kono, E., Tran, C.P., Miyazaki, H., Yamashiro, J., Shimomura, T., Fazli, L., Wada, R., Huang, J., Vessella, R.L., et al. (2010). Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat. Med.* 16,

1414–1420.

Tang, D.G., Chen, Y.Q., Newman, P.J., Shi, L., Gao, X., Diglio, C.A., and Honn, K.V. (1993). Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J. Biol. Chem.* 268, 22883–22894.

Tannock, I.F., Ahles, T.A., Ganz, P.A., and Van Dam, F.S. (2004). Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. *J. Clin. Oncol.* 22, 2233–2239.

Tantivejkul, K., Kalikin, L.M., and Pienta, K.J. (2004). Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J. Cell. Biochem.* 91, 706–717.

Taplin, M.E., Bubley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N., and Balk, S.P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 332, 1393–1398.

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

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.

Thiolloy, S., Halpern, J., Holt, G.E., Schwartz, H.S., Mundy, G.R., Matrisian, L.M., and Lynch, C.C. (2009). Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-7, but not matrix metalloproteinase-9, contributes to tumor-induced osteolysis. *Cancer Res.* 69, 6747–6755.

Thompson, E.W., Newgreen, D.F., and Tarin, D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 65, 5991–5995; discussion 5995.

Thompson, I.M., Pauler, D.K., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Ford, L.G., Lippman, S.M., Crawford, E.D., et al. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* 350, 2239–2246.

Thompson, P.D., Panza, G., Zaleski, A., and Taylor, B. (2016). Statin-Associated Side Effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67, 2395–2410.

Thompson, T.C., Southgate, J., Kitchener, G., and Land, H. (1989). Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* 56, 917–930.

Thompson, T.C., Timme, T.L., Kadmon, D., Park, S.H., Egawa, S., and Yoshida, K. (1993). Genetic predisposition and mesenchymal-epithelial interactions in ras+myc-induced carcinogenesis in reconstituted mouse prostate. *Mol. Carcinog.* 7, 165–179.

Timms, B.G. (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* 76, 565–

577.

Toker, A., and Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673–676.

Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 275, 8271–8274.

Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S.M., Kalyana-Sundaram, S., Wei, J.T., Rubin, M.A., Pienta, K.J., et al. (2007). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat. Genet.* 39, 41–51.

Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.-W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., et al. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644–648.

Trudel, D., Fradet, Y., Meyer, F., and Têtu, B. (2010). Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Hum. Pathol.* 41, 1694–1701.

Tsingotjidou, A.S., Zotalis, G., Jackson, K.R., Sawyers, C., Puzas, J.E., Hicks, D.G., Reiter, R., and Lieberman, J.R. (2001). Development of an animal model for prostate cancer cell metastasis to adult human bone. *Anticancer Res.* 21, 971–978.

Twiddy, A.L., Cox, M.E., and Wasan, K.M. (2012). Knockdown of scavenger receptor class B type I reduces prostate specific antigen secretion and viability of prostate cancer cells. *Prostate* 72, 955–965.

Uchida, C. (2012). The retinoblastoma protein: functions beyond the G1-S regulator. *Curr Drug Targets* 13, 1622–1632.

Ukomadu, C., and Dutta, A. (2003). p21-dependent inhibition of colon cancer cell growth by mevastatin is independent of inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 43586–43594.

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.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624–629.

Varjosalo, M., and Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22, 2454–2472.

Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2003). ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 44, 1373–1380.

Vedhachalam, C., Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H.,

- Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 282, 25123–25130.
- Vedin, L.-L., Gustafsson, J.-Å., and Steffensen, K.R. (2013). The oxysterol receptors LXR α and LXR β suppress proliferation in the colon. *Mol. Carcinog.* 52, 835–844.
- 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.
- Van der Velde, A.-E. (2010). Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J. Gastroenterol.* 16, 5908–5915.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.
- Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J.-M., and Baron, S. (2012). Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 129–141.
- Viennois, E., Pommier, A.J.C., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F.-Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., and Lobaccaro, J.-M.A. (2011). Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 219–232.
- 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- α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16, 98–105.
- Virk, M.S., and Lieberman, J.R. (2007). Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res. Ther.* 9 *Suppl 1*, S5.
- Voura, E.B., Sandig, M., and Siu, C.H. (1998). Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc. Res. Tech.* 43, 265–275.
- Wall, S.J., Jiang, Y., Muschel, R.J., and DeClerck, Y.A. (2003). Meeting report: Proteases, extracellular matrix, and cancer: an AACR Special Conference in Cancer Research. *Cancer Res.* 63, 4750–4755.
- Wang, D.Q.-H. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 221–248.
- Wang, G., Wang, J., and Sadar, M.D. (2008a). Crosstalk between the androgen receptor and beta-catenin in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 9918–9927.
- Wang, J., Krill, D., Torbenson, M., Wang, Q., Bisceglia, M., Stoner, J., Thomas, A., DeFlavia, P., Dhir, R., and Becich, M.J. (2000a). Expression of cadherins and catenins in paired tumor and non-neoplastic primary prostate cultures and corresponding prostatectomy specimens. *Urol. Res.* 28, 308–315.

- Wang, M.L., Motamed, M., Infante, R.E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010a). Identification of Surface Residues on Niemann-Pick C2 (NPC2) Essential for Hydrophobic Handoff of Cholesterol to NPC1 in Lysosomes. *Cell Metab* 12, 166–173.
- Wang, Q., Ma, X., Chen, Y., Zhang, L., Jiang, M., Li, X., Xiang, R., Miao, R., Hajjar, D.P., Duan, Y., et al. (2014). Identification of interferon- γ as a new molecular target of liver X receptor. *Biochem. J.* 459, 345–354.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., et al. (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4, 209–221.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y.-P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495–500.
- Wang, X., Zheng, M., Liu, G., Xia, W., McKeown-Longo, P.J., Hung, M.-C., and Zhao, J. (2007). Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res.* 67, 7184–7193.
- Wang, Y., Hayward, S.W., Donjacour, A.A., Young, P., Jacks, T., Sage, J., Dahiya, R., Cardiff, R.D., Day, M.L., and Cunha, G.R. (2000b). Sex hormone-induced carcinogenesis in Rb-deficient prostate tissue. *Cancer Res.* 60, 6008–6017.
- Wang, Y., Kumar, N., Crumbley, C., Griffin, P.R., and Burris, T.P. (2010b). A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 917–923.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008b). Regulation of Cholesterologenes by the Oxysterol Receptor, LXR α . *J Biol Chem* 283, 26332–26339.
- Watanabe, null, Nakayama, null, Shiraishi, null, Stemmermann, null, and Yatani, null (2000). Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol. Oncol.* 5, 274–283.
- Weng, L.-P., Brown, J.L., Baker, K.M., Ostrowski, M.C., and Eng, C. (2002). PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1687–1696.
- Werb, Z., Vu, T.H., Rinkenberger, J.L., and Coussens, L.M. (1999). Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation. *APMIS* 107, 11–18.
- White, C. (1909). On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 3–10.
- Whittemore, A.S., Wu, A.H., Kolonel, L.N., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., West, D.W., Teh, C.Z., and Stamey, T. (1995). Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am. J. Epidemiol.* 141, 732–740.

- Wien, T.N., Pike, E., Wisløff, T., Staff, A., Smeland, S., and Klemp, M. (2012). Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2, e000653.
- Wiklund, F., Jonsson, B.-A., Brookes, A.J., Strömqvist, L., Adolfsson, J., Emanuelsson, M., Adami, H.-O., Augustsson-Bälter, K., and Grönberg, H. (2004). Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 7150–7156.
- Williams, K.J., Argus, J.P., Zhu, Y., Wilks, M.Q., Marbois, B.N., York, A.G., Kidani, Y., Pourzia, A.L., Akhavan, D., Lisiero, D.N., et al. (2013). An essential requirement for the SCAP/SREBP signaling axis to protect cancer cells from lipotoxicity. *Cancer Res* 73, 2850–2862.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033–1045.
- Winter, H., Cheng, K.K., Cummins, C., Maric, R., Silcocks, P., and Varghese, C. (1999). Cancer incidence in the south Asian population of England (1990-92). *Br. J. Cancer* 79, 645–654.
- Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L., and Sobin, L.H. (2002). TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94, 2511–2516.
- Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F., and Liotta, L.A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80, 1529–1537.
- Wouters, K., Shiri-Sverdlov, R., Van Gorp, P.J., Van Bilsen, M., and Hofker, M.H. (2005). Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 470–479.
- Wu, C.-T., Altuwaijri, S., Ricke, W.A., Huang, S.-P., Yeh, S., Zhang, C., Niu, Y., Tsai, M.-Y., and Chang, C. (2007). Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12679–12684.
- Xiao, X., and Song, B.-L. (2013). SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin* 45, 2–10.
- Xie, C., Zhou, Z.-S., Li, N., Bian, Y., Wang, Y.-J., Wang, L.-J., Li, B.-L., and Song, B.-L. (2012). Ezetimibe blocks the internalization of NPC1L1 and cholesterol in mouse small intestine. *J. Lipid Res.* 53, 2092–2101.
- Xie, J., Bartels, C.M., Barton, S.W., and Gu, D. (2013). Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments. *Onco Targets Ther* 6, 1425–1435.
- Xu, C., Zhao, H., Chen, H., and Yao, Q. (2015). CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther* 9, 4953–4964.
- Xu, D., McKee, C.M., Cao, Y., Ding, Y., Kessler, B.M., and Muschel, R.J. (2010). Matrix

metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1. *Cancer Res.* 70, 6988–6998.

Xu, J., Stolk, J.A., Zhang, X., Silva, S.J., Houghton, R.L., Matsumura, M., Vedvick, T.S., Leslie, K.B., Badaro, R., and Reed, S.G. (2000). Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res.* 60, 1677–1682.

Xu, J., Zheng, S.L., Komiya, A., Mychaleckyj, J.C., Isaacs, S.D., Hu, J.J., Sterling, D., Lange, E.M., Hawkins, G.A., Turner, A., et al. (2002). Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat. Genet.* 32, 321–325.

Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., et al. (2007). Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J. Biol. Chem.* 282, 11687–11695.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500.

Yang, W., and Levine, A.C. (2011). Androgens and prostate cancer bone metastases: effects on both the seed and the soil. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 40, 643–653, x.

Yasuda, T., Grillot, D., Billheimer, J.T., Briand, F., Delerive, P., Huet, S., and Rader, D.J. (2010). Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 781–786.

Yasui, T., Kadono, Y., Nakamura, M., Oshima, Y., Matsumoto, T., Masuda, H., Hirose, J., Omata, Y., Yasuda, H., Imamura, T., et al. (2011). Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- β through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J. Bone Miner. Res.* 26, 1447–1456.

Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., et al. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 406–410.

Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G.R., and Guise, T.A. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* 103, 197–206.

Yokoyama, S. (1998). Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1392, 1–15.

Yu, J., Yu, J., Mani, R.-S., Cao, Q., Brenner, C.J., Cao, X., Wang, X., Wu, L., Li, J., Hu, M., et al. (2010). An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 17, 443–454.

- Yu, J., Yu, J., Rhodes, D.R., Tomlins, S.A., Cao, X., Chen, G., Mehra, R., Wang, X., Ghosh, D., Shah, R.B., et al. (2007). A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res.* 67, 10657–10663.
- Yu, L., Hammer, R.E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2002). Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16237–16242.
- Yu, L., York, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2003). Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* 278, 15565–15570.
- Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., et al. (2014). Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metab* 19, 393–406.
- Yuen, H.-F., Chan, Y.-P., Wong, M.L.-Y., Kwok, W.-K., Chan, K.-K., Lee, P.-Y., Srivastava, G., Law, S.Y.-K., Wong, Y.-C., Wang, X., et al. (2007a). Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J. Clin. Pathol.* 60, 510–514.
- Yuen, H.-F., Chua, C.-W., Chan, Y.-P., Wong, Y.-C., Wang, X., and Chan, K.-W. (2007b). Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology* 50, 648–658.
- Zanotti, I., Potì, F., Pedrelli, M., Favari, E., Moleri, E., Franceschini, G., Calabresi, L., and Bernini, F. (2008). The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J. Lipid Res.* 49, 954–960.
- 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.
- Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L.G., Sutherland, R.L., and Williams, E.D. (2005). Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* 65, 222–230.
- Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D.L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J., and Keller, E.T. (2001). Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J. Clin. Invest.* 107, 1235–1244.
- Zhang, J., Dai, J., Yao, Z., Lu, Y., Dougall, W., and Keller, E.T. (2003). Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res.* 63, 7883–7890.
- Zhang, Q., Helfand, B.T., Jang, T.L., Zhu, L.J., Chen, L., Yang, X.J., Kozlowski, J., Smith, N., Kundu, S.D., Yang, G., et al. (2009). Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin. Cancer Res.* 15, 3557–3567.

- Zhao, J.C., Yu, J., Runkle, C., Wu, L., Hu, M., Wu, D., Liu, J.S., Wang, Q., Qin, Z.S., and Yu, J. (2012). Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation. *Genome Res.* 22, 322–331.
- Zhao, S.-P., Yu, B.-L., Xie, X.-Z., Dong, S.-Z., and Dong, J. (2008). Dual effects of oxidized low-density lipoprotein on LXR-ABCA1-apoA-I pathway in 3T3-L1 cells. *Int. J. Cardiol.* 128, 42–47.
- Zhao, X.Y., Malloy, P.J., Krishnan, A.V., Swami, S., Navone, N.M., Peehl, D.M., and Feldman, D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat. Med.* 6, 703–706.
- Zhau, H.E., Odero-Marah, V., Lue, H.-W., Nomura, T., Wang, R., Chu, G., Liu, Z.-R., Zhou, B.P., Huang, W.-C., and Chung, L.W.K. (2008). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 601–610.
- Zheng, D.Q., Woodard, A.S., Fornaro, M., Tallini, G., and Languino, L.R. (1999a). Prostatic carcinoma cell migration via $\alpha(v)\beta_3$ integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res.* 59, 1655–1664.
- Zheng, Y., Liu, Y., Jin, H., Pan, S., Qian, Y., Huang, C., Zeng, Y., Luo, Q., Zeng, M., and Zhang, Z. (2013). Scavenger Receptor B1 is a Potential Biomarker of Human Nasopharyngeal Carcinoma and Its Growth is Inhibited by HDL-mimetic Nanoparticles. *Theranostics* 3, 477–486.
- Zheng, Z., Pan, J., Chu, B., Wong, Y.C., Cheung, A.L., and Tsao, S.W. (1999b). Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin in nasopharyngeal carcinoma: close association with advanced disease stage and lymph node metastasis. *Hum. Pathol.* 30, 458–466.
- Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Corney, D.C., Wang, W., Goodrich, D.W., Roy-Burman, P., and Nikitin, A.Y. (2006). Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 66, 7889–7898.
- Zhu, P., Baek, S.H., Bourk, E.M., Ohgi, K.A., Garcia-Bassets, I., Sanjo, H., Akira, S., Kotol, P.F., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., et al. (2006). Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway. *Cell* 124, 615–629.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Invest.* 115, 959–968.
- Zhuang, L., Lin, J., Lu, M.L., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2002). Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62, 2227–2231.
- Zou, Z., Zhang, W., Young, D., Gleave, M.G., Rennie, P., Connell, T., and Connelly, R. (2002). Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro induction of Maspin expression by androgen ablation. *Clin. Cancer Res.* 8, 1172–1177.

