



HAL
open science

PGC-1 α régule un programme onco-métabolique capable de réprimer l'agressivité du cancer de la prostate

Lisa Kaminski

► To cite this version:

Lisa Kaminski. PGC-1 α régule un programme onco-métabolique capable de réprimer l'agressivité du cancer de la prostate. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4062 . tel-02008286

HAL Id: tel-02008286

<https://theses.hal.science/tel-02008286>

Submitted on 5 Feb 2019

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.

THÈSE DE DOCTORAT

PGC-1 α régule un programme onco-métabolique capable de réprimer l'agressivité du cancer de la prostate

Lisa KAMINSKI

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), INSERM U1065

Présentée en vue de l'obtention

du grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Frédéric BOST

Soutenue le : 10 Septembre 2018

Devant le jury, composé de :

Patrick AUBERGER, DRCE INSERM, C3M

Silvère BARON, MCU, GReD

Frédéric BOST, DR2 CNRS, C3M

Marie LAGOUGE, CR1 CNRS, CRC

Sophie VASSEUR, DR2 INSERM,

CRCM

PGC-1 α régule un programme onco-métabolique capable de réprimer l'agressivité du cancer de la prostate

Jury :

Président du jury

Patrick AUBERGER, DRCE INSERM, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), U1065, Nice

Rapporteurs

Silvère BARON, MCU, Génétique Reproduction et Développement (GReD), Clermont-Ferrand

Sophie VASSEUR, DR2 INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Marseille

Examineur

Marie LAGOUGE, CR1 CNRS, Centre de Recherche des Cordeliers (CRC), Paris

Directeur de thèse

Frédéric BOST, DR2 CNRS, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), U1065, Nice

PGC-1 α régule un programme onco-métabolique capable de réprimer l'agressivité du cancer de la prostate

Résumé :

La reprogrammation et la plasticité du métabolisme sont maintenant considérées comme des caractéristiques des cellules cancéreuses et une conséquence de leur adaptation à un microenvironnement hostile se traduisant par une baisse de la concentration d'oxygène (hypoxie) et de la disponibilité des nutriments, particulièrement le glucose et la glutamine. Donc, les cellules cancéreuses sont capables d'adapter leur métabolisme pour survivre et proliférer. Des avancées récentes dans la connaissance de ces modifications permettent l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques ciblant spécifiquement ces changements métaboliques.

Un des principaux régulateurs du métabolisme cellulaire est le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha). PGC-1 α contrôle, entre autres, la biogénèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. Récemment, il a été montré que PGC-1 α facilite la biogénèse mitochondriale dans les cellules cancéreuses du sein et augmentent significativement leurs potentiels métastatiques. Au contraire, il a été montré que la surexpression de PGC-1 α diminue la formation de métastases dans le mélanome et l'adénocarcinome prostatique. Cependant, les modifications métaboliques et moléculaires conduisant à l'agressivité du cancer de la prostate sont, à l'heure actuelle, peu connues.

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs sont connus pour être capables de réguler les adaptations métaboliques des cellules cancéreuses. Plusieurs études ont montré que le nombre de copies du gène MYC est augmenté dans plus de 30% des cancers de la prostate. Les souris transgéniques surexprimant c-MYC spécifiquement dans la prostate développent des néoplasies intra-épithéliales prostatiques suivi d'un adénocarcinome prostatique, ce qui démontre que c-MYC est capable de déclencher la tumorigénèse prostatique. Au niveau cellulaire, il a été largement montré que l'expression du proto-oncogène c-MYC augmente la glycolyse et la glutaminolyse dans les cellules tumorales, en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans ces voies métaboliques. De plus, il a également été montré que c-MYC est capable d'augmenter la voie de synthèse des polyamines, en induisant l'expression de l'enzyme limitante de cette voie, l'ornithine décarboxylase (ODC).

Dans ce contexte, le but de ma thèse était d'étudier le rôle de PGC-1 α sur le métabolisme et l'agressivité des cellules cancéreuses de prostate.

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que la diminution de l'expression de PGC-1 α augmente les trois caractéristiques fondamentales de l'agressivité tumorale : la prolifération, la migration et l'invasion. Afin de déterminer les modifications métaboliques impliquées dans ce phénotype, nous

avons réalisé des expériences de métabolomiques en comparant les cellules contrôles aux cellules dont l'expression de PGC-1 α est diminuée (shPGC-1 α). Nous avons montré que la baisse de PGC-1 α augmente significativement la biosynthèse des polyamines. Les polyamines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, en particulier la prolifération et la migration cellulaire. Ainsi, nous avons inhibé la synthèse des polyamines avec le DFMO, l'inhibiteur de l'enzyme limitante de la voie : ODC, ou bien des siRNA dirigés contre ODC. Nous avons montré que les effets pro-migratoires et pro-invasifs dus à l'invalidation de PGC-1 α sont bloqués par le DFMO et les siRNA ODC. De façon intéressante, l'ajout de polyamines exogènes restaure partiellement l'agressivité des cellules. En accord avec ces résultats, nous montrons que ODC est surexprimée quand PGC-1 α est diminué et que l'expression de ODC est régulée positivement par l'oncogène c-MYC. En s'intéressant plus en détail à cet oncogène, nous observons que son niveau d'expression augmente dans les cellules invalidées pour PGC-1 α et que l'inhibition de c-MYC bloque les effets pro-migratoires et pro-invasifs dus à l'invalidation de PGC-1 α . Donc c-MYC participe au phénotype agressif lié à l'augmentation de la voie de biosynthèse des polyamines. Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par l'analyse des micro-métastases, ils démontrent que les cellules shPGC-1 α forment plus de métastases et le traitement par le DFMO inhibe la formation de micro-métastases. Finalement, les données cliniques démontrent que l'expression de PGC-1 α est diminuée chez des patients atteints de cancer de la prostate, et cette diminution est corrélée avec une augmentation de c-MYC et ODC.

En conclusion, nous avons démontré que PGC-1 α est le régulateur majeur d'une voie onco-métabolique par c-MYC et qui promeut l'agressivité du cancer de la prostate par l'intermédiaire de la voie de biosynthèse des polyamines. Ce nouveau circuit métabolique représente une cible thérapeutique intéressante pouvant aider à freiner les formes avancées du cancer de la prostate.

Mots-clés : Métabolisme ; Cancer de la prostate, Métastases ; Voie des polyamines ; PGC-1 α ; c-MYC

PGC-1 α controls an onco-metabolic pathway to restrain prostate cancer aggressiveness

Abstract:

Metabolism reprogramming are now considered to be characteristic of cancer cells and a consequence of their adaptations to a hostile microenvironment resulting in a decrease in oxygen concentration (hypoxia) and the availability of nutrients, particularly glucose and glutamine. Thus, cancer cells can adapt their metabolism to survive and proliferate. Recent advances in the knowledge of these modifications allow the emergence of new therapeutic approaches targeting these metabolic changes.

One of the main regulators of cellular metabolism is the transcriptional coactivator PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha). PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation. Recently, it has been shown that PGC-1 α promotes mitochondrial biogenesis in cancer cells and dramatically increases their metastatic potential. On the contrary, it appears that overexpression of PGC-1 α decreases the formation of metastases in melanoma and prostatic adenocarcinoma. However, the metabolic and molecular changes leading to the aggressiveness of prostate cancer are unclear.

Oncogenes and tumor suppressor genes are known to be able to regulate the metabolic adaptations of cancer cells. Several studies show that the number of copies of the gene is increased in 30% of prostate cancers. Transgenic mice overexpressing c-MYC in the prostate develop prostatic intraepithelial neoplasia followed by prostatic adenocarcinoma. At the cellular level, c-MYC expression has been shown to stimulate glycolysis and glutaminolysis in tumor cells, by controlling the expression of genes involved in these metabolic pathways. In addition, c-MYC is also able to increase the polyamine synthesis pathway by inducing the expression of the limiting enzyme of this pathway, ornithine decarboxylase (ODC).

In this context, the purpose of my thesis was to study the role of PGC-1 α on the metabolism and aggressiveness of prostate cancer cells.

During my thesis, we have shown that the decrease of PGC-1 α expression increases the three fundamental characteristics of tumor aggressiveness: proliferation, migration and invasion. To determine the metabolic changes involved in this phenotype, we performed metabolic experiments and compared control cells to cells where PGC-1 α expression is decreased. We show that the decrease of PGC-1 α significantly increases the biosynthesis of polyamines. Polyamines are involved in many cellular functions, particularly in proliferation and cell migration. Thus, we inhibit the synthesis of polyamines with DFMO, an inhibitor ODC which is the rate limiting enzyme of this pathway. We have

shown that pro-migratory and pro-invasive effects due to PGC-1 α knockout are blocked by DFMO and ODC siRNA. Interestingly, the addition of exogenous polyamine partially restores the aggressiveness of the cells. Consistent with these results, we show that ODC is overexpressed when PGC-1 α is decreased and that ODC expression is upregulated by the c-MYC oncogene. In addition, we observe that c-MYC expression increases in cells invalidated for PGC-1 α and that the inhibition of c-MYC blocks the pro-migratory and pro-invasive effects due to the invalidation of PGC-1 α . Therefore, c-MYC participates in the aggressive phenotype related to the increase of the polyamine biosynthesis pathway. These *in vitro* results were confirmed *in vivo* by micro-metastasis analysis, we demonstrate that shPGC-1 α cells form more metastases and treatment with DFMO inhibits the formation of micro-metastases. Clinical data indicate that PGC-1 α expression is decreased in patients with prostate cancer, and this decrease correlates with an increase in c-MYC and ODC.

In conclusion, we show that PGC-1 α is the major regulator of an onco-metabolic which promotes prostate cancer aggressiveness via the polyamine biosynthesis pathway. This new metabolic circuit represents a therapeutic target that can help to cure the advanced forms of prostate cancer.

Keywords: Metabolism; Prostate cancer; Metastasis; Polyamine pathway; PGC-1 α ; c-MYC

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr **Sophie Vasseur** et le Dr **Silvère Baron**, d'avoir accepté d'être rapporteurs au sein de ce jury de thèse et d'avoir consacré du temps à lire ce manuscrit et à évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaite également remercier le Dr **Marie Lagouge** pour avoir accepté d'être présente le jour de ma soutenance de thèse en tant qu'examinatrice.

Je tiens ensuite à remercier le Dr **Patrick Auberger** de m'avoir fait l'honneur de présider ma soutenance de thèse.

Pour continuer, je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Dr **Frédéric Bost**. Fred, merci beaucoup de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse, ce fut une expérience très instructive et enrichissante aussi bien professionnellement que personnellement, en grande partie grâce à toi, à ton dynamisme, ta motivation, ta gentillesse, tes conseils, ta bonne humeur et tes bonnes blagues (si si je t'assure !). Je te remercie également pour ta patience et ton adaptation à mon caractère timide et pas très loquace, tu as su me donner (un peu !) confiance en moi et me pousser à me dépasser sans jamais me forcer ni me brusquer, comme à chaque fois que je devais présenter un public par exemple, je te remercie sincèrement pour ça. Merci de m'avoir laissé toute l'indépendance nécessaire pour mener mon projet mais en étant toujours présent et disponible dès que j'en avais besoin. Je te remercie également de t'être réjoui pour deux devant mes résultats ! Merci également de m'avoir remotivée quand je perdais courage. Durant ma thèse, j'ai eu la chance d'assister à la création de ton équipe et à tes premiers pas en tant que directeur d'équipe. Félicitations encore pour cette très belle réussite et pour réussir à gérer tous les aspects pratiques et les différents caractères de l'équipe ! Je te souhaite plein de réussite dans ce nouveau projet ! Pour finir, je voulais que tu saches que même si je ne pense pas continuer en recherche, j'ai été très heureuse de travailler avec toi au cours de ces trois années, j'espère que le travail qu'on a accompli te satisfait et te sera utile. J'ai également été très chanceuse de t'avoir comme directeur de thèse ! Merci encore pour tout Fred !!

Ensuite, je voudrais remercier tous les membres de l'équipe 5, en commençant par ceux qui étaient dans l'équipe 7 et qui ont suivi Fred dans cette nouvelle aventure !

Je commencerais donc par **Stéphan**, même si tu m'as conseillée de faire un copier/coller pour les remerciements, je vais quand même prendre le temps de les personnaliser ! Je tenais à te remercier pour ton expertise scientifique et tous les conseils pratiques que tu m'as donné au cours de ma thèse et qui m'ont été très utiles. J'ai beaucoup apprécié toutes les conversations sérieuses (ou non !) qu'on a eu, tes remarques très philosophiques, tes expressions bien à toi et tes avis très tranchés (surtout

sur Nice mais qui finalement s'avèrent très juste) ! Nos réunions/bavardages de fin de journée en culture vont me manquer, je ne regrette pas de t'avoir piqué cette habitude ! Bonne continuation Stéphan, je te souhaite plein de réussite avec ta protéine inconnue qui grâce à ta persévérance l'est un peu moins de jour en jour.

Aurélië, je suis très contente de t'avoir rencontrée et d'avoir partagée deux ans de (~~galère~~) oups thèse avec toi !! Je te remercie pour ta gentillesse au quotidien, pour toutes les pauses Rico/café/thé, les repas à 12h tapante, les gouters... ! Merci d'avoir toujours été là même quand ça n'allait pas, de m'avoir écoutée, conseillée mais aussi de ne pas m'avoir forcée à parler quand je ne me sentais pas encore prête. J'espère qu'on continuera à parler couture (c'est en grande partie grâce à toi que j'ai voulu me lancer !), shopping, cosmétique home made, etc... Merci, entres autres, pour toutes les sorties/apéro/resto, les TGIF, les cours d'aqua bike, le yoga, le bal des pompiers, le concert de Juliiiiien Doré, grâce à toi j'ai pu bien décompresser et m'amuser en dehors du labo ! Je te souhaite plein, plein de bonheur et d'amour avec Paul !!! Je te souhaite de tout cœur (mais je n'en doute pas) de trouver quelque chose qui te plaise vraiment. J'espère sincèrement qu'on restera en contact et je te donne tout mon courage pour ces quelques mois restants (ça va passer vite t'inquiète !).

Stéphanie, même si tu as un caractère bien trempé, tu es une personne très attachante ! Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta carrière, tu le mérites. Tu es très courageuse de t'accrocher à la recherche, quand on voit comme c'est dur, et d'arriver en plus à élever deux enfants, c'est très admirable ! J'espère ne pas te laisser trop de travail avec les revues du papier.

Kathiane, je te remercie pour ta gentillesse et l'aide que tu m'as apporté sur ce projet. Merci pour les œufs frais de tes poules et pour m'avoir fait découvrir le kéfir que je rapporte avec moi en Haute Savoie ! Je te remercie également de m'avoir fait voyager à Bali, à travers toi et tes photos ! Je te souhaite pleins de bonnes choses et de voyages pour la suite.

Je tiens ensuite à remercier les nouveaux venus qui forment, depuis janvier, l'équipe 5 : prostate power (ou pas !).

Estelle, on ne se connaît que depuis quelques mois mais j'ai appris à te connaître et t'apprécier. Je te souhaite énormément de force et de courage dans cette étape difficile de la fin de thèse. Tu es bosseuse et persévérante, tu vas très bien t'en sortir ! Tu verras à la fin tu seras soulagée et ça ne sera plus qu'un mauvais souvenir ! Courage ! En tout cas, sache que je serai là pour répondre à toutes tes questions et t'aider avec la partie administrative de la thèse, si besoin. Je te souhaite une bonne continuation pour la suite.

François-René et Youta, merci d'avoir apporté un peu de légèreté, d'humour (souvent très limite mais drôle) et de testostérone dans cette équipe très féminine ! Vous m'avez bien fait rire et déconnecter durant cette année, François-René avec tes imitations, tes bruitages et tes vidéos gores et Youta avec tes histoires de cœur, ton look parfois original (surtout tes chaussettes) et ton estomac insatiable ! FR, je te souhaite bonne chance pour ta thèse de médecine et beaucoup de courage pour ton demi Ironman. Je te souhaite également beaucoup de réussite à Paris pour la suite de ta carrière et de bonheur avec ta femme et ta fille. Youta, je te souhaite bon courage pour la fin de ton internat et j'espère que tu trouveras une copine ! Profitez bien de vos dernières semaines de stage en recherche, après vous risquerez de regretter le monde des bisounours !

Julie, Lucilla et Monique, on n'aura partagé le bureau et le labo que pendant 9 mois mais ça m'a fait très plaisir de vous connaître et je vous remercie pour votre gentillesse. Julie, bon courage pour ta thèse de sciences. Ça ne te suffisait pas d'être médecin, épouse et maman tu voulais aussi goûter aux joies et galères de la thèse (enceinte de Julo en plus !!). Tu es vraiment impressionnante, j'en suis admirative ! Et avec tout ça tu trouves encore le temps de faire des mini-consultations au labo et d'aider Monique avec l'administration française ! Je te souhaite plein de réussite et de joie dans ta vie professionnelle et personnelle. Lucilla, je te souhaite du courage pour ta dernière année de thèse, tu vas voir elle passe très vite ! Je te souhaite aussi la réussite de ton papier. Monique, j'espère qu'avant la fin de ton post-doc tu auras une carte vitale !! Mais j'y crois tu es sur la bonne voie ! Tu m'as souvent dit que j'étais bien habillée (merci !), sache que j'aime aussi énormément la façon dont tu t'habilles ! Je te souhaite plein de bonheur avec Gustavo et Isabella.

Nathalie, je tiens à te remercier pour ta gentillesse, ton aide et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions. Merci d'avoir agrandi ma culture musicale jazz et classique le soir entre 18h30 et 19h30 ! Je te souhaite beaucoup de réussite pour le papier (même si je ne serai plus là pour les croissants !) et aussi au sein de cette nouvelle équipe.

Charlotte et Mounia, je vous remercie pour votre gentillesse et je vous souhaite beaucoup de réussite au sein de cette nouvelle équipe.

Dominique, merci beaucoup pour ton aide et ta patience avec toute la partie administrative, les commandes et tous les problèmes liés.

Je souhaite ensuite remercier l'équipe 7 qui m'a accueillie durant les deux premières années de ma thèse. Merci à **Jean-François** et **Mireille** pour leur expertise et leurs très larges connaissances, à **Sophie** et **Karine** pour leur gentillesse, leur aide et leurs précieux conseils, Karine je te souhaite beaucoup de

courage pour ta dernière année de thèse et enfin merci à **Jérôme** pour son humour et son aide au microscope.

Je tiens maintenant à remercier les thésards et anciens thésards, aujourd'hui docteurs, que j'ai côtoyés durant ma thèse.

Manon, j'ai beaucoup de chance de t'avoir rencontrée et d'avoir appris à te connaître. Tu es une fille formidable et une amie en or. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté durant ma thèse mais je vais quand même essayer ! Merci d'avoir été présente durant ces trois années de thèse, de m'avoir écoutée, conseillée, remontée le moral et fait rire quand je me décourageais ou que j'avais un coup de blues. Je n'y serais jamais arrivée sans ton aide, ta gentillesse et ta bonne humeur communicante. Merci pour toutes les pauses Rico, nos discussions non scientifiques, nos fous rires tard le soir au labo, et les weekends au labo (quand on s'est retrouvé enfermé dehors et que Robin nous a sauvé !). Je tenais surtout à te remercier pour toutes les journées shopping, les demi-litres de Spritz en terrasse à refaire le monde, les ciné (avec des films plus ou moins chelou !), les restos, l'Italie, la piscine le vendredi soir, le concert de Julien Doré (c'est toi qui m'a fait devenir une groupie !), etc... Merci d'être encore là même à distance pour me soutenir en cette fin de thèse même si ta présence au labo m'a beaucoup manqué. C'est dommage que tu ne puisses pas être là le jour de la soutenance mais je suis tellement, tellement contente que tu aies été acceptée en médecine et que tu t'y plaises !!! Tu le mérites tellement et tu vas réussir, j'en suis sûre ! J'espère de tout cœur qu'on ne perdra pas contact et je te souhaite plein de réussite dans tes études et de bonheur dans ta vie !

Gwen, je suis heureuse de t'avoir rencontrée et de t'avoir vue évoluer au cours de ces années, toi qui avait peur des enfants te voilà maman d'une petite fille superbe ! Merci pour tout ce que tu m'as apporté durant cette thèse, ta gentillesse, ton humour, tes conseils et ton écoute. Je vous souhaite à tous les trois beaucoup de bonheur, d'amour et une belle réussite professionnelle.

Bastien, c'est grâce à toi que je me suis si vite et bien intégrée dans l'équipe 7. Merci pour toutes les discussions enflammées le matin avec Stéphan avant que tout le monde arrive ! Merci également d'avoir eu pitié de moi et de m'avoir conduit au labo quand j'avais la flemme de prendre le bus, ou qu'il y avait la grève, avant d'avoir un scooter. Félicitations pour ta belle réussite professionnelle et je te souhaite beaucoup de bonheur et de succès dans tous tes projets (et ils sont nombreux !).

Elodie, je suis très contente d'avoir fait ta connaissance, tu es vraiment une personne gentille et attachante. Je te souhaite plein de courage et réussite pour ta thèse. J'espère qu'on continuera à parler fringues et sacs (un jour on arrivera à l'avoir ce Chloé, tu verras !!).

Robin, malgré toutes les galères qui te sont arrivées durant ta thèse, tu as toujours su rebondir, garder le sourire et ton sens de l'humour. Chapeau ! Je te souhaite beaucoup de succès dans tes études dentaires, j'espère que ça te plaira et t'épanouira.

Ruxanda, j'ai partagé avec toi mes dernières semaines de rédaction du manuscrit de thèse isolée au fin fond du centre ! Pour toi c'était le début, courage tu tiens le bon bout !! Merci pour ta présence et ton réconfort dans ces derniers moments difficiles ! Je te souhaite bonne chance pour la fin de la rédaction, la soutenance et bonne continuation pour la suite.

Gwen LeMenn, je voulais te remercier pour les discussions qu'on a eu au détour d'un couloir et qui m'ont fait sentir que je n'étais pas seule ! J'espère que la rédaction de ta thèse se passe bien et que tu t'en sors. Bon courage pour la suite !

Je voudrais aussi remercier toutes les équipes, les plateformes du C3M et toutes les personnes que j'ai pu croiser durant ma thèse et qui m'ont fait profiter de leurs connaissances.

Pour finir avec ces remerciements je tiens à remercier ma famille et mes amis.

Charlène, Elodie et Justine, même si c'est trop compliqué pour que vous soyez là le jour de la soutenance, vous êtes là par la pensée. Et on se retrouvera toutes pour la soutenance de Charlène ! J'ai l'impression que c'était hier que l'on finissait notre master à Lyon ! Malgré notre éloignement géographique, on a su garder un lien et se retrouver une fois par an le temps d'un long weekend. Si cette année, c'était impossible, j'espère qu'on aura bientôt l'occasion de recommencer ça ! Je vous remercie d'être toujours là malgré la distance et j'ai hâte de vous voir !

Anaïs, que de chemin parcouru depuis le collège et que d'aventures (pas toujours avouables) !! Je te remercie de toujours être là, je sais que malgré la distance je peux toujours compter sur toi ! J'espère qu'une fois rentrée en Haute Savoie on pourra se voir plus souvent car on a du temps à rattraper.

Jason, je te remercie d'être toujours présent dans ma vie après toutes ces années et malgré tout ce qu'on a vécu durant ces 3 années de thèse. Merci de m'avoir toujours soutenue et suivie à chaque étape et merci pour tous les bons moments qu'on a passés depuis 10 ans. Tu as su supporter et tolérer mon caractère pas toujours évident et très changeant, surtout durant les semaines de rédaction quand je passais ma frustration et mes nerfs sur toi ! Merci de me faire rire quand je suis triste, de m'encourager quand je baisse les bras et de croire en moi quoi que je fasse ! Tu sais que je ne suis pas douée pour les démonstrations sentimentales mais je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu fais pour moi et m'apporte au quotidien depuis toutes ces années.

Mémé et pépé, je vous remercie pour votre coup de fil hebdomadaire du dimanche soir pour vous assurer que tout va bien à Nice, qu'il ne fait pas trop chaud, que le travail se passe bien et me donner des nouvelles des cousines. Malheureusement, vous ne pourrez pas être présent à la soutenance mais je sais que vous penserez à moi. J'ai hâte de rentrer pour vous voir plus souvent, me faire inviter à manger et faire de la couture avec toi mémé !

Tata Lalo et Camille (Molle), ma tata et ma cousine d'amour. Je vous remercie d'avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance, ça me touche énormément. Je suis trop heureuse et impatiente de vous voir !! Tata, tu étais présente au moment où j'ai commencé la rédaction et je te remercie de m'avoir soutenue et d'être venue faire des pauses rico avec moi. C'est trop dommage qu'**Enzo** n'ait pas pu venir... Même si vous êtes loin et qu'on se voit moins qu'avant rien n'efface ce lien familial si fort qui nous uni tous. Je vous aime fort tous les trois.

Hélène (Lays) et **Cécile** (Kiz), vous êtes bien plus que des sœurs. Je vous remercie pour votre présence et votre complicité au quotidien et pour tous les fous rires ! Je sais que je peux compter sur vous pour tout et n'importe quoi et n'importe quand ! Je ne vous le dis pas souvent mais je suis fière de vous et de ce que vous avez accompli jusque-là ! Lays, je te souhaite plein de bonheur avec Francis, j'ai trop hâte de vous aider à organiser votre mariage !! Kiz, j'ai hâte de revenir habiter à la maison avec toi, ça va y aller les rico et les séries Netflix ! Je vous aime de tout mon cœur les bibiches (comme dirait Mouni) ! **Francis**, merci d'être venu de Lyon pour me voir défendre ma thèse, j'apprécie énormément. Je suis très heureuse que vous vous soyez trouvé avec Lays !

Papa (Poupou) et **Maman** (Mouni), je ne vous remercierais jamais assez pour tout votre soutien à tous les niveaux. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours donnée la chance de faire les études que je voulais. Merci de me soutenir dans tout ce que j'entreprends et d'être là aussi quand je me plante... Merci aussi de financer toutes en envie shopping (je sais elles sont nombreuses) !! Poupou, je te remercie de toujours répondre présent quand j'ai un problème de bricolage ou de mécanique et même à distance, au téléphone, de m'aider à le résoudre ! Merci de m'avoir donnée ta force de caractère (avec ses bons et moins bons côtés !). J'ai hâte de rentrer pour qu'on puisse faire du paddle, du vélo, des randonnées, du bateau, du ski, regarder la moto le dimanche... Mouni, je te remercie pour tout amour infini, ta gentillesse et d'être toujours présente dans les bons et les mauvais jours. Merci de m'avoir soutenue dans cette étape pas toujours facile loin de vous quatre... Vous m'avez manqué tous les jours, j'ai hâte de rentrer près de vous ! Merci d'avoir été une des rares personnes à lire ma thèse du début à la fin (même si tu n'as pas tout compris !) et d'avoir corrigée la grammaire et l'orthographe. J'en profite aussi pour te remercier profondément d'avoir sacrifiée ta carrière professionnelle pour nous élever, je me rends compte du privilège que j'ai

eu. Merci à vous deux pour tout l'amour, le bonheur et l'éducation que vous nous donné, j'espère sincèrement vous rendre fière de moi. Je vous aime de tout mon cœur !

Table des matières

Table des illustrations	18
Liste des abréviations.....	20
INTRODUCTION	23
Partie 1 : Prostate et cancer	24
Chapitre 1 : La prostate : une glande au carrefour uro-génital	24
1. Description générale et localisation de la prostate	24
1.1. Anatomie de la prostate	24
1.1.1. Anatomie externe de la prostate	24
1.1.2. Anatomie interne de la prostate	25
1.1.3. Anatomie zonale de la glande prostatique	26
1.2. Structure histologique de la glande prostatique	27
1.3. Vascularisation et innervation de la prostate	29
2. Fonction de la prostate.....	30
3. Les principales pathologies liées à la prostate.....	31
3.1. La prostatite	31
3.2. L'hyperplasie bénigne de la prostate	31
Chapitre 2 : Le cancer de la prostate	33
1. Epidémiologie	33
2. Facteurs de risque	37
2.1. L'âge	37
2.2. Facteurs héréditaires et familiaux	37
2.3. Facteurs ethno-géographiques	38
2.4. Les facteurs de risques exogènes	39
2.4.1. L'alimentation	39
2.4.2. Le mode de vie	40
3. Etiologie du cancer de la prostate.....	42
4. Dépistage et diagnostic du cancer de la prostate	43
4.1. Dépistage précoce	43
4.1.1. Outils du dépistage	44
4.1.1.1. Le toucher rectal	44
4.1.1.2. Le dosage du PSA	44
4.2. Diagnostic du cancer de la prostate	45
4.2.1. Biopsies de la prostate	45
4.2.2. Extension loco-régionale : L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	45

4.2.3.	Extension à distance : recherche de métastases	45
5.	Classification du cancer de la prostate.....	46
5.1.	Score de Gleason	46
5.2.	Classification TNM	47
5.3.	La classification d'Amico	48
6.	Traitement du cancer de la prostate.....	48
6.1.	Traitements différés : surveillance active	49
6.2.	Traitements curatifs	49
6.2.1.	La prostatectomie totale	49
6.2.2.	La radiothérapie externe	50
6.2.3.	La curiethérapie	50
6.3.	Traitements palliatifs	50
6.3.1.	L'hormonothérapie	50
6.3.2.	La chimiothérapie	51
6.3.3.	Nouvelles thérapies dans le traitement du cancer de la prostate	52
Partie 2 : Métabolisme et cancer de la prostate		53
1.	Métabolisme normal de la prostate saine.....	53
2.	Métabolisme du cancer de la prostate.....	55
2.1.	Métabolisme du glucose	55
2.1.1.	La voie de la glycolyse	55
2.1.2.	La voie des pentoses phosphates	58
2.1.3.	La glycolyse dans les cellules cancéreuses : l'effet Warburg	59
2.1.4.	L'effet Warburg dans le cancer de la prostate	61
2.2.	Métabolisme mitochondrial	61
2.2.1.	Histoire	61
2.2.2.	Généralités	62
2.2.3.	Structure et composition des mitochondries	62
2.2.4.	Dynamique mitochondriale	64
2.2.5.	Biogénèse mitochondriale	65
2.2.6.	Les voies métaboliques mitochondriales	66
2.2.6.1.	Le cycle de Krebs	66
2.2.6.2.	La phosphorylation oxydative	68
2.2.7.	Métabolisme mitochondrial et cancer	72
2.2.8.	Métabolisme mitochondrial et cancer de la prostate	73
2.3.	Métabolisme lipidique	74
2.3.1.	La lipogenèse <i>de novo</i>	74

<i>Lipogenèse et cancer</i>	75
2.3.2. La β-oxydation	77
<i>β-oxydation et cancer</i>	78
2.3.3. Métabolisme lipidique et cancer de la prostate	79
2.4. Métabolisme de la glutamine	79
2.4.1. Glutaminolyse	80
2.4.2. Métabolisme de la glutamine et cancer	81
2.4.3. Métabolisme de la glutamine et cancer de la prostate	84
2.5. Métabolisme des polyamines	85
2.5.1. Structure des polyamines	85
2.5.2. Synthèse des polyamines	86
2.5.3. Interconversion des polyamines	87
2.5.4. Catabolisme terminal des polyamines	88
2.5.5. Régulation du métabolisme des polyamines	88
2.5.5.1. Les enzymes clés	88
2.5.5.1.1. L'ornithine décarboxylase (ODC).....	89
2.5.5.1.2. La S-adénosyl-méthionine décarboxylase (AdoMetDC)	91
2.5.5.1.3. La spermidine/spermine N1-acétyl-transférase (SSAT).....	92
2.5.5.2. Le transport des polyamines	93
2.5.6. Fonctions biologiques des polyamines	94
2.5.6.1 Stabilisation et modulation de la conformation de l'ADN par les polyamines ...95	
2.5.6.2 Régulation de l'expression de gènes par les polyamines	96
2.5.6.2.1. Régulation de la transcription des gènes par les polyamines.....	96
2.5.6.2.2 Régulation de la traduction des ARN par les polyamines.....	97
2.5.6.3 Polyamines et microtubules	97
2.5.6.4 Polyamines et membranes cellulaires	98
2.5.6.4.1. Polyamines et phospholipides membranaires.....	98
2.5.6.4.2. Polyamines et jonctions cellulaires	98
2.5.6.4.3. Polyamines et canaux ioniques.....	99
2.5.6.4.3.1. Polyamines et récepteurs du glutamate.....	99
2.5.6.4.3.2. Polyamines et canaux Kir	99
2.5.6.5. Polyamines et prolifération cellulaire	99
2.5.6.6. Polyamines et apoptose	100
2.5.7. Effets biologiques des polyamines	101
2.5.7.1. Polyamines et appareil digestif	101
2.5.7.2. Polyamines et système immunitaire	102

2.5.7.3.	Polyamines et système nerveux central	103
2.5.7.4.	Polyamines et système reproducteur	103
2.5.8.	Polyamines et pathologies	103
2.5.8.1.	Polyamines et maladies héréditaires	103
2.5.8.2.	Polyamines et cancers	104
2.5.8.2.1.	Cibler la biosynthèse des polyamines	104
2.5.8.2.1.1.	ODC et cancers	104
2.5.8.2.1.1.1.	ODC comme cible thérapeutique	105
2.5.8.2.1.1.2.	ODC comme cible dans la prévention du cancer	107
2.5.8.2.1.2.	ODC dans le cancer de la prostate	107
2.5.8.2.1.3.	Autres enzymes de la synthèse des polyamines et cancers	108
2.5.8.2.1.3.1.	AdoMetDC et cancers	108
2.5.8.2.1.3.2.	Spermidine et spermine synthases et cancers	109
2.6.	Principaux régulateurs des voies métaboliques dans le cancer	109
2.6.1.	La voie PI3K/AKT/mTOR	110
2.6.2.	La voie AMPK	112
2.6.3.	HIF-1	113
2.6.4.	c-MYC	115
Partie 3 : Le coactivateur transcriptionnel PGC-1α		117
1.	Découverte, structure et fonction des PGC-1	117
1.1.	Les gènes de la famille de PGC-1α	117
1.2.	Interaction de PGC-1α avec des facteurs de transcription	119
1.3.	Interaction de PGC-1α avec la machinerie transcriptionnelle	122
2.	Régulation de l'activité de PGC-1 α	123
3.	Rôles de PGC-1 α dans le métabolisme cellulaire	126
3.1.	PGC-1α dans la régulation du métabolisme oxydatif mitochondrial	127
3.1.1.	PGC-1α et biogénèse mitochondriale	127
3.1.2.	PGC-1α et phosphorylation oxydative	128
3.1.3.	PGC-1α et β-oxydation	128
3.1.4.	PGC-1α et métabolisme du glucose	129
3.1.5.	PGC-1α et ROS	129
4.	Rôle de PGC-1 α dans le cancer	130
4.1.	PGC-1α dans le mélanome	130
4.2.	PGC-1α dans le cancer du sein	132
4.3.	PGC-1α dans le cancer du pancréas	135
4.4.	PGC-1α dans le cancer de la prostate	136

4.5. PGC-1 α dans les autres types de cancers.....	138
Contexte scientifique et objectifs.....	140
RESULTATS	141
Résumé et publication	142
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	Error! Bookmark not defined.
ANNEXES	Error! Bookmark not defined.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	Error! Bookmark not defined.

Table des illustrations

Partie 1 : Prostate et cancer

Chapitre 1 : La prostate : une glande au carrefour uro-génital

Figure 1: Localisation anatomique de la prostate dans l'appareil génital masculin	24
Figure 2 : Anatomie externe de la prostate	25
Figure 3 : Anatomie interne de la prostate	26
Figure 4 : Anatomie zonale de la prostate	27
Figure 5 : Structure histologique de la glande prostatique.....	29

Chapitre 2 : Le cancer de la prostate

Figure 6 : Taux d'incidence mondial du cancer de la prostate en 2012	33
Figure 7 : Classement des tumeurs solides par incidence estimée en 2015 en France métropolitaine selon le sexe	34
Figure 8 : Taux d'incidence du cancer de la prostate à l'échelle départementale entre 2008 et 2010	34
Figure 9 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer de la prostate de 1980 à 2012 en France métropolitaine	34
Figure 10 : Taux de mortalité mondiale du cancer de la prostate en 2012	35
Figure 11 : Classement des tumeurs solides par mortalité estimée en 2015 en France métropolitaine selon le sexe	36
Figure 12 : Taux de mortalité du cancer de la prostate à l'échelle départementale entre 2011 et 2013	36
Figure 13 : Survie nette du cancer de la prostate à 5 et 10 ans en France métropolitaine, par âge	36
Figure 14 : Représentation schématisée des grades permettant le calcul du score de Gleason	47
Figure 15 : Score de Gleason (ancien et actuel)	47
Figure 16 : Principaux stades de la classification TNM actuelle	48
Figure 17 : Classification d'Amico	48

Partie 2 : Métabolisme et cancer de la prostate

Figure 18 : Régulation des voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie et le maintien des cellules épithéliales prostatiques	54
Figure 19 : Voie de la glycolyse	58
Figure 20 : Représentation schématisée des différences observées entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie.....	61
Figure 21 : Interactions de PGC-1 α avec ses différents partenaires dans la.....	66
Figure 22 : Le cycle de Krebs et ses connexions avec les autres voies métaboliques	68
Figure 23 : La phosphorylation oxydative	71
Figure 24 : Voie de biosynthèse des acides gras	75
Figure 25 : La β -oxydation.....	78
Figure 26 : Le métabolisme de la glutamine	81
Figure 27 : Structure schématisée des polyamines	86
Figure 28 : La voie de synthèse des polyamines	87
Figure 29 : Mécanismes de régulation d'ODC.....	90
Figure 30 : Les mécanismes de transports des polyamines	94

Figure 31 : Fonctions biologiques des polyamines	95
Figure 32 : Implications des voies PI3K/AKT/mTOR et AMPK dans le métabolisme des cellules tumorales	112
Figure 33 : Régulations et rôles de HIF-1 dans le métabolisme des cellules tumorales.....	114
Figure 34 : Implications de c-MYC dans la régulation du métabolisme des cellules tumorales	116

Partie 3 : Le co-activateur transcriptionnel PGC1- α

Figure 35 : Homologie de structure entre les membres de la famille PGC-1.....	118
Figure 36 : Structure des coactivateurs de la famille PGC-1	119
Figure 37 : Site de fixations de certaines protéines interagissant avec PGC-1 α . FTs : Facteurs de transcription	122
Figure 38 : Mécanisme d'action de PGC-1 α dans la synthèse d'ARNm	123
Figure 39 : Mécanismes de régulation de l'expression (a) et de l'activité (b) de PGC-1 α	126
Figure 40 : Implication de PGC-1 α dans la biogénèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et la β -oxydation.....	129
Figure 41 : Implications de PGC-1 α dans le mélanome	132
Figure 42 : Rôles de PGC-1 α dans le cancer du sein	135
Figure 43 : Rôles de PGC-1 α dans le cancer du pancéas.....	136
Figure 44 : Rôles de PGC-1 α dans le cancer de la prostate.....	138

Résultats

Figure 45 : Dosages de la consommation de glutamine et glucose et de la production de glutamate et lactate dans les DU145 et les LNCaP grâce à l'analyseur biochimique YSI2700.....	Error! Bookmark not defined.
Figure 46 : Niveaux d'expressions de mTOR et AMD1 dans les cellules tumorales prostatiques sous exprimant PGC-1 α	Error! Bookmark not defined.

Liste des abréviations

1,3-BPG 1,3-bisphosphoglycérate	CSC Cellule souche cancéreuse
3PG 3-phosphoglycérate	DAO Diamine-oxydase
ACC Acetyl-CoA carboxylase	dcSAM S-adénosyl-S-méthyl décarboxylée
ACLY ATP citrate lyase	DFMO α -difluorométhylornithine
ADNmt ADN mitochondrial	DHAP Dihydroxyacétone phosphate
AdoMetDC SAM-décarboxylase	Domaine RS Domaine riche en serine/arginine
AMP Adenosine monophosphate	DRIP Vitamin D receptor-interacting protein
AMPc Adénosine monophosphate cyclique	EGFR Epidermal growth factor receptor
AMPK Adenosine monophosphate-activated protein kinase	eIF5A Eukaryotic initiation factor 5A
ANT Transporteur de nucléotides adényliques	ER Estrogen receptor
AP-1 Activator protein 1	ERK Extracellular signal-regulated kinases
APAO Acétylpolyamine-oxydase	ERR Estrogen-related receptor
APC Adenomatous polyposis coli	F1,6BP Fructose-1,6-biphosphate
AR Récepteur aux androgènes	F6P Fructose-6-phosphate
ATF2 Activating transcription factor 2	FAD Flavine adénine dinucléotide
ATP Adénosine triphosphate	FAS Fatty acid synthase
AZ Ornithine décarboxylase antizyme	FDG Fluorodéoxyglucose
AZI Inhibiteur de l'antizyme	FOXO1 Forkhead box protein O1
CaMKIV Ca ²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase IV	FXR Farnesoid X
CaP Cancer de la prostate	G3P Glycéraldéhyde-3-phosphate
CBP CREB-binding protein	G6P Glucose-6-phosphate
CDK Cyclin-dependent kinase	GABA γ -aminobutyrique
CK Cytokératines	GCN5 Lysine acetyltransferase 2A
CPT L-carnitine palmitoyltransferase	GLS Glutaminolyse
CREB C-AMP Response Element-binding protein	GLUT Glucose transporter
CRPC Cancer de la prostate résistant à la castration	GR Glucocorticoid receptor
	GSK3β Glycogen synthase kinase 3 beta
	GTP Guanosine triphosphate

HA Hommes par année	PIP3 Phosphatidylinositol triphosphates
HBP Hyperplasie bénigne de la prostate	PK Pyruvate kinase
HCF Host cell factor	PKA Protéine kinase A
HIF-1 Hypoxia inducible factors 1	PLP Phosphate de pyridoxal
HNF4α Hepatocyte nuclear factor-4 α	PPAR Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
HuR Hu antigène R	PPP Voie des pentoses phosphates
IMC Indice de masse corporelle	PRC PGC-1-Related Coactivator
INCA Institut national du cancer	PSA Prostatic specific antigen
IRM Imagerie par résonance magnétique	PSCs Cellules souches prostatiques
LDH Lactate déshydrogénase	PTEN Phosphatase and TENsin homolog
LXRα Liver X récepteur alpha	PTP Permeability transition pore
MEF2C Myocyte enhancer factor 2C	Put Putrescine
MITF Microphthalmia-associated Transcription Factor	PXR Prénagène X
MME Membrane mitochondriale externe	R5P Ribose-5-phosphate
MMI Membrane mitochondriale interne	ROS Espèces réactives de l'oxygène
mTOR Mechanistic target of rapamycin	RXRα Retinoid X récepteur α
NAD Nicotinamide adenine dinucleotide	SAM S-Adénosyl-méthionine
NRF Nuclear respiratory facto	SBAU Symptômes urinaires du bas appareil
ODC Ornithine décarboxylase	SIRT1 Sirtuin 1
OXPHOS Phosphorylation oxydative	SMO Spermine oxydase
p38 MAPK p38 mitogen-activated protein kinase	Spd Spermidine
PDH Pyruvate déshydrogénase	Spm Spermine
PDK Pyruvate déshydrogénase kinase	SRC-1 Steroid récepteur coactivator-1
PEP Phosphoénolpyruvate	SREBP Sterol regulatory element-binding proteins
PET Tomographie à émission de positons	SSAT Spermidine/spermine N1-acétyl-transférase cytosolique
PFK Phosphofructokinase	STE Système de transport d'électrons
PGC-1α Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	TFAM Transcription factor A, mitochondrial
PI3K Phosphoinositide 3-kinase	TGFβ Transforming growth factor β
PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	TNM Tumeur, Nodule, Métastase

TR Toucher rectal

TRAP Thyroid receptor-associated protein

TSC2 Tuberous sclerosis complex 2

VDAC Voltage-dependant anion channel

VEGF Vascular endothelial growth factor

VHL Von Hippel-Lindau

YY1 Yin yang-1

INTRODUCTION

Partie 1 : Prostate et cancer

Chapitre 1 : La prostate : une glande au carrefour uro-génital

1. Description générale et localisation de la prostate

1.1. Anatomie de la prostate

La prostate est la glande exocrine et fibromusculaire la plus volumineuse de l'appareil urogénital masculin (Seisen et al., 2012). De la taille d'un pois à la naissance, elle se développe rapidement à la puberté sous l'influence de l'hormone mâle, la **testostérone** (Villers et al., 1991). Elle atteint sa taille et sa forme normales, comparable à celle d'une châtaigne, chez l'homme de 20 ans où elle pèse environ 20g pour un volume de 25cm³, une hauteur de 3cm et une largeur de 4cm (Hermabessière, 1993). Elle est de couleur blanchâtre à rose pâle et de consistance assez ferme, élastique (Hermabessière). Une deuxième croissance prostatique apparaît chez la plupart des hommes autour de 50 ans où elle devient progressivement hypertrophiée.

La glande prostatique se situe dans la cavité pelvienne, juste sous la vessie, en avant du rectum et en arrière de la symphyse pubienne (Hermabessière). Elle est localisée au carrefour des voies urinaires et génitales (Figure 1).

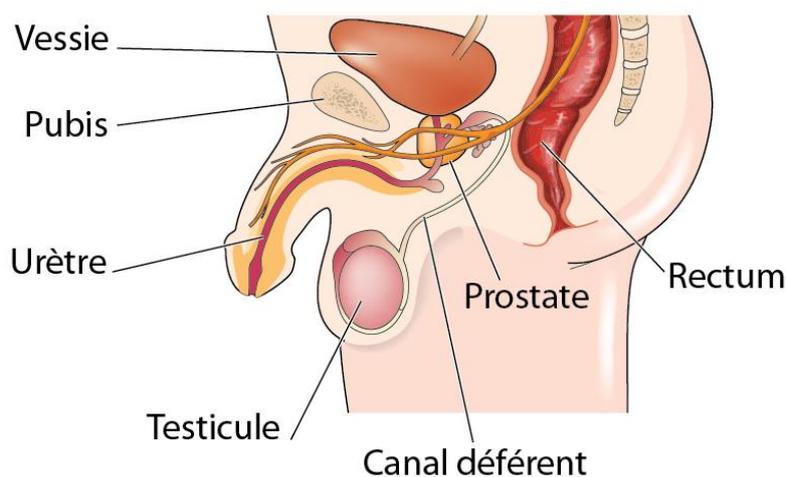


Figure 1: Localisation anatomique de la prostate dans l'appareil génital masculin
(Source : <http://www.centre-europeen-prostate-paris.com/anatomie-physiologie-prostate.html>)

1.1.1. Anatomie externe de la prostate

D'un point de vue externe, la prostate se compose des parties suivantes (McNeal, 1972; Villers et al., 1991; Hermabessière) (Figure 2) :

- La face ventrale, plane, presque verticale
- La face dorsale, convexe
- L'apex prostatique, plus étroit et en position basse, duquel émerge l'urètre, repose sur le plancher pelvien et est en contact étroit avec les muscles élévateurs de l'anus
- La base, plus large et correspondant à la partie supérieure, soutient la vessie et se divise en 2 portions : une ventrale entourant la partie supérieure de l'urètre, appelée urètre prostatique et une dorsale où les vésicules séminales, situées sur la face postérieure de la prostate, débouchent dans la prostate pour se relier aux canaux déférents et former ainsi les canaux éjaculateurs.

La prostate est également enveloppée d'une capsule composée d'une couche interne de cellules musculaires lisses et d'une couche externe de tissu conjonctif (Ayala et al., 1989).

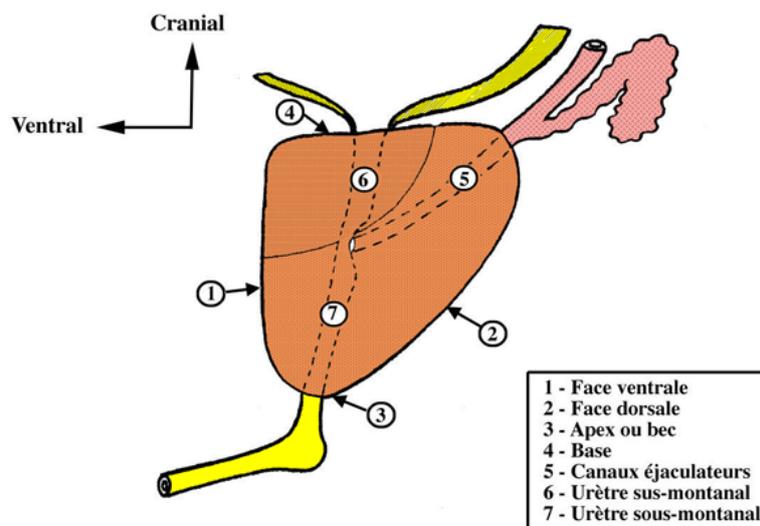


Figure 2: Anatomie externe de la prostate

(Source : <http://www.anat-ja.com/PeritoineSous/OGH/Prostate.htm>)

1.1.2. Anatomie interne de la prostate

La prostate entoure une portion de l'urètre, allant du col vésical de la vessie jusqu'au sphincter strié situé sous l'apex prostatique (Figure 3). Cette partie de l'urètre se nomme urètre prostatique (Hutch and Rambo, 1970). Au niveau proximal de la prostate, l'urètre prostatique est entouré par des fibres musculaires lisses formant ainsi le sphincter lisse urétral. La contraction réflexe de celui-ci au moment de l'éjaculation empêche ainsi l'éjaculation rétrograde (Farnsworth, 1999; Hayward and Cunha, 2000; Seisen et al., 2012).

Au niveau de l'apex de la prostate, l'urètre est entouré par un sphincter en forme de fer à cheval et composé de fibres musculaires striées (Figure 3). Ce sphincter intrinsèque de l'urètre s'insinue au niveau de la paroi distale de l'urètre prostatique et assure en grande partie la continence urinaire par commande volontaire (Heinzer et al., 1999).

A mi-chemin entre la base et l'apex de la prostate se trouve le *Colliculus* séminal, petit monticule faisant saillie sur la paroi postérieure de l'urètre prostatique (McNeal, 1972) (Figure 3). Au centre du *Colliculus* séminal s'ouvre l'utricule prostatique, un canal borgne dirigé vers le haut et l'arrière dans la prostate, qui est un résidu des canaux de Müller. Dans le *Colliculus* séminal, de part et d'autre de l'utricule prostatique s'abouchent les canaux éjaculateurs, formés par la convergence des canaux déférents et des vésicules séminales au niveau de la base prostatique (Farnsworth, 1999; Hayward and Cunha, 2000; Villers et al., 1991).

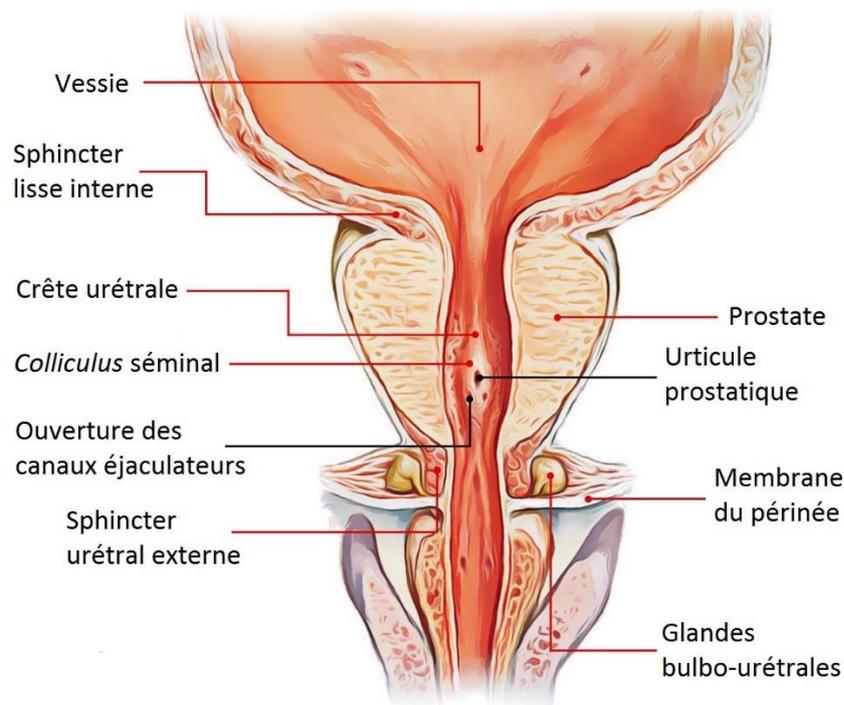


Figure 3: Anatomie interne de la prostate

(Source : <https://www.earthslab.com/anatomy/verumontanumseminal-colliculus/>)

1.1.3. Anatomie zonale de la glande prostatique

Le modèle anatomique reconnu à l'heure actuelle est celui décrit en 1968 par Mc Neal et al (McNeal, 1968). Il établit l'anatomie zonale de la prostate en prenant pour repères anatomiques l'urètre prostatique et les canaux éjaculateurs et prend en compte les origines embryologiques différentes des zones (McNeal, 1984) (Figure 4). Ce modèle remplace les nombreuses études sur le sujet dont la précédente, celle du modèle des lobes prostatiques de Lowsley et al. en 1915 (Lowsley, 1915).

Bien qu'étant macroscopiquement homogène et composé majoritairement de tissu glandulaire tubulo-alvéolaire et de fibres musculaires lisses, le modèle de Mc Neal divise la prostate en quatre zones anatomiquement distinctes (McNeal, 1980, 1981, 1988; Villers et al., 1991) :

- La zone périphérique englobe la partie distale de l'uretère prostatique et se prolonge en entonnoir latéralement et postérieurement à l'uretère prostatique. Elle est donc à l'origine de l'intégralité de l'apex prostatique et d'une petite partie de la base de la prostate. Cette zone constitue 70% du poids total de la glande.
- La zone centrale entoure les canaux éjaculateurs et s'insère dans l'entonnoir formé par la zone périphérique constituant ainsi la majeure partie de la base de la prostate. Cette zone représente 25% de la masse prostatique glandulaire totale.
- La zone de transition est composée de deux lobes entourant l'urètre prostatique proximal, en amont du *Colliculus* séminal. Cette zone représente 5% de la masse prostatique glandulaire totale.
- Le stroma fibromusculaire est situé sur la face ventrale de la prostate, en avant de l'uretère prostatique. Cette zone, dépourvue de tissu glandulaire, est composée uniquement de fibres musculaires striées et lisses.

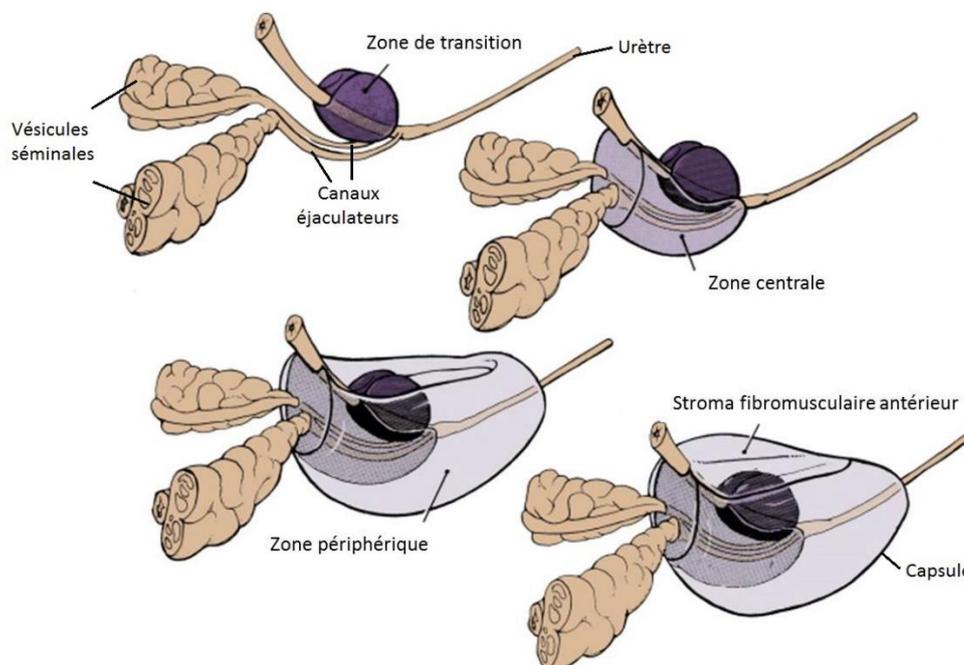


Figure 4: Anatomie zonale de la prostate
(Adapté de McNeal et al., 1988)

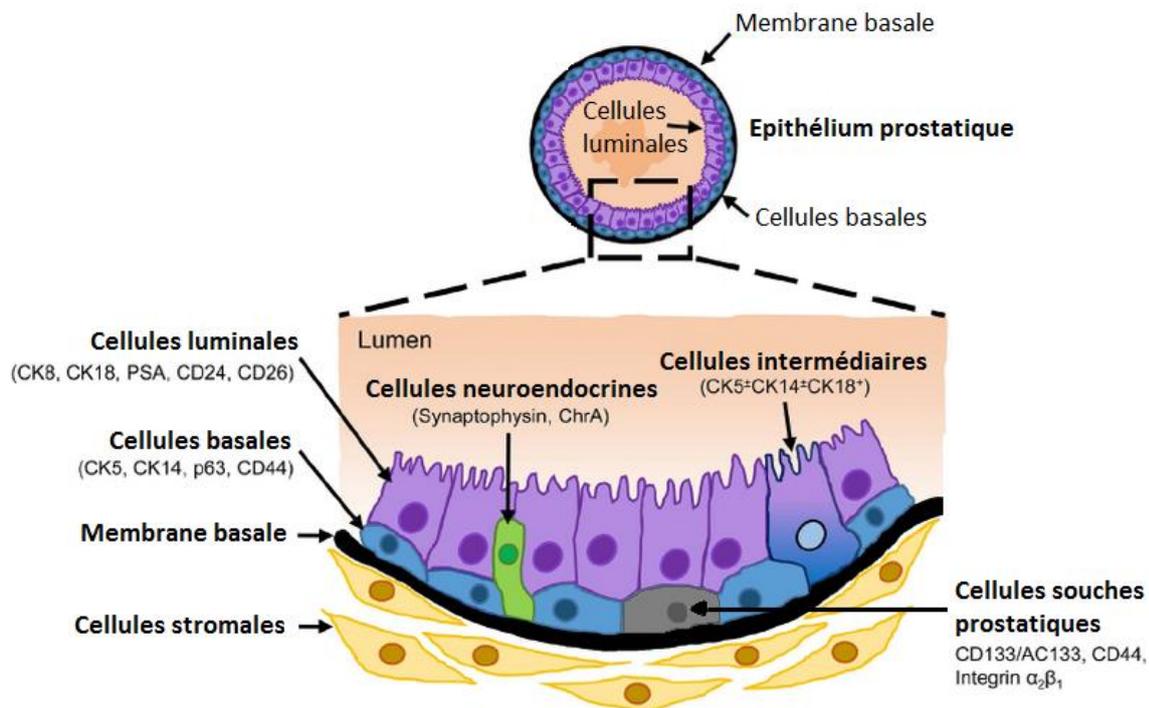
1.2. Structure histologique de la glande prostatique

Le tissu glandulaire prostatique est constitué d'un parenchyme épithélial et d'un stroma conjonctif (Figure 5). Dans l'épithélium prostatique se trouve différents types de cellules épithéliales :

- Les cellules luminales sécrétrices sont des cellules cubiques différenciées non prolifératives formant la couche interne de la glande. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes (AR), leur survie et leur activité sécrétoire sont donc sous le contrôle des androgènes. Elles produisent et libèrent des protéines prostatiques dans la lumière de la glande comme l'antigène spécifique de la prostate (PSA) (Armbruster, 1993; Bonkhoff et al., 1994), des polyamines, la phosphatase acide prostatique et des prostaglandines. Les cellules luminales sont caractérisées par l'expression, en plus de AR (De Marzo et al., 1998), de CD24 et CD26 à leur surface (Liu et al., 2004), ainsi que les cytokératines (CK) 8 et 18 (Sherwood et al., 1990).
- Les cellules basales sont des précurseurs prolifératifs formant une couche continue de cellules autour des cellules luminales et en contact avec la membrane basale. Elles servent de barrière entre l'épithélium et le compartiment stromal. Les cellules basales ne sont pas sous le contrôle des androgènes pour leur survie car elles sont dépourvues de AR (De Marzo et al., 1998). Elles se différencient des cellules luminales par l'expression spécifique de CD44 (Alam et al., 2004; Liu and True, 2002), p63 (Signoretti et al., 2000; Yang et al., 1998), CK5 et CK14 (Sherwood et al., 1990) et le manque d'expression de PSA (Bonkhoff et al., 1994).
- Les cellules souches épithéliales prostatiques (PSCs), identifiées récemment, sont peu nombreuses et dispersées dans la couche basale de l'épithélium prostatique (Chua et al., 2014; Garraway et al., 2010; Goldstein et al., 2010; Karthaus et al., 2014). Elles ont la capacité de se différencier dans tous types cellulaires formant l'épithélium prostatique (Rybak et al., 2015). Elles sont indépendantes des androgènes pour leur survie et ont une forte capacité de prolifération avec un faible niveau d'apoptose. Les PSCs sont caractérisées, à l'heure actuelle, par l'expression de CD44 (Hurt et al., 2008; Patrawala et al., 2006), un haut niveau d'expression à leur surface de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Collins et al., 2001) et CD133 (Richardson et al., 2004). Ces cellules se différencient soit en cellules basales soit en cellules intermédiaires.
- Les cellules intermédiaires sont des progéniteurs avec une capacité d'amplification transitoire situées entre les cellules basales et luminales (Ousset et al., 2012; Xue et al., 1998). Elles sont sensibles aux androgènes pour leur prolifération et leur différenciation mais n'en sont pas dépendantes pour leur survie. Ces cellules expriment des marqueurs à la fois des cellules basales et des cellules luminales tels que CK5, CK14 et CK18 et peuvent se différencier soit en cellules luminales sécrétrices soit en cellules neuroendocrines (Ousset et al., 2012; Xue et al., 1998).

- Les cellules neuroendocrines sont quiescentes, rares, moins de 1%, et dispersées entre les cellules basales et luminales (Amorino and Parsons, 2004; Noordzij et al., 1995; Parimi et al., 2014). Elles sécrètent des hormones et neuropeptides capables de réguler la croissance, la différenciation et les sécrétions de l'épithélium prostatique. Elles expriment des marqueurs spécifiques comme la chromogranine A (ChrA), la synaptophysine et l'énolase spécifique aux neurones mais n'expriment ni AR ni le PSA (Amorino and Parsons, 2004; Parimi et al., 2014).

L'épithélium prostatique est donc un ensemble de cellules androgéno-dépendantes, de cellules androgéno-indépendantes et de cellules androgéno-sensibles (Hudson et al., 2000; Wang et al., 2001b)



*Figure 5: Structure histologique de la glande prostatique
(Adapté de Rybak et al., 2015)*

1.3. Vascularisation et innervation de la prostate

Les éléments nécessaires à la vascularisation et à l'innervation de la prostate cheminent sur ses faces antérieures et latérales.

La vascularisation de la prostate se fait principalement par l'artère vésicale inférieure qui prend naissance sur l'artère iliaque interne. Les branches urétrales provenant de l'artère vésicale inférieure vascularisent le col vésical, la zone centrale et de transition alors que les branches capsulaires antérieures et postérieures vascularisent la zone périphérique de la prostate. Le drainage veineux prostatique se fait par le plexus de Santorini situé sur les faces antérieures et latérales de la prostate qui se déverse dans les veines iliaques internes (Griffiths, 1889; Raychaudhuri and Cahill, 2008).

L'innervation parasympathique de la prostate se fait par les nerfs splanchniques pelviens et joue un rôle important dans le contrôle de l'activité sécrétoire des cellules luminales. L'innervation sympathique se fait par les branches terminales des plexus nerveux hypogastriques inférieurs et participe à la contraction et la relaxation des cellules musculaires des sphincters prostatiques (Galiano et al., 2010; Raychaudhuri and Cahill, 2008; Walsh and Donker, 2017).

Le drainage lymphatique s'effectue via les nœuds lymphatiques obturateurs, iliaques externes, sacraux et glutéaux inférieurs vers les nœuds iliaques internes.

2. Fonction de la prostate

Sa localisation, au croisement de l'urètre et des canaux éjaculateurs, est à l'origine de sa double fonction urinaire et génitale (Hermabessière; Wein et al., 2015).

En effet, la glande prostatique, avec les vésicules séminales qui s'y abouchent, est impliquée dans la synthèse et l'émission du liquide séminal, composant indispensable du sperme. Les vésicules séminales produisent de 60 à 75% du liquide séminal, riche en éléments nutritifs (fructose, phosphorylcholine, acide ascorbique) il fournit l'énergie nécessaire à la motilité des spermatozoïdes. Les sécrétions prostatiques représentent 20 à 30% du liquide séminal. Elles contiennent des protéases (fibrinolysine, fibrinogénase) qui servent à la liquéfaction de l'éjaculat et des polyamines (spermidine, spermine) qui stimulent la motilité et la suite de la maturation des spermatozoïdes. Elles sont également riches en sels minéraux comme le calcium, le magnésium, le phosphore, le potassium et le zinc, en prostaglandines et en acide citrique qui sont impliqués dans la survie des spermatozoïdes, leur mobilité et leur résistance à l'acidité du vagin. La prostate permet également d'obturer l'urètre pendant l'éjaculation, grâce au sphincter lisse urétral, évitant ainsi le mélange d'urines et de sperme.

Plus indirectement, elle participe également au cycle miction/continence par ses rapports étroits avec l'urètre qui la traverse, sa proximité avec le col vésical de la vessie, le sphincter urétral intrinsèque et les structures de maintien de la vessie que sont les ligaments pubo-vésicaux et l'aponévrose pelvienne. De plus, les fibres musculaires lisses présentes dans la prostate permettent aussi d'éviter la remontée d'urines dans les vésicules séminales lors de la miction.

Enfin, la prostate n'a pas de rôle direct dans l'érection mais est entourée par des pédicules vasculo-nerveux impliqués dans la réponse sexuelle masculine.

De ce fait, les modifications anatomiques de la glande prostatique lors du vieillissement ou en cas d'atteinte pathologique peuvent être à l'origine de dysfonctions sexuelles (fertilité, éjaculation) et de troubles urinaires (Epstein et al., 1991; Fitzpatrick, 2006).

3. Les principales pathologies liées à la prostate

La prostate peut être le centre de trois principales pathologies : l'infection de la prostate ou prostatite, l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) ou adénome de la prostate et le cancer de la prostate.

3.1. La prostatite

Comme son étymologie l'indique, la prostatite est une infection de la glande prostatique (Khan et al., 2017). Elle se développe chez les hommes à tout âge mais affecte principalement les hommes entre 30 et 50 ans. Il existe deux principaux types de prostatites :

- La prostatite chronique est une inflammation de la prostate d'origine non bactérienne mais dont les causes ne sont pas claires (Khan et al., 2017; Sandhu and Tu, 2017). Les symptômes sont présents sur une durée de plusieurs mois et sont principalement des douleurs pelviennes ainsi que des problèmes urinaires et sexuels. C'est le type de prostatite le plus commun chez l'homme, 90-95% des prostatites diagnostiquées mais son traitement est compliqué (Schoeb et al., 2017).
- La prostatite aiguë est une inflammation aiguë d'origine microbienne (Krieger and Thumbikat, 2016). Les symptômes apparaissent soudainement et sont sévères, allant de simples brûlures urinaires à des sepsis sévères. Elle est rare, environ 1% des hommes développeront une prostatite aiguë au cours de leur vie mais nécessite un traitement médical immédiat (antibiothérapie) (Schoeb et al., 2017).

3.2. L'hyperplasie bénigne de la prostate

L'hyperplasie ou hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) aussi appelée adénome prostatique est une augmentation non cancéreuse du volume de la prostate (Bastien et al., 2012; Roehrborn, 2005) pouvant constituer un obstacle à l'écoulement des urines. Elle apparaît chez l'homme au cours du vieillissement et sa prévalence croît fortement avec l'augmentation de l'âge (Lepor, 2005).

Les symptômes de l'HBP sont associés à de nombreux symptômes urinaires du bas appareil (SBAU). Ces symptômes altèrent la qualité de vie des patients et peuvent être à l'origine de complications potentiellement graves. Les SBAU sont fréquemment associés avec une dysfonction sexuelle.

Les différentes alternatives thérapeutiques dépendent de l'importance des SBAU, de l'apparition de complications, et de la préférence du patient (Dhingra and Bhagwat, 2011; Priest et al., 2012). En effet, en cas d'une HBP sans complications et de SBAU minimales, sans altération de la qualité de vie, une surveillance annuelle est suffisante. Dans le cas d'une HBP sans complications mais avec des SBAU modérés/sévères altérant la qualité de vie, un traitement médical est mis en place.

Il existe 3 classes de traitements pour l'HBP : les α -bloquants, les inhibiteurs de la 5-alpha réductase et la phytothérapie. L'objectif du traitement est la réduction des symptômes et l'amélioration de la qualité de vie en réduisant la gêne liée aux symptômes urinaires. En cas d'HBP avec complications ou de SBAU résistant au traitement médical, il est nécessaire de mettre en place une intervention chirurgicale. Il s'agit du traitement curatif de l'HBP. L'objectif principal est d'améliorer la qualité de vie des patients en réalisant l'exérèse de l'adénome.

Chapitre 2 : Le cancer de la prostate

1. Epidémiologie

Avec 1,1 million de nouveaux cas dans le monde en 2012, le cancer de la prostate (CaP) est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme (Jemal et al., 2010; Wong et al., 2016) (Figure 6 ; Source GLOBOCAN). En France, c'est le cancer le plus fréquent chez l'homme, loin devant les cancers du poumon et colorectaux (Source Institut National du Cancer (INCA)) (Figure 7). En effet, il représente 26% de l'incidence de l'ensemble des cancers masculins. Le nombre de nouveaux cas de CaP observés en 2013 s'élevait à 48 427 en France métropolitaine. De plus, les taux départementaux d'incidences varient du simple (53,3/100 000 hommes/ans en Corse) à plus du double (134,4/100 000 hommes/ans dans le Doubs) (Figure 8 ; Source INCA).

Après une forte augmentation de l'incidence du CaP entre 1980 et 2005, passant de 24,8 à 127,1 cas pour 100 000 hommes par année, le taux d'incidence a ensuite nettement baissé pour atteindre 97,7 cas pour 100 000 hommes par année en 2011, ce qui représente une diminution de l'incidence de 6 % par an en moyenne (Figure 9 ; Source INCA). Cette forte augmentation de l'incidence du CaP entre 1980 et 2005, est principalement due au fait du large usage du dosage du PSA dans les moyens de dépistages en 1985 (Grosclaude et al., 2015). La baisse de l'incidence après 2005 peut s'expliquer, d'une part, par le fait qu'après plusieurs années de dépistage, la majorité des cancers ont été détectés et d'autre part, par la prise de conscience du risque de surdiagnostic et donc de surtraitement (Grosclaude et al., 2015).

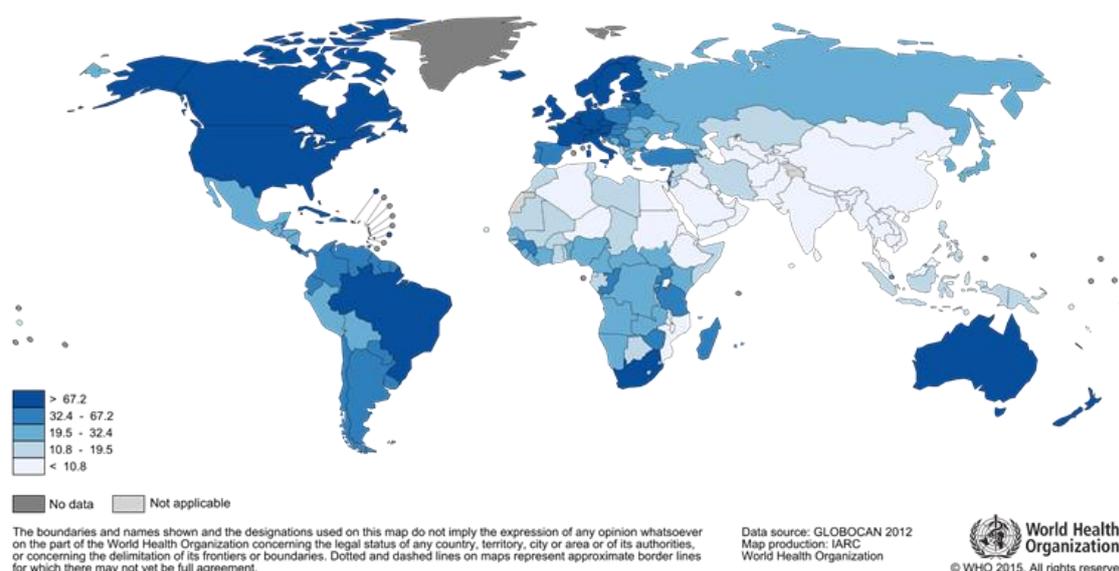
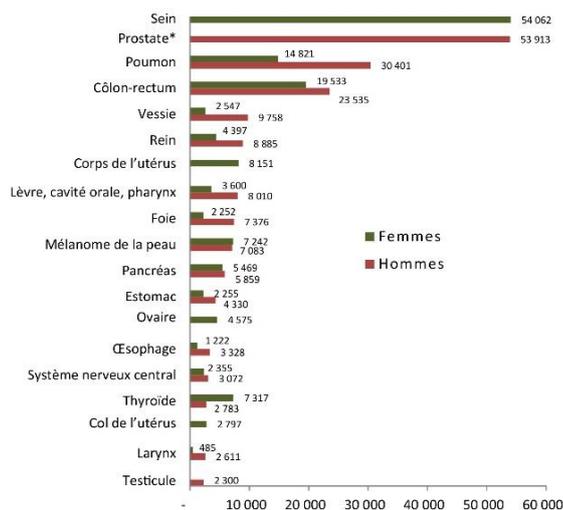


Figure 6: Taux d'incidence mondial du cancer de la prostate en 2012
(Source : <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>)



* Les données de projection 2015 ne sont pas fournies pour ce cancer, il s'agit de l'estimation pour 2011.
 Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa [Léone N, 2015]. Traitement : INCa 2015

Figure 7 : Classement des tumeurs solides par incidence estimée en 2015 en France métropolitaine selon le sexe
 (Source : http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=13)

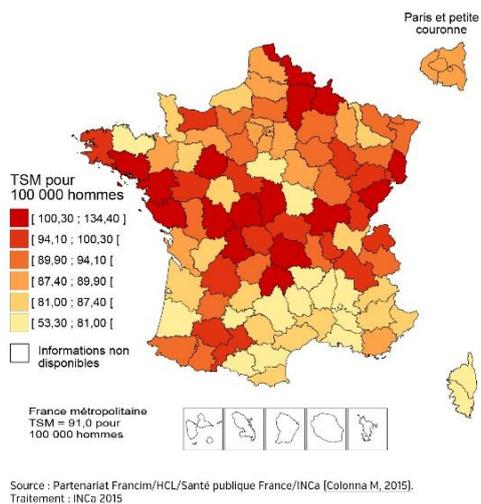
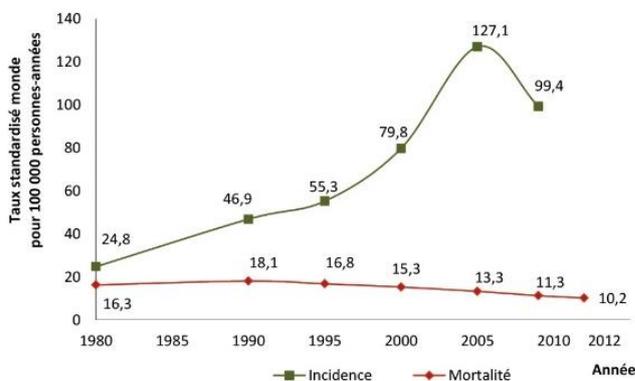


Figure 8 : Taux d'incidence du cancer de la prostate à l'échelle départementale entre 2008 et 2010
 (Source : http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=62)



Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa [Binder-Foucard F, 2013].
 Traitement : INCa 2016

Figure 9 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer de la prostate de 1980 à 2012 en France métropolitaine
 (Source : http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=60)

Avec plus de 300 000 morts en 2012 dans le monde, le CaP est la cinquième cause de mortalité par cancer chez l'homme dans le monde (Jemal et al., 2010; Wong et al., 2016) (Figure 10 ; Source GLOBOCAN). En France, le CaP se situe au troisième rang des décès par cancer chez l'homme (Figure 11 ; Source INCA) avec 8 625 décès en 2013. Le taux de mortalité pour ce cancer augmente avec l'âge, en effet, près de 79 % des décès par CaP concernent des hommes de 75 ans et plus, avec un âge médian au moment du décès de 83 ans (Grosclaude et al., 2015). Les taux départementaux de mortalité ne sont pas le reflet de ceux de l'incidence et sont les plus élevés en Guadeloupe (Figure 12 ; Source INCA). Contrairement à l'évolution de l'incidence, la mortalité du CaP diminue régulièrement depuis 1990, avec une diminution du taux de mortalité de 4 % par an en moyenne entre 2005 et 2009 (Figure 9 ; Source INCA). Cette baisse se ressent en premier et nettement chez les patients jeunes. Elle s'explique en partie par l'amélioration de la prise en charge thérapeutique, notamment pour les cancers métastatiques résistants à la castration, et par la pratique du dépistage précoce du cancer de la prostate, ce qui permet de les diagnostiquer quand ils sont curables et de bon pronostic (Grosclaude et al., 2015).

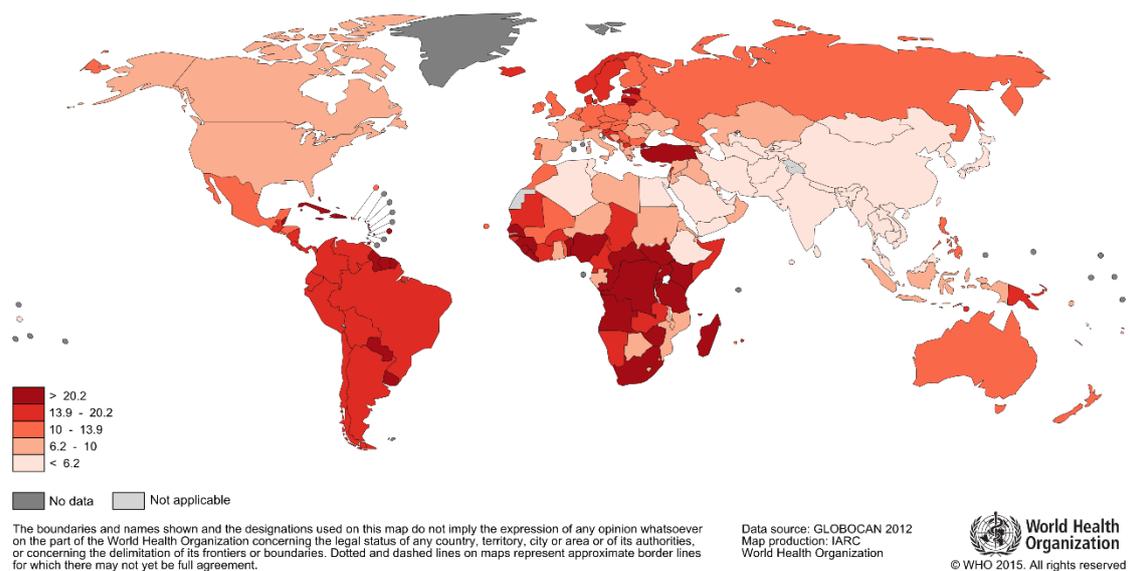
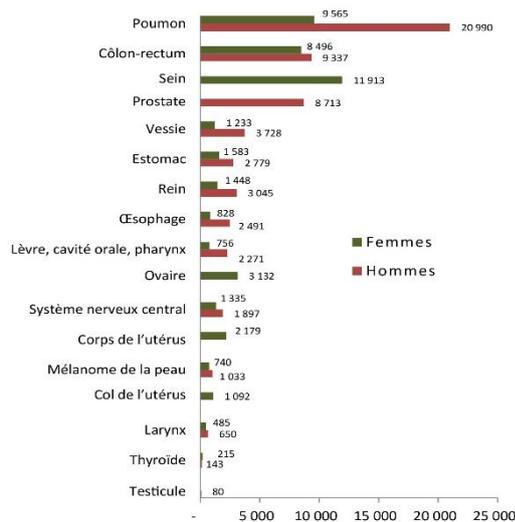
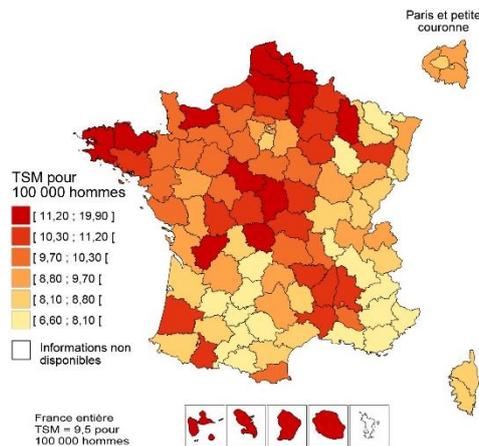


Figure 10 : Taux de mortalité mondiale du cancer de la prostate en 2012
(Source : <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>)



* Les données de projection 2015 ne sont pas fournies. Il s'agit de l'estimation pour 2011. Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa (Léone N, 2015). Traitement : INCa 2015

Figure 11 : Classement des tumeurs solides par mortalité estimée en 2015 en France métropolitaine selon le sexe (Source : http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=14)



Sources : CépiDc/Inserm, Insee [CépiDc-Inserm, 2016]. Traitement INCa, 2016

Figure 12 : Taux de mortalité du cancer de la prostate à l'échelle départementale entre 2011 et 2013 (Source : http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=62)

Entre 2005 et 2010, la survie globale des hommes, standardisée sur l'âge, était de 93% à 5 ans (Figure 13 ; Source INCA).

	Survie nette pour les hommes diagnostiqués entre 1989 et 2010** [%]	
	À 5 ans	À 10 ans
Tous [survie nette standardisée]	88	80
15-54 ans	91	86
55-64 ans	93	89
65-74 ans	92	85
85-84 ans	82	68
85 ans et plus	62	49

*Tous registres. **Registres couvrant l'ensemble de la période 1989-2010. Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa [Cowppli-Bony A, 2016]

Figure 13 : Survie nette du cancer de la prostate à 5 et 10 ans en France métropolitaine, par âge (Source : http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=63)

2. Facteurs de risque

Il y a deux types de facteurs héréditaires et environnementaux qui contribuent à la carcinogénèse prostatique mais à l'heure actuelle seulement l'âge, les antécédents familiaux et l'origine ethnogéographique ont clairement été établies comme des facteurs de risques.

2.1. L'âge

Le cancer de la prostate est rare avant 55 ans mais son incidence croit fortement avec l'âge (Grosclaude et al., 2015; Jemal et al., 2010). En effet, ce cancer survient dans environ 66 % des cas chez des hommes âgés de 65 ans et plus. Plus en détail en 2011, avant 55 ans l'incidence du CaP était de 60 cas pour 100 000 hommes-années (HA). Ce taux passe à environ 400 cas pour 100 000 HA pour les personnes de 55 à 64 ans. L'incidence du CaP est la plus forte pour la tranche d'âge des 65 à 74 ans (900 cas pour 100 000 HA), concomitant avec un âge moyen au diagnostic actuellement de 70 ans. A partir de 75 ans, l'incidence du CaP baisse progressivement, 750 cas pour 100 000 HA chez les 75-84 ans, pour arriver à 600 cas pour 100 000 HA chez les hommes de 85 ans et plus en 2011 (Grosclaude et al., 2015). Le cancer de la prostate est donc un problème de santé publique majeur dans le monde et en particulier dans les pays développés, où l'espérance de vie est la plus longue. De plus, du fait de l'augmentation de cette dernière, l'incidence du CaP devrait encore augmenter.

2.2. Facteurs héréditaires et familiaux

Plusieurs études permettent d'affirmer que les antécédents familiaux font augmenter le risque de développer un cancer de la prostate (Hemminki and Czene, 2002; Zöller et al., 2014). En effet, il a été montré que le risque de développer un cancer de la prostate est de 2.5 à 3 fois plus élevé chez les hommes dont le père et/ou le frère a eu un cancer de la prostate (Bruner et al., 2003; Johns and Houlston, 2003; Kiciński et al., 2011). Il augmente de 2 fois les chances d'avoir un cancer de la prostate pour les hommes dont un parent au deuxième degré (grand-père, oncle, neveu, demi-frère) a été diagnostiqué avec un cancer de la prostate (Bruner et al., 2003). Plus le nombre de parent proche atteint d'un CaP est élevé (trois ou plus) plus le risque de développer un CaP augmente. Ce risque est également affecté par l'âge auquel le proche parent a reçu le diagnostic de cancer de la prostate. En effet, le risque est davantage augmenté si le CaP a été diagnostiqué avant 60 ans (Hemminki and Czene, 2002; Johns and Houlston, 2003; Kiciński et al., 2011). Le risque est également plus élevé chez les hommes dont la mère a reçu un diagnostic de cancer du sein (Chen et al., 2008). Ces facteurs héréditaires ne permettent d'expliquer que 5 à 10% des cas de CaP diagnostiqués en France (Hemminki and Czene, 2002). De plus, il n'y a à ce jour que peu de preuves impliquant des gènes de prédisposition au CaP, cela nécessite donc d'être plus étudié. Les gènes dont les mutations semblent le plus être impliquées, à l'heure actuelle, dans le développement d'un CaP héréditaires sont : BRCA2 (Taylor et

al., 2017; Tryggvadóttir et al., 2007), le syndrome de lynch (Haraldsdóttir et al., 2014; Ryan et al., 2014), RNaseL (Meyer et al., 2010; Xiang et al., 2003), ELAC2 (Rökman et al., 2001; Wang et al., 2001a) et MSR1 (Seppälä et al., 2003; Sun et al., 2006).

2.3. Facteurs ethno-géographiques

Les données issues des registres mondiaux montrent qu'il existe une très grande différence d'incidence entre les pays et des disparités sont également observées entre les différentes origines ethniques (Figure 6).

Pas loin de 70% des cas de CaP sont retrouvés dans les pays les plus développés (Jemal et al., 2010; Wong et al., 2016). Les taux d'incidence du CaP varient de 25 fois entre les différents pays, les incidences les plus fortes sont retrouvées en Australie (111.6 cas/100 000 HA), Amérique du Nord (97.2 cas/100 000 HA) et Europe du Nord et de l'Ouest (en particulier la France 97.7 cas/100 000 HA), du fait de la généralisation du dépistage par le PSA et les biopsies, les taux les plus faibles concernent les populations asiatiques (10.5 cas/100 000 HA) et en particulier l'Asie du Sud et de l'Est (4.5 cas/100 000 HA). Plus précisément, on constate des différences d'incidence au sein même des pays de l'Europe avec une incidence plus élevée dans les pays au Nord que dans les pays situés au Sud (Figure 6).

En termes de mortalité, il y a moins de variations observées, que pour l'incidence, entre les différents pays du monde (approximativement 10 fois) avec un nombre de morts par CaP plus grand dans les pays peu développés comparé aux pays plus développés (Figure 10).

Ces données soulèvent la question d'un lien entre le risque de développer un CaP et l'origine ethnique. En effet, l'origine ethnique a été identifiée comme étant un facteur de risque de développer un cancer de la prostate (Bokhorst and Roobol, 2015; Gann, 2002; Kheirandish and Chinegwundoh, 2011). Plusieurs études ont montré que les hommes noirs ont plus de chance d'avoir un cancer de la prostate (Bokhorst and Roobol, 2015; Gann, 2002; Kheirandish and Chinegwundoh, 2011), suivis des hommes blancs et des hommes asiatiques (McCracken et al., 2007; Miller et al., 2008). Les hommes noirs vivant aux Etats Unis ou en Angleterre ont, respectivement, 2.4 à 3 fois plus de risque de développer un CaP que les hommes blancs au même âge pour les mêmes pays, avec un niveau de PSA légèrement plus élevé chez les hommes noirs (Evans et al., 2008; Lloyd et al., 2015). De plus, il a été observé que les hommes noirs sont, en moyenne, diagnostiqués 5 ans plus tôt que les hommes blancs pour le CaP. Cependant, il n'a pas été montré de différence significative pour le score de Gleason et le stade clinique entre les hommes noirs et blancs. Il ne semble pas non plus avoir de différence de mortalité par CaP entre ces deux populations (Evans et al., 2008; Kheirandish and Chinegwundoh, 2011; Lloyd et al., 2015). Enfin, au sein de la population française, l'incidence du cancer de la prostate apparaît 2 fois plus élevée chez les personnes d'origine africaine ou antillaise dans les départements d'outre-mer

(Multigner). Cependant, les causes pour expliquer ces différences d'incidences en fonction de l'origine ethnique ne sont à l'heure actuelle encore pas identifiées.

De façon intéressante, plusieurs études ont rapporté que des hommes migrant d'une zone géographique avec une faible incidence, par exemple les pays d'Asie, vers une zone géographique avec une forte incidence de CaP, par exemple l'Amérique du Nord et les pays Européens, acquièrent un risque de développer un CaP plus élevé que dans leur pays de naissance (Lichtensztajn et al., 2014; Luo et al., 2004).

2.4. Les facteurs de risques exogènes

Comment expliquer les importantes différences d'incidences et de mortalités entre les différentes régions géographiques, avec un risque élevé de CaP aux Etats Unis et en Europe et un faible risque en Asie ? Ou encore que les personnes migrant d'une région à faible risque vers une région à haut risque acquièrent un haut risque de développer un CaP. Ces variations tendent à prouver l'existence de facteurs exogènes liés au mode de vie des pays occidentaux. De plus, si les facteurs de risques avérés comme l'âge, les antécédents familiaux et l'origine ethnique ne peuvent être modifiés, les modes de vie peuvent quant à eux être contrôlés et pourraient constituer des recommandations pour la prévention du CaP. C'est le cas de certains facteurs environnementaux modifiables comme les régimes alimentaires, le style de vie (sport, tabac, activité sexuelle) qui ont été montré comme potentiel risque de développement et de progression du CaP (Brookman-May et al., 2018). D'autres facteurs, découlant du style de vie, sont susceptibles de jouer un rôle dans le développement du CaP, c'est le cas de l'indice de masse corporelle (IMC), des maladies métaboliques et de la prise de certains médicaments (Campi et al., 2018).

2.4.1. L'alimentation

De nombreuses études épidémiologiques et cas-témoins sur le cancer de la prostate incriminent le régime alimentaire et les nutriments comme facteurs étiologiques ou bénéfiques modulant le risque de tumorigénèse prostatique (Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Lin et al., 2017; Mandair et al., 2014; Nelson et al., 2014; Peisch et al., 2017).

Parmi les facteurs alimentaires à risques, la viande rouge a été suggérée comme augmentant le risque de développer plusieurs types de cancers, dont le CaP (Joshi et al., 2012; Wu et al., 2016). Même si de nombreuses études ont essayé de déterminer le rôle que pouvait avoir une consommation élevée de viande rouge, les résultats restent contradictoires. Malgré tout, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé les viandes transformées comme « agent cancérigène pour l'homme » (Groupe 1) et les viandes rouges comme « agent probablement cancérigène pour l'homme » (Groupe 2A).

La consommation d'acides gras insaturés a également un rôle dans la carcinogénèse, elle est plus particulièrement associée avec un plus fort risque de développer des formes avancées ou létales du CaP, alors que la consommation d'acide gras monoinsaturés, et polyinsaturés (oméga 3 par exemple) ne sont pas associés avec le risque de développer un CaP (Ferro et al., 2017; Peisch et al., 2017).

Plusieurs études ont suggéré qu'une consommation excessive de calcium (au-dessus des doses journalières recommandées de 1000mg) et/ou de produits laitiers est associé avec une aggravation du risque de développer un CaP avancé ou métastatique, comparé à une faible consommation de calcium (Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Mandair et al., 2014; Peisch et al., 2017).

Parmi les facteurs alimentaires protecteurs, les fruits et légumes, en particulier les tomates, riches en lycopène, et les légumes crucifères, ont un bénéfice avéré dans le cancer de la prostate (Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Mandair et al., 2014; Peisch et al., 2017).

Certains polyphénols ont également été étudiés dans la prévention du CaP. C'est le cas des isoflavones, des phytoestrogènes avec de fortes propriétés antioxydantes, présents en grandes quantités dans le soja. En effet, la consommation de soja est beaucoup plus élevée chez les populations asiatiques et pourrait expliquer les faibles taux d'incidence de CaP de ces populations, cela a donc déclenché leurs études plus approfondies. Ces études montrent que les produits à base de soja ont un effet préventif dans le CaP mais plus d'études sont nécessaires pour clarifier leurs rôles préventifs (Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Mandair et al., 2014; Peisch et al., 2017).

Un autre aliment contenant des polyphénols et étant abondamment consommé en Asie suscite de l'intérêt dans la prévention du CaP, le thé vert. En effet, il a été montré que compléter son alimentation avec du thé vert pouvait chez certaines personnes prévenir le CaP et avoir des bénéfices chez des patients atteints d'HBP. Il n'y a cependant pas de preuves à l'heure actuelle de l'effet bénéfique du thé vert chez les patients déjà diagnostiqués avec un CaP (Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Mandair et al., 2014; Peisch et al., 2017).

Malgré de nombreuses études, l'implication positive ou négative des compléments alimentaires contenant du sélénium, des vitamines A, E et D, dans le CaP n'a pas été clairement établie (Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Mandair et al., 2014; Peisch et al., 2017).

2.4.2. Le mode de vie

Les pays occidentaux ayant la plus grande incidence de CaP ont également le plus grand nombre de personnes en surpoids ou obèses. De ce fait, de nombreuses études ont essayé de déterminer si l'obésité pouvait être impliquée dans le développement du CaP (Brookman-May et al., 2018; Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Peisch et al., 2017). Malheureusement, le résultat de ces études n'est

pas cohérent et la plupart ne montre pas d'association entre l'IMC et l'incidence du CaP. Cependant, d'autres études qui se sont focalisées sur la relation entre l'IMC et la mortalité par CaP ont montré que des personnes en surpoids ou obèses, au moment du diagnostic, ont plus de risque d'avoir un CaP agressif et d'en mourir.

Le tabagisme ne semble pas impliqué dans le développement du CaP mais semble augmenter le risque de formes agressives et la mortalité causée par le CaP. L'association du tabagisme avec le traitement chirurgical ou médical du CaP entraîne une augmentation significative de la progression et de la mortalité (Brookman-May et al., 2018; Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Peisch et al., 2017).

A contrario, la pratique d'une activité physique régulière et soutenue (trois heures ou plus par semaine) réduit de près de 60% le risque de récurrence et de décès par CaP mais ne semble pas avoir d'impact sur le risque de développer un CaP (Brookman-May et al., 2018; Hackshaw-McGeagh et al., 2015; Peisch et al., 2017).

L'exposition aux pesticides a été corrélée avec une augmentation du CaP, en particulier chez les agriculteurs, avec une augmentation du risque de 7 à 19%, et chez les ouvriers d'usines de production de pesticides, avec une augmentation de 12 à 28% (Alavanja et al., 2005 ; Koutros et al., 2010 ; Van Maele-Fabry and Willems, 2004 ; Van Maele-Fabry et al., 2006). Ces résultats ont été obtenus après l'analyse de plusieurs études, en particulier les données de la cohorte AHS (Agricultural Health Study), réalisées au cours des 30 dernières années, principalement en Amérique du Nord. Cette cohorte a étudié une cinquantaine de matières actives différentes (Alavanja et al., 2003 ; Dosemeci et al., 2002) et l'analyse des informations recueillies par cette cohorte a permis de mettre en évidence que l'exposition au butylane un herbicide de la famille des thiocarbamates et au terbufos, un insecticide organophosphoré, est associée à un risque significativement augmenté de survenue du cancer de la prostate pour les catégories d'expositions les plus élevées (Bonner et al., 2010 ; Lynch et al., 2009). D'autres analyses statistiques de cette cohorte ont quant à elles pris en compte les antécédents familiaux de CaP au premier degré, étant un facteur de risque avéré de développer un CaP, comme facteur d'interaction. Ces études ont montré que, pour certains pesticides, seuls les hommes exposés et ayant des antécédents familiaux de CaP présentaient un risque de CaP plus élevé que les personnes n'ayant que des antécédents familiaux. C'est le cas de l'herbicide butylane (Lynch et al., 2009) et des insecticides carbofuran (Bonner et al., 2005), coumaphos (Christensen et al., 2010), fonofos (Mahajan et al., 2006) et perméthrine (Rusiecki et al., 2009). Cependant, ces résultats n'ont pas été retrouvés en France, suite à l'étude AGRICAN, qui s'est intéressée aux risques de cancer d'une population d'agriculteurs (Levêque-Morlais et al., 2015). En France, la substance actuellement mise en cause, dans la survenue du CaP, mais qui est maintenant interdite est la chlordécone chez les populations des

Antilles françaises (Multigner et al., 2010). La chlordécone est un insecticide de la famille des perturbateurs endocriniens qui a longtemps été utilisé aux Antilles pour lutter contre le charançon du bananier. Cette substance, interdite depuis 1993, très stable persiste encore dans les sols et contamine certaines ressources végétales ou animales ainsi que l'eau.

La prévention du CaP est un enjeu de santé publique majeur, même si des progrès significatifs et de nombreuses études ont identifiés des facteurs de risques et bénéfiques, les preuves ne sont pas assez fortes pour pouvoir faire des recommandations sur la prévention du CaP et les facteurs de risque clairement identifiés (âge, antécédents familiaux, race) ne peuvent être contrôlés. Cependant, des modifications du régime alimentaire et du mode de vie semblent réduire le risque de développement et de progression du CaP et peuvent aider les hommes à vivre plus longtemps et dans de meilleures conditions. De plus, 80% des cas de cancer de la prostate sont des cas sporadiques, ce qui prouve la nécessité de trouver des facteurs de risques permettant d'éviter le développement du cancer de la prostate.

3. Etiologie du cancer de la prostate

La grande majorité des cancers de la prostate prennent leur origine dans la zone périphérique (60 à 70%) de la glande prostatique et gardent une certaine structure glandulaire. 10 à 20% des cancers de la prostate apparaissent dans la zone de transition et 5 à 10 % ont pour origine la zone centrale de la glande prostatique (Packer and Maitland, 2016; Schrengost and Knudsen, 2013). Le CaP, comme tout cancer, naît du déséquilibre entre une prolifération accrue et une mort cellulaire inhibée conduisant à la formation de tumeurs malignes. Il existe plusieurs types de CaP qui diffèrent selon l'origine cellulaire conduisant au cancer et qui de ce fait auront une croissance et une agressivité différentes. Dans plus de 95% des cas, le CaP est issu des cellules épithéliales de la glande et est alors classifié en adénocarcinome prostatique (Lee and Shen, 2015; Packer and Maitland, 2016; Schrengost and Knudsen, 2013). De très rares tumeurs se développent à partir du stroma prostatique et sont appelées sarcome prostatique. Les adénocarcinomes prostatiques comprennent plusieurs sous types : l'adénocarcinome acinaire est la forme de CaP la plus courante, a pour origine les cellules luminales et est de ce fait androgéno-dépendant, le carcinome des cellules basales qui est plus rare mais dur à diagnostiquer est agressif et de mauvais pronostic et enfin le carcinome neuroendocrine forme la plus rare, se manifeste chez les hommes jeunes et est très agressif avec une issue très souvent fatale (Amorino and Parsons, 2004; Parimi et al., 2014). Le cancer de la prostate est donc très hétérogène et multifocal, il résulte de foyers tumoraux ayant pour origine un ou plusieurs types cellulaires et ne forme pas une masse tumorale bien distincte du tissu sain mais diffuse à plusieurs endroits.

Le CaP présente aussi une importante hétérogénéité intratumorale, en effet au sein de la prostate d'un même individu, on observe des foyers tumoraux histologiquement différents correspondant à des stades distincts. Il existe également une forte hétérogénéité inter-patients qui s'observe par l'évolution différente du CaP entre deux patients avec le même stade tumoral. Tous ces paramètres rendent difficile l'établissement précis du stade tumoral, le traitement à envisager et la prédiction de son évolution.

4. Dépistage et diagnostic du cancer de la prostate

4.1. Dépistage précoce

La détection précoce du CaP consiste à rechercher la maladie chez un patient asymptomatique appartenant à une population précise dans le but d'améliorer les chances de guérison du patient. La détection précoce du CaP repose sur l'identification des facteurs de risque, le toucher rectal, et majoritairement le dosage du PSA. Le PSA est une protéine synthétisée et sécrétée par la prostate (Balk et al., 2003; Lilja, 2003). L'augmentation de sa concentration sanguine entraîne la suspicion de CaP (Lilja et al., 2008; Rozet et al., 2016). Cependant la valeur du PSA peut également augmenter à cause d'une inflammation de la prostate ou d'une hyperplasie de la prostate (Nadler et al., 1995). L'augmentation de PSA doit donc être couplée au toucher rectale pour réduire le risque de faux positifs (Rozet et al., 2016). La place exacte des nouveaux biomarqueurs (Velonas et al., 2013), des calculateurs de risque et de l'IRM reste encore à établir (Cuzick et al., 2014). L'objectif du dépistage précoce est la réduction de la mortalité spécifique et le maintien ou, mieux encore, l'amélioration de la qualité de vie des personnes cibles.

En cas de facteur de risque (cf. « Facteurs de risque »), le dépistage doit s'instaurer dès 45 ans. Pour les personnes sans facteurs de risques, la période de diagnostic précoce s'étend de 50 ans à 75 ans en général. Il n'y a pas d'intervalle strictement défini entre deux procédures de détection précoce. La valeur du PSA et l'âge du patient définissent cet intervalle, propre à chaque cas (Rozet et al., 2016).

Le dépistage systématique du CaP organisé à l'échelle nationale est particulièrement controversé (Carter, 2006; Gomella et al., 2011). En effet, le PSA, n'étant pas exclusif au CaP, peut conduire au surdiagnostic et par conséquent au risque de surtraitement (Carlsson and Kattan, 2016; Ilic et al., 2013). Les risques associés au surdiagnostic sont d'exposer des patients à de potentielles complications dues à l'approfondissement du diagnostic par des techniques invasives, c'est-à-dire des biopsies.

Si à ce jour, aucune étude n'a établi de bénéfice du dépistage du CaP pour l'état de santé globale de la population dépistée, en revanche, le dépistage du CaP a prouvé sa capacité à diminuer la mortalité spécifique de la maladie (Arnsrud Godtman et al., 2015; Schröder et al., 2014). En effet, l'un des

bénéfices avérés de la détection précoce a été la diminution considérable des formes métastatiques au diagnostic, limitant la morbidité et les coûts des traitements des formes avancées (Arnsrud Godtman et al., 2015; Buzzoni et al., 2015; Welch et al., 2015).

4.1.1. Outils du dépistage

Le cancer de la prostate est asymptomatique au début. Dans une forme plus avancée, il entraîne l'apparition de troubles urinaires ou érectiles. Le diagnostic précoce de la maladie est possible grâce à trois examens : le dosage du PSA (Prostatic Specific Antigen), le toucher rectal (TR) et les biopsies prostatiques.

4.1.1.1. Le toucher rectal

Le toucher rectal est un examen médical indolore et cliniquement simple lors duquel un médecin introduit un doigt ganté et lubrifié dans le rectum du patient, via l'anus. Chez l'homme, le toucher rectal permet entre autres l'analyse de la prostate. Lorsqu'elle est normale, elle a une consistance souple et régulière. En cas de prostatite, la prostate est douloureuse. En cas d'hypertrophie bénigne de la prostate, elle peut être anormalement grosse et perdre son sillon médian mais elle conserve un aspect régulier et homogène. En cas de cancer de la prostate, la prostate possède des lésions dures, irrégulières, de consistances pierreuses, et non douloureuses. Dans ces cas, des nodules intra capsulaire ou débordant de la prostate peuvent être présents (Rozet et al., 2016).

Le TR est recommandé préalablement à la prescription du dosage du PSA total (Gosselaar et al., 2008). Un TR suspect est associé à un risque plus élevé de tumeur indifférenciée, et est une indication de biopsies prostatiques quelle que soit la valeur du PSA (Catalona et al., 1994). Cependant, un toucher rectal normal n'exclut pas un cancer de la prostate de petite taille.

4.1.1.2. Le dosage du PSA

Le PSA est une glycoprotéine synthétisée et sécrétée spécifiquement par l'épithélium prostatique et témoignant de son activité (Balk et al., 2003; Lilja, 2003; Rao et al., 2008). Lors de la tumorigénèse prostatique, la prolifération des cellules tumorales ainsi que la désorganisation du tissu prostatique entraînent un passage plus important de PSA dans la circulation (Lilja et al., 2008; Rao et al., 2008). Cependant, des pathologies bénignes (infection ou hyperplasie) peuvent entraîner une augmentation du taux de PSA sanguin au-dessus de la norme (supérieur à 4 ng/ml) (Nadler et al., 1995). En général, le risque de CaP augmente avec la valeur du PSA total (Thompson et al., 2004). En effet, les pathologies prostatiques bénignes augmentent, généralement, plus faiblement la valeur du PSA que les CaP (augmentation d'un facteur 10). Une augmentation du taux de PSA n'est donc pas une preuve directe de la présence d'un cancer et nécessite des examens complémentaires pour confirmer la présence

d'un CaP (Carlsson and Kattan, 2016; Rozet et al., 2016). Cependant, la cinétique du PSA est utile au suivi des patients après traitement.

Pour pallier au peu de spécificité du PSA de nouveaux marqueurs prostatiques tumoraux sont actuellement en cours d'étude (Velonas et al., 2013).

La valeur du PSA et l'aspect de la prostate au TR peuvent aider à poser l'indication d'une première série de biopsies de la prostate et permettre le diagnostic positif du CaP.

4.2. Diagnostic du cancer de la prostate

Le diagnostic de la présence avérée et la gradation du CaP s'effectue grâce aux biopsies prostatiques et à l'imagerie médicale.

4.2.1. Biopsies de la prostate

La biopsie prostatique échoguidée est un examen invasif réalisé à travers la paroi rectale. Cette technique permet de récupérer des échantillons de tissu prostatique afin d'établir une classification. Le schéma standard accepté et largement utilisé est de 10 à 12 biopsies réalisées au niveau de la base, au milieu et à l'apex par voie transrectale échoguidée. Les biopsies prostatiques sont considérées comme un examen standard mais peuvent entraîner des complications. Les résultats des biopsies vont permettre d'affirmer le diagnostic de CaP et vont également permettre une classification anatomopathologique des lésions (Rozet et al., 2016).

4.2.2. Extension loco-régionale : L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM réalisée avec une antenne endorectale donne de bonnes images de l'anatomie prostatique dans les différents plans de l'espace. La performance de l'IRM dépend de l'agressivité tumorale et du volume tumoral (Kim et al., 2014). Les cancers de petit volume < 1 cm³ et bien différenciés sont plus difficiles à détecter (Mazaheri et al., 2009; Tamada et al., 2008; Turkbey et al., 2011). L'IRM permet la détection du franchissement de la capsule et l'envahissement des vésicules séminales avec une bonne sensibilité (Cornud et al., 2002; Jager et al., 1996). L'IRM prostatique est donc un examen performant pour la détection des lésions « cliniquement significatives ».

De plus en plus l'IRM devient un outil utile au dépistage ou avant de réaliser les premières biopsies pour déterminer les meilleures zones de prélèvements. En effet, les biopsies ciblées sur les anomalies observées à l'IRM permettent de détecter plus de lésions significatives avec une meilleure estimation de la longueur tumorale et du grade tumoral (Edwan et al., 2015 ; Hambroek et al., 2012 ; Rozet et al., 2016).

4.2.3. Extension à distance : recherche de métastases

Les principaux sites métastatiques pour la CaP sont les ganglions et les os mais les cellules tumorales prostatiques peuvent également se disséminer dans le cerveau, les poumons et le foie. L'examen de référence pour rechercher des métastases osseuses est la tomoscintigraphie (Gutzeit et al., 2010 ; Rozet et al., 2016 ; Shen et al., 2014). La sensibilité de la scintigraphie osseuse dépend principalement du taux de PSA et du grade de la tumeur. En effet, cette technique détecte des métastases osseuses de façon significative à partir d'un seuil de PSA > 20 ng/ml (Salomon et al., 2013). Pour les autres mais également pour les métastases osseuses (Lecouvet et al., 2010), c'est l'IRM (Hövels et al., 2008) ou la tomographie par émission de positons à la choline radiomarquée (Heck et al., 2014 ; Pinaquy et al., 2015 ; Vag et al., 2014) qui permettent de les détecter avec les meilleures sensibilités. Le taux de PSA total combiné au stade clinique et au score de Gleason sur les biopsies permettent de prédire le risque d'extension ganglionnaire (Briganti et al., 2012 ; Eifler et al.).

5. Classification du cancer de la prostate

La classification de ce cancer est une étape primordiale dans la prise en charge car c'est grâce à celle-ci qu'une décision thérapeutique pourra ou non être décidée. Pour cela, il existe plusieurs outils qui sont le score de Gleason définissant l'histologie des tumeurs, la classification TNM définissant le stade clinique de la tumeur (Tumeur, Nodule, Métastase) et la classification d'Amico évaluant la gravité d'évolution du CaP.

5.1. **Score de Gleason**

Le score de Gleason est un score histo-pronostic basé sur l'analyse des tissus obtenus lors de la biopsie ou de la prostatectomie. Il permet de classer les différents cancers présents au sein d'une même prostate selon l'état de différenciation des cellules tumorales de chaque foyer tumoral. Ce score défini par Gleason en 1966 (Gleason, 1966) comporte 5 grades architecturaux allant de 1 à 5, du moins au plus agressif : du grade 1, pratiquement identique à la glande normale, les cellules sont bien différenciées ; au grade 5, correspondant à une architecture anarchique de la glande et la présence majoritaire de cellules tumorales (Figure 14). Le CaP étant très hétérogène et diffus dans la prostate, plusieurs tumeurs de grades différents peuvent être retrouvées. De ce fait, lorsque plusieurs populations tumorales différentes sont présentes au sein de la glande, le score de Gleason est alors la somme des grades des deux populations tumorales les plus fréquentes (Figure 15). Ce système de grade a été, par la suite revu en 2005 (Epstein et al., 2005) où les grades 1 et 2 ont été supprimés puis en 2014 (Epstein et al., 2016) (Figure 15).

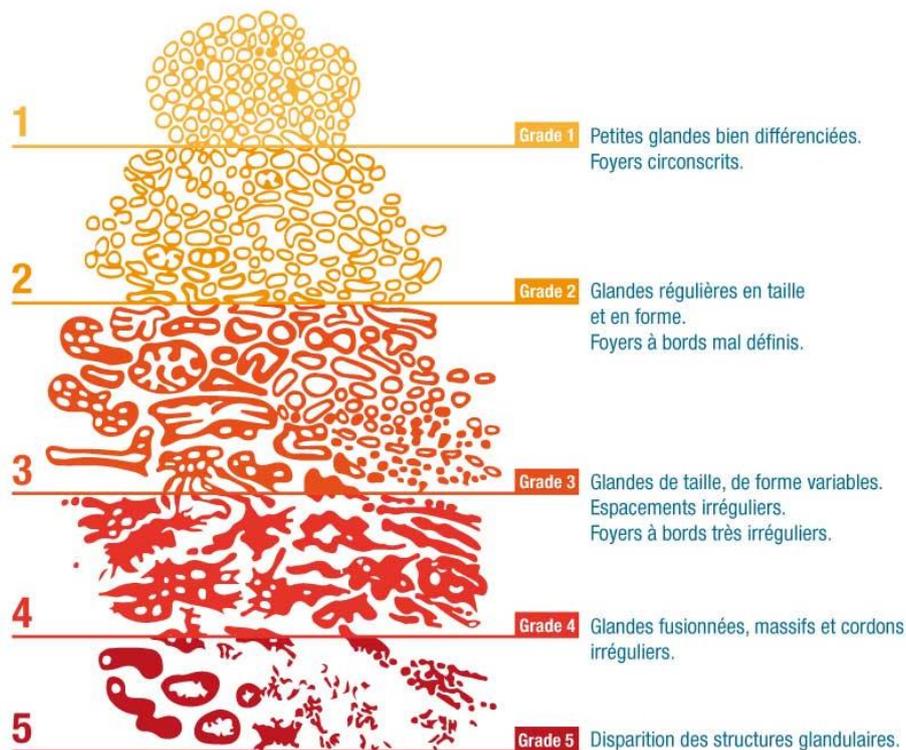


Figure 14 : Représentation schématique des grades permettant le calcul du score de Gleason (Adapté de (Epstein et al., 2016))

Ancien score de Gleason	Score de Gleason actuel	Caractéristiques cliniques
Score de Gleason 6 (3 + 3)	Groupe 1	Tumeurs de bas grade; peu prolifératives et agressives
Score de Gleason 7 (3 + 4)	Groupe 2	Tumeurs de grade intermédiaire ; moyennement prolifératives et agressives
Score de Gleason 7 (4 + 3)	Groupe 3	
Score de Gleason 8 (4 + 4, 3 + 5, ou 5 + 3)	Groupe 4	Tumeurs de haut grade ; fortement prolifératives et invasives
Score de Gleason 9 ou 10	Groupe 5	

Figure 15 : Score de Gleason (ancien et actuel) (Adapté de (Epstein et al., 2016))

5.2. Classification TNM

La classification TNM est une classification internationale permettant l'évaluation du stade tumoral (Rozet et al., 2016). Elle comprend trois critères qui sont la taille de la tumeur (T pour Tumeur), la présence ou non de métastases ganglionnaires proche de la prostate (N pour Nodule) et la présence ou non de métastases à longue distance (M pour Métastase) (Figure 16). Cette classification est réalisée après biopsies et analyse anatomopathologique du prélèvement et regroupe également les données du TR, du dosage du PSA, le score de Gleason ou encore toutes les données de l'imagerie. Ce bilan d'extension permet d'adapter et d'optimiser la stratégie thérapeutique du patient au maximum.

Les cancers de la prostate sont classés en 4 stades en fonction de cette classification :

- cancer localisé : stade T1 /T2 ;
- cancer localement avancé : stade T3 /T4 N0, M0 ;
- cancer avec atteinte ganglionnaire pelvienne : stade N1, M0 ;
- cancer métastatique : stade M1.

Classification TNM 2010	
T Tumeur primitive	T0 : tumeur primitive non retrouvée T1 : tumeur ni palpable au toucher rectal (TR), ni visible en imagerie T2 : tumeur limitée à la prostate T3 : extension au-delà de la prostate T4 : tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle élévateur de l'anus ou la paroi pelvienne)
N Ganglions régionaux	N0 : absence de métastase ganglionnaire régionale N1 : atteinte ganglionnaire régionale
M Métastases à distance	M0 : absence de métastase à distance M1 : métastases à distance

Figure 16 : Principaux stades de la classification TNM actuelle (Adapté de (Rozet et al., 2016))

5.3. La classification d'Amico

Cette classification, élaboré en 1997 par d'Amico, permet d'évaluer le risque évolutif des formes localisées, en se basant sur le dosage du PSA, le score de Gleason et le stade clinique TNM (D'Amico et al., 1998) (Figure 17). En effet, elle établit 3 sous-groupes de cancers de la prostate localisés selon leur risque de rechute ou de récurrence après un traitement radical de type chirurgie ou radiothérapie. Les 3 sous-groupes sont : à faible risque de rechute, à risque intermédiaire et à risque élevé.

Classification d'Amico	
Faible risque	PSA ≤ à 10 ng/ml Score de Gleason ≤ à 6 Stade clinique T1c ou T2a
Risque intermédiaire	PSA entre 10 et 20 ng/ml Score de Gleason 7 Stade clinique T2b
Risque élevé	PSA > 20 ng/ml Score de Gleason > 7 (8, 9 ou 10) Stade clinique T2c

Figure 17 : Classification d'Amico (Adapté de (Rozet et al., 2016))

6. Traitement du cancer de la prostate

Le traitement prescrit au patient dépend de plusieurs paramètres, incluant le grade de la tumeur, son stade au moment du dépistage, l'état général et de l'espérance de vie du patient. Du fait de l'importante hétérogénéité intra- et inter-patients, il existe une multitude de prise en charge et de

thérapies possibles dans le but d'obtenir le traitement optimal pour chaque patient et d'éviter un surtraitement.

6.1. Traitements différés : surveillance active

Contrairement à d'autres tumeurs, la majorité des cancers de la prostate se développent très lentement. En effet, la moyenne d'âge au moment du diagnostic des patients est de 70 ans et l'âge médian des patients au moment du décès de 83 ans. De plus, il existe une différence importante entre son incidence clinique et autopsique (Staerman et al., 2011) principalement due au fait que les formes peu développées sont souvent asymptomatiques. De ce fait, il se met en place de plus en plus une surveillance dite « active » chez les patients avec un CaP localisé, indolent et à faible risque (score de Gleason inférieur ou égal à 6, PSA inférieur à 10 ng/ml, score TNM : T1 voire T2a). Les modalités de la surveillance active incluent un contrôle régulier du PSA (tous les 3 à 6 mois), un TR tous les 6 à 12 mois, et un contrôle histologique par nouvelles biopsies entre 3 et 24 mois après la biopsie initiale (Rozet et al., 2016). L'aggravation d'un des critères de surveillance traduit de l'évolution du CaP et doit faire envisager un traitement actif. De ce fait, la surveillance active est une option thérapeutique qui retarde l'éventuel moment du traitement tout en restant dans la fenêtre de curabilité de la maladie. La validité et les bénéfices de cette approche ont été confirmés par plusieurs séries prospectives (van den Bergh and Giannarini, 2014; Bill-Axelsson et al., 2014; Wilt et al., 2017). En France, la surveillance active est bien mise en place mais elle n'est pas encore standardisée. Un protocole nommé SurACaP (Surveillance active du cancer de la prostate) a pour but d'obtenir une survie spécifique à 10 ans de la surveillance active.

On distingue deux voies générales de traitement pour le CaP, pouvant être adaptées individuellement à chaque patient. La première concerne les cancers localisés et est à visée curative. Elle inclue la prostatectomie totale, la radiothérapie externe et la curiethérapie. Ces traitements sont, en France, proposés chez les patients dont l'espérance de vie est supérieure à 10 ans. La deuxième cible les cancers avancés qui ont métastasés et est donc à visée principalement palliative. Elle comprend la plupart du temps une association entre hormonothérapie et radiothérapie externe.

6.2. Traitements curatifs

6.2.1. La prostatectomie totale

La prostatectomie totale est le traitement curatif de référence pour les patients avec un CaP localisé et dont l'espérance de vie est supérieure à 10 ans (Droz et al., 2010). Ce traitement chirurgical vise à retirer l'ensemble de la glande prostatique ainsi que les vésicules séminales. Il en résulte donc

l'élimination complète du CaP entraînant par conséquent, la diminution de plusieurs paramètres tels que la progression de la tumeur, la formation de métastases, le risque de récurrence et donc la mortalité (Bill-Axelsson et al., 2014). Les principales complications de cette intervention sont l'incontinence urinaire et le dysfonctionnement érectile.

6.2.2. La radiothérapie externe

La radiothérapie consiste à diriger des rayons ionisants provenant d'une source externe sur le tissu prostatique afin d'inhiber le développement des cellules cancéreuses (Gross, 2011). La radiothérapie agit en ionisant l'ADN des cellules cancéreuses, induisant leur mort ou les rendant incapables de se diviser. Cette technique permet de cibler les tissus tumoraux et d'épargner au maximum les tissus sains adjacents. Cette technique peut être utilisée seule quand la chirurgie n'est pas possible ou en complément de cette dernière dans les CaP localisés ou pour diminuer la propagation des métastases dans le cas d'un CaP avancé, principalement les métastases osseuses (Rozet et al., 2016). L'irradiation est donc recommandée pour les patients présentant un CaP de risque intermédiaire ou élevé. Les complications les plus fréquentes sont principalement d'ordre urinaires, gastro-intestinales ou des dysfonctions érectiles.

6.2.3. La curiethérapie

La curiethérapie est un traitement très localisé qui consiste à implanter de façon définitive des « grains » radioactifs directement au sein des foyers cancéreux de la prostate. Ces grains sont composés d'une capsule de titane comportant des isotopes radioactifs, le plus souvent d'iode 125, émettant des rayonnements qui vont lyser les cellules cancéreuses. Les grains d'iode 125 émettent sur une distance faible permettant ainsi de cibler les tissus cancéreux et d'éviter la destruction des tissus sains. Cette irradiation in situ permet d'administrer des doses supérieures à la radiothérapie externe et permet d'obtenir un temps d'irradiation continu car le grain délivre sa radioactivité jusqu'à épuisement. Pour plus d'efficacité, la curiethérapie peut être couplée à la radiothérapie (Zaorsky et al., 2014). Les indications de la curiethérapie sont limitées aux groupes à faibles risques dans la classification d'AMICO (Hennequin et al., 2013). Les effets secondaires sont les mêmes que pour la radiothérapie externe.

6.3. Traitements palliatifs

6.3.1. L'hormonothérapie

Comme le développement et le fonctionnement de la prostate saine sont sous le contrôle des hormones sexuelles masculines, principalement des androgènes, il est donc logique que le CaP soit un cancer dit hormonosensible, c'est-à-dire que son développement est stimulé par les androgènes et

plus particulièrement la testostérone (Lonergan and Tindall, 2011), responsable des caractères masculins. De plus, il a été observé qu'en cas de non stimulation androgénique, les cellules prostatiques saines mais également les cellules tumorales prostatiques vont entrer en apoptose. C'est à partir de ces observations que l'hormonothérapie est apparue et est devenue un traitement de référence pour le CaP (Bastide et al., 2013; Rozet et al., 2016). L'hormonothérapie consiste donc à empêcher l'action stimulante de la testostérone sur les cellules cancéreuses pour stopper le développement du cancer. La suppression androgénique se fait soit par castration chirurgicale (Desmond et al., 1988) soit par castration chimique (Rozet et al., 2016). La castration chirurgicale empêche la fabrication de la testostérone en supprimant l'activité des testicules qui la produisent via l'ablation des testicules, l'orchidectomie bilatérale. Cette technique irréversible n'est plus beaucoup utilisée à l'heure actuelle. Elle est remplacée par la castration chimique s'effectuant par un blocage hormonal de l'axe hypothalamo-hypophysaire via des agonistes ou des antagonistes de la LH-RH et/ou des anti-androgènes (Crawford et al., 2011; Mazon, 2013; Seidenfeld et al., 2000; Group PCTC, 2000). En raison de sa facilité de mise en place et de sa réversibilité, l'hormonothérapie est le traitement le plus fréquemment mis en place pour les CaP localisés de haut risque, en combinaison de la radiothérapie ou en première intention pour les CaP métastatiques (Calais da Silva et al., 2014; Langenhuisen et al., 2013; Rozet et al., 2016; Seidenfeld et al., 2000). Les effets indésirables de l'hormonothérapies sont multiples et vont de troubles sexuels à des symptômes ressemblant à ceux de la ménopause, principalement à l'inversement du ration œstrogène/testostérone (Mottet et al., 2006). Malheureusement quel que soit le traitement hormonal utilisé, l'évolution se fait irrémédiablement vers le stade de résistance aux hormones au bout d'une durée médiane de 14 à 30 mois (Nuhn et al., 2018; Rozet et al., 2016; Wang et al., 2018). On parle alors de cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC), représentant la forme la plus grave du cancer et non curable du CaP. Pour ces CaP, la chimiothérapie sera le traitement de première intention.

6.3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement de référence utilisé pour les CaP métastatiques hormono-résistants (Kyriakopoulos and Liu, 2016; Rozet et al., 2016; Sweeney et al., 2015). Les molécules efficaces dans le traitement font parties de la famille des taxanes et agissent de manière systémique en bloquant la croissance cellulaire et en induisant l'apoptose des cellules. Ces agents antinéoplasiques, principalement le docétaxel, se fixent aux microtubules, constituants de base du fuseau mitotique. Ils stabilisent et empêchent sa dépolymérisation, bloquant ainsi le cycle cellulaire en phase M. Le taxane utilisé en première ligne dans la prise en charge du CRPC est le docetaxel (Millikan et al., 2008; Poorthuis et al., 2017). En cas d'échec du docétaxel, un autre agent chimiothérapeutique est utilisé, la mitoxantrone possédant une indication dans les formes avancées du cancer de la prostate

(de Bono et al., 2010; Tannock et al., 2004). La mitoxantrone est une molécule cytostatique appartenant à la famille des anthracène-diones de synthèse. Elle agit comme agent intercalant au niveau de l'ADN et exerce une activité cytotoxique sur les cellules en phase de prolifération. Cependant, les effets secondaires néfastes de la chimiothérapie sont nombreux car elle touche les cellules se multipliant rapidement donc les cellules cancéreuses mais également celles de la moelle osseuse, de la muqueuse de la bouche, de la peau, des cheveux. On observe donc couramment chez les patients sous chimiothérapie, une atteinte du système immunitaire, des problèmes gastro-intestinaux, une fatigue intense, une anémie et la chute des cheveux.

6.3.3. Nouvelles thérapies dans le traitement du cancer de la prostate

Grâce à la recherche en cancérologie, permettant de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et immunologiques du cancer de la prostate, de nouvelles thérapies voient le jour et sont actuellement en cours de tests (Nuhn et al., 2018). Ces nouveaux traitements comprennent l'immunothérapie, la thérapie ciblée, et la suppression angiogénique et permettent d'étendre la prise en charge du cancer de la prostate résistant à la castration.

Partie 2 : Métabolisme et cancer de la prostate

Le métabolisme cellulaire englobe toutes les voies cataboliques et anaboliques permettant, respectivement, la synthèse ou la consommation d'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP, pivot du métabolisme, permet de fournir à la cellule l'énergie nécessaire à son fonctionnement.

1. Métabolisme normal de la prostate saine

Dans le but de comprendre les altérations métaboliques apparaissant lors de la carcinogénèse prostatique, il est important de connaître le métabolisme des cellules de prostate saine. En effet, les cellules épithéliales de la glande prostatique, lieu de survenue de la grande majorité des tumeurs, ont des caractéristiques métaboliques uniques qui les distinguent des autres cellules (Eidelman et al., 2017). En plus des voies métaboliques principales que sont la glycolyse, la glutaminolyse, le métabolisme des lipides, la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs et le métabolisme des acides aminées, les cellules épithéliales de prostate sont très dépendantes du métabolisme du citrate et de la voie des polyamines (Figure 18). L'oxydation du citrate est une étape clé du cycle de Krebs pour la progression de la respiration aérobie des cellules. Cependant, les cellules épithéliales de la glande prostatique, en particulier celle de la zone périphérique, sont programmées pour produire et accumuler du citrate non oxydé (30 à 80 fois plus que dans les autres tissus) qui sera sécrété dans le fluide prostatique pour former le sperme (Costello and Franklin, 2016; Dakubo et al., 2006; Ford and Harrison, 1984). Ce processus de production de citrate, propre à la prostate, est possible grâce à une autre caractéristique métabolique spécifique aux cellules épithéliales prostatique qui est la capacité d'accumuler de grande concentration de zinc (10 à 20 fois plus que dans les autres tissus) dans leurs mitochondries (Costello and Franklin, 1998; Costello et al., 2005a). Des études sur cette voie ont montré que ces fortes concentrations de zinc avaient la capacité d'inhiber la m-aconitase (Costello et al., 1997) (Figure 18), l'enzyme du cycle de Krebs responsable de la conversion du citrate en isocitrate et donc de permettre l'accumulation du citrate (Costello and Franklin, 2016; Costello et al., 2004). L'accumulation du zinc dans l'épithélium prostatique sain est due, dans ces cellules, à l'augmentation de la quantité et de l'activité du transporteur du zinc ZIP1 (Costello et al., 2011). Ce phénotype métabolique de la glande périphérique a un grand intérêt clinique quand on sait que 70% des CaP apparaissent à cet endroit.

La forte accumulation de zinc dans la mitochondrie a également pour conséquence d'inhiber la respiration mitochondriale et la chaîne respiratoire (Costello and Franklin, 2006; Dakubo et al., 2006).

En effet, il a été montré que l'activité de la chaîne respiratoire des cellules de prostate était 50% plus faible que celle de cellules très respirantes (hépatocytes par exemple). Dû à leur capacité de produire du citrate, les cellules épithéliales de la glande prostatique normale ont un cycle de Krebs tronqué entraînant par conséquent une faible respiration, une faible oxydation terminale et donc une déficience en énergie (Costello and Franklin, 2006; Cutruzzolà et al., 2017). Le métabolisme énergétique classique des cellules humaines est une utilisation complète du glucose via la glycolyse et le cycle de Krebs, résultant à la génération de 36 molécules d'ATP par glucose consommé. Dans les cellules épithéliales de prostate, l'utilisation du glucose pour la production de citrate génère environ 14 molécules d'ATP pour une molécule de glucose utilisée. L'inhibition de l'oxydation du citrate dans le cycle de Krebs consomme environ 24 molécules d'ATP par molécule de glucose utilisée (Costello and Franklin, 2000; Cutruzzolà et al., 2017). Par conséquent, la production de citrate dans les cellules épithéliales prostatiques a un coût bioénergétique important entraînant un déficit énergétique dans ces cellules. Pour compenser cette perte et fournir suffisamment de pyruvate pour la production de citrate, les cellules de prostate ont une glycolyse aérobie plus active que les cellules des autres organes (Cutruzzolà et al., 2017).

Ces particularités métaboliques sont altérées et mises à profit par les cellules cancéreuses lors de la carcinogénèse et de la croissance tumorale.

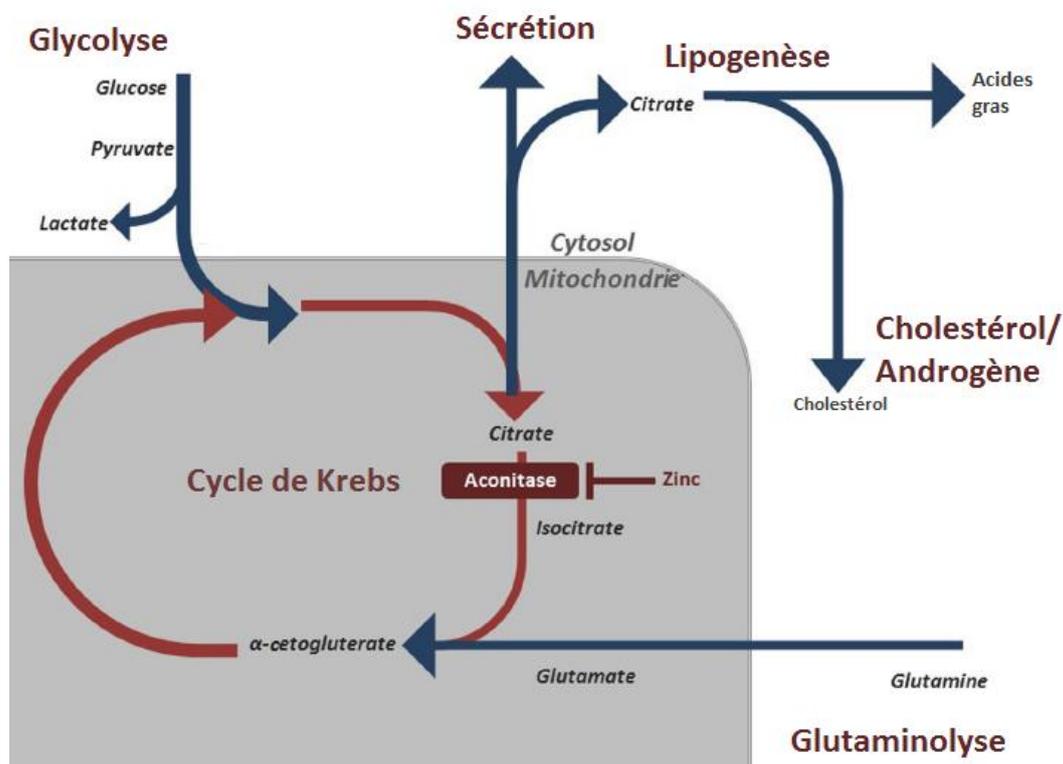


Figure 18 : Régulation des voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie et le maintien des cellules épithéliales prostatiques (Adapté de Eidelman et al., 2017)

2. Métabolisme du cancer de la prostate

Le cancer est défini comme étant une maladie provoquée par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive formant au final une tumeur maligne. La transformation des cellules vers une prolifération cellulaire incontrôlée est due à l'accumulation d'altérations génétiques et de mutations oncogéniques, capable d'activer des oncogènes, d'inactiver des gènes suppresseurs de tumeur et de rendre instable des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (Deberardinis et al., 2008; Hsu and Sabatini, 2008). Initialement, six caractéristiques distinctes et complémentaires, que les cellules acquièrent durant la progression tumorale, ont été proposées par Hanahan et Weinberg en 2000 (Hanahan and Weinberg, 2000) : 1. L'autosuffisance en signaux de prolifération, 2. L'insensibilité aux signaux anti prolifératifs, 3. La résistance à la mort cellulaire, 4. Le potentiel réplcatif illimité, 5. L'induction de l'angiogenèse, 6. La capacité à envahir les tissus et former de métastases. Ces caractéristiques ont largement été étudiées et deux caractéristiques ont récemment été ajoutées à la liste : 7. L'échappement à la destruction par le système immunitaire et 8. La reprogrammation du métabolisme énergétique. Même si la reprogrammation métabolique est considérée depuis peu comme une caractéristique des cellules cancéreuses, la recherche sur le métabolisme du cancer est l'un des plus vieux sujets de recherche en cancérologie. En effet, il y a environ un siècle, Otto Warburg a observé que des tumeurs étaient capables d'augmenter leur glycolyse aérobie même en présence d'oxygène et donc leur production de lactate dans le but de produire plus d'ATP (Warburg, 1956). Basé sur les observations que le métabolisme des cellules cancéreuses diffère fortement de celui des cellules normales, il a été mis en évidence que les cellules cancéreuses mettent en place des adaptations métaboliques pour produire plus d'énergie dans le but de maintenir leur prolifération accrue et leur survie. Donc mieux comprendre la reprogrammation qui survient dans les cellules cancéreuses conduirait à identifier d'importants points de contrôles pouvant aider au diagnostic ou identifier des cibles thérapeutiques.

2.1. Métabolisme du glucose

2.1.1. La voie de la glycolyse

La glycolyse, décrite pour la première fois en 1940 par Embden, Meyerhof et Parnas, est une série de réaction catabolisant le glucose pour en extraire de l'énergie indispensable au métabolisme cellulaire (Figure 19). C'est la voie principale du métabolisme du glucose en le scindant en deux molécules de trois carbones, le pyruvate. Les dix étapes de la glycolyse se déroulent dans le cytoplasme des cellules et peuvent être divisées en deux parties principales : la première partie consommant de l'énergie, regroupant les cinq premières réactions et aboutissant à la formation de 2 molécules de glyceraldéhyde-3-phosphate à partir d'une molécule de glucose et la deuxième partie produisant de

l'énergie, comprenant les cinq réactions suivantes et permettant la formation de 2 molécules de pyruvates.

Plus en détail, le glucose entre dans la cellule grâce à deux sortes de transporteurs : la famille de transporteur GLUT (glucose transporter) qui assure un passif du glucose et les cotransporteurs glucose sodium dépendant qui permet un transport actif du glucose à l'intérieur des cellules. La première étape de la glycolyse, utilisant une molécule d'ATP, est le réarrangement et la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P) par l'hexokinase. Cette étape est irréversible et nécessaire pour maintenir une concentration en glucose cellulaire faible afin de permettre l'entrée de molécules de glucose supplémentaires. Cette étape sert également de point de départ dans la voie des pentoses phosphates ou pour la glycogénogenèse. La réaction suivante est l'isomérisation réversible du G6P donnant du fructose-6-phosphate (F6P) par la glucose-6-phosphate isomérase. Le F6P est phosphorylé en fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP) par la phosphofructokinase 1 (PFK1), consommant un ATP. La régulation fine de cette enzyme permet d'accélérer ou de ralentir la voie de la glycolyse. Le F1,6BP est instable et est rapidement clivé par la fructose-bisphosphate aldolase en deux trioses phosphates : le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) qui sont des isomères l'un de l'autre mais seul le G3P peut être directement métabolisé dans les prochaines étapes de la glycolyse. Il existe un équilibre entre le G3P et le DHAP, mais ce dernier est majoritairement converti en G3P grâce à la triose phosphate isomérase quand le G3P est épuisé. On peut donc considérer que chaque molécule de F1,6BP clivée donne deux molécules de G3P qui vont être engagées dans la deuxième partie de la glycolyse. En bilan, durant cette première partie nécessitant de l'énergie, deux molécules d'ATP sont dépensées pour phosphoryler les produits intermédiaires.

La deuxième moitié de la glycolyse commence par la phosphorylation d'une molécule de G3P en 1,3-bisphosphoglycérate (1,3-BPG) par l'action de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Cette réaction entraîne la réduction d'un cofacteur NAD^+ en NADH, H^+ . L'étape suivante consiste à déphosphoryler le 1,3-BPG, par l'action de la phosphoglycérate kinase, ce qui entraîne la formation d'une molécule de 3-phosphoglycérate (3PG) et la libération d'un groupement phosphate. Ce dernier est capté par une molécule d'ADP formant ainsi une molécule d'ATP par phosphorylation. C'est la première étape de la glycolyse où de l'énergie est récupérée sous forme d'ATP et pourra être réutilisée. Le groupement phosphate restant du 3PG va ensuite être déplacé en position deux par la phosphoglycérate mutase donnant ainsi du 2-phosphoglycérate. Ce dernier va être déshydraté par une lyase l'énolase ce qui va former du phosphoénolpyruvate (PEP), un intermédiaire instable. La dernière étape de la glycolyse consiste à déphosphoryler le PEP pour le convertir en pyruvate, le produit final de la glycolyse. Cette réaction, catalysée par la pyruvate kinase (PK) permet de former une seconde molécule d'ATP à partir du groupement phosphate donné par le PEP à une molécule d'ADP. Donc,

chaque molécule de G3P ainsi métabolisée dans cette deuxième partie donne deux molécules d'ATP et une molécule de NADH. Comme deux molécules de G3P sont obtenues à partir d'une molécule de glucose, cette deuxième phase a lieu deux fois, donc le bilan final de cette phase est de quatre molécules d'ATP et deux molécules de NADH.

Globalement, la glycolyse permet la conversion d'une molécule de glucose à six carbones en deux molécules de pyruvates à trois carbones. Le bilan net de la glycolyse est donc de deux ATP (4 ATP produits – 2 ATP utilisés) et de deux molécules de NADH.

Le devenir du pyruvate et du NADH obtenus variera en fonction de la quantité d'oxygène dans la cellule. Si l'oxygène est disponible, le pyruvate va entrer dans la mitochondrie et sera oxydé au cours de la respiration cellulaire pour produire une grande quantité de molécules d'ATP. Le NADH va également entrer dans la mitochondrie donner un de ses électrons dans la chaîne respiratoire afin de régénérer du NAD⁺ indispensable à la glycolyse et en bonus générer de l'ATP. En absence d'oxygène, le pyruvate reste dans le cytosol et est transformé, par un processus de fermentation, en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) qui pour agir oxyde le NADH en NAD⁺ nécessaire à alimenter la glycolyse.

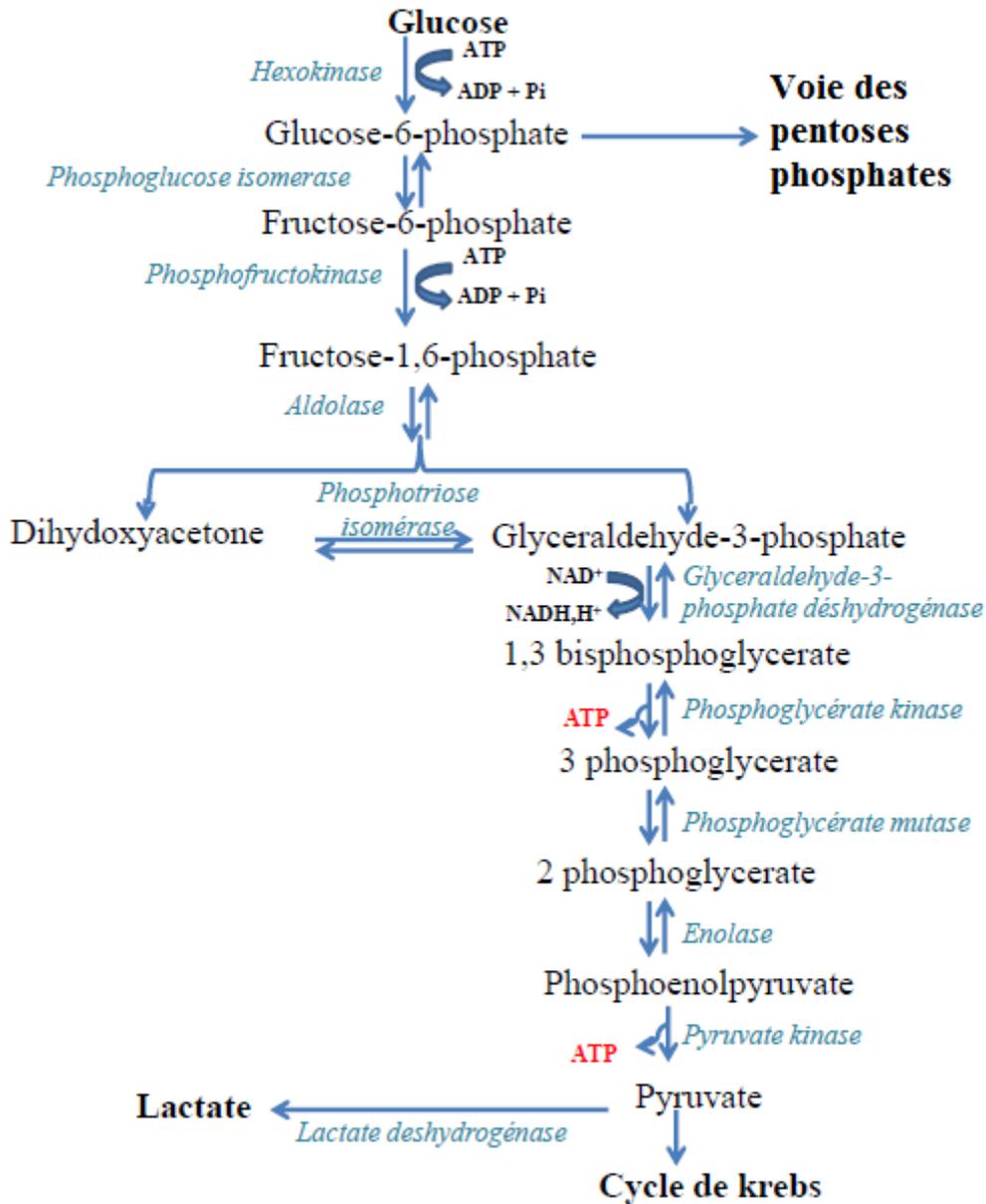


Figure 19 : Voie de la glycolyse
(Adapté du livre de biochimie générale de Jacques-Henry Weil)

2.1.2. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (PPP) est une voie alternative et parallèle à la glycolyse et au cycle de Krebs pour l'oxydation du glucose (Figure 19). Cette voie métabolique, indépendante de l'oxygène, est particulière car elle ne produit ni n'utilise d'énergie sous forme d'ATP. Cette voie a pour rôle principale de produire du NADPH, un cofacteur indispensable pour la biosynthèse des acides gras et du cholestérol et pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS), 70% du NADPH cellulaire est régénéré à partir du NADP par cette voie. La PPP permet aussi la production ribose-5-phosphate (R5P), un pentose nécessaire à la synthèse des nucléotides composant de l'ADN et l'ARN, et de

produire de l'érythrose-4-phosphate, un précurseur essentiel de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques. Cette succession de réactions a lieu dans le cytoplasme cellulaire et se divise en deux parties distinctes, la première est la phase oxydative qui est irréversible et génère deux molécules de NADPH par réduction du NADP ainsi qu'une molécule de ribulose-5-phosphate. La deuxième partie de la PPP est une phase non oxydative, réversible générant une molécule de R5P mais pouvant également générer d'autres intermédiaires, le F6P et le G3P, selon les besoins de la cellule.

Le bilan et les rôles de la voie des PPP sont :

- La génération de deux cofacteurs d'oxydoréductions, le NADPH, une source d'électrons indispensable dans plusieurs voies de biosynthèses cellulaires comme la synthèse des lipides, du cholestérol, et des acides nucléiques. Le NADPH est également indispensable pour empêcher l'apparition du stress oxydatif en participant à la réduction du peroxyde d'hydrogène, toxique pour les cellules, en eau
- La synthèse d'une molécule de R5P nécessaire à la biosynthèse de ribose et désoxyribose puis d'acides nucléiques, respectivement l'ARN et l'ADN
- La genèse de l'érythrose-4-phosphate, qui est un précurseur essentiel de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane

2.1.3. La glycolyse dans les cellules cancéreuses : l'effet Warburg

Le métabolisme du glucose, un macronutriment central, permet la production d'énergie sous forme d'ATP par oxydation des liaisons carbone du glucose grâce à la voie de la glycolyse. Ce processus est essentiel pour maintenir la survie et la croissance cellulaire. Dans les cellules normales, le produit final de la glycolyse, le pyruvate, peut être utilisé soit pour faire de la respiration, via le cycle de Krebs, soit pour faire de la fermentation donnant du lactate, en fonction de la disponibilité en oxygène (Figure 20). En effet, les travaux de Louis Pasteur sur la fermentation, datant de la fin du 19^{ème} siècle, ont mis en lumière qu'en présence d'oxygène, les cellules utilisent le glucose pour faire fonctionner la chaîne respiratoire mitochondriale et ainsi générer d'importantes quantités d'ATP (36 molécules d'ATP par molécule de glucose) par un processus aujourd'hui appelé phosphorylation oxydative. Il a également montré que lors d'une privation prolongée d'oxygène, les cellules ne sont plus capables d'utiliser la phosphorylation oxydative et basculent vers une glycolyse anaérobie qui convertit le glucose en lactate avec production d'une faible quantité d'énergie métabolique sous forme d'ATP (2 ATP produits par molécule de glucose consommée). Cette voie métabolique est aujourd'hui appelée la fermentation lactique (Figure 20). L'énergie dégagée, sous forme d'ATP, par ces deux réactions n'est donc pas équivalente.

Dans les années 1920, Otto Warburg, un médecin et biochimiste allemand, prix Nobel de médecine, s'est intéressé au métabolisme des cellules cancéreuses, en le comparant au métabolisme de cellules saines. Il a fait une découverte majeure en cancérologie ayant permis de mieux caractériser les cellules cancéreuses, les discriminer par rapport aux cellules saines, mieux comprendre leur développement et par conséquent les détecter et les cibler plus spécifiquement (Warburg, 1956). Warburg a montré que les cellules cancéreuses sont capables de reprogrammer leur métabolisme et donc de synthétiser de façon particulière leur énergie dans le but de promouvoir une croissance, une survie et une prolifération accrue. Il a observé que les cellules cancéreuses augmentent de façon considérable leur consommation de glucose comparé aux cellules saines. Et que même en présence de fortes concentrations d'oxygène, les cellules cancéreuses métabolisent le glucose, pour produire de l'ATP, principalement par la voie de la glycolyse aérobie, plutôt que de l'utiliser pour faire la phosphorylation oxydative, conduisant ainsi à l'augmentation de la production de lactate (Figure 20). Ce phénomène, observé même en présence de mitochondries fonctionnelles, est connu sous le nom de l'effet Warburg. C'est le phénotype métabolique des cellules tumorales, le mieux caractérisé (DeBerardinis et al., 2008; Koppenol et al., 2011; Pavlova and Thompson, 2016; Ward and Thompson, 2012). Ces études ont mis évidence que l'effet Warburg est requis pour la croissance tumorale mais que son inhibition seule ne suffit pas à éradiquer la tumeur et nécessite une inhibition simultanée du métabolisme mitochondrial pour y arriver, contredisant ainsi les hypothèses de Warburg attribuant l'étiologie de ce switch métabolique à un défaut du métabolisme mitochondrial. De plus, des panels variés de cellules tumorales prolifératives ont été soigneusement étudiés et ne présentent que très rarement un défaut du métabolisme oxydatif. Si l'origine de la reprogrammation métabolique n'est pas complètement élucidée, de nombreuses études ont montrées que l'effet Warburg est déclenché et contrôlé par des oncogènes activés lors de la tumorigénèse (cf. « Principaux régulateurs des voies métaboliques dans le cancer ») (Boroughs and DeBerardinis, 2015; Cairns et al., 2011; Dang, 2012; Levine and Puzio-Kuter, 2010).

L'augmentation de l'entrée de glucose dans les cellules cancéreuses est très utile pour la détection et le suivi des tumeurs, ce phénotype sert de principe de base pour une technique d'imagerie médicale appelée tomographie à émission de positons (PET). Cette technique utilise un analogue radioactif et non métabolisable du glucose, le fluorodéoxyglucose (FDG), pour détecter les régions où le FDG s'accumule fortement, donc les potentiels sites tumoraux. C'est également une autre confirmation de l'existence de l'effet Warburg.

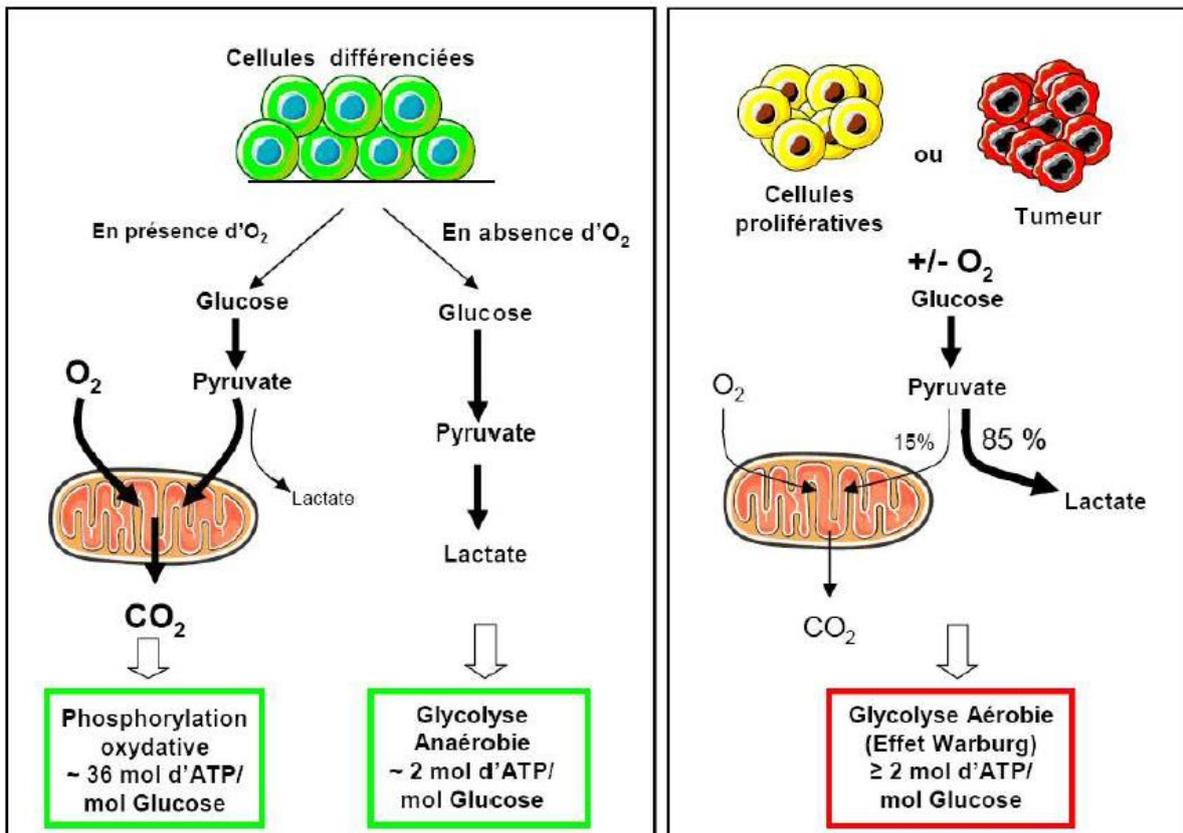


Figure 20 : Représentation schématique des différences observées entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (Adapté de van den Bergh and Giannarini, 2014)

2.1.4. L'effet Warburg dans le cancer de la prostate

Les cellules épithéliales prostatiques saines ont un métabolisme de base très différent des cellules des autres organes (cf. « Métabolisme normal de la prostate saine »). C'est donc sans surprise que les cellules du cancer de la prostate ont un phénotype métabolique nettement différent des autres cellules cancéreuses (Cutruzzola et al., 2017; Eidelman et al., 2017). En effet, alors que la plupart des tumeurs solides mettent en place l'effet Warburg, il a été montré que les cancers précoces de la prostate ne sont pas fortement dépendants du glucose et comptent en premier lieu sur les lipides et d'autres molécules énergétiques, comme le zinc, pour leur production d'énergie (Sadeghi et al., 2015; Twum-Ampofo et al., 2016). Donc l'effet Warburg ne semble pas impliqué dans la pathogénèse du CaP car les cellules de ce dernier n'ont pas de forte augmentation de l'absorption du glucose (Zadra et al., 2013). Ces observations ont été constatées en clinique, en effet le CaP précoce n'apparaît pas aux scanners FDG-PET (Schöder and Larson, 2004; Testa et al., 2016), c'est seulement les stades avancés ayant accumulés de nombreuses mutations qui peuvent être détectés aux scanners FDG-PET.

2.2. Métabolisme mitochondrial

2.2.1. Histoire

Les mitochondries ont été observées pour la première fois en 1857 par Kölliker dans le muscle, puis en 1890 dans toutes les cellules eucaryotes. En 1937, Krebs, un médecin et scientifique allemand, décrit un cycle de réactions ayant lieu dans la mitochondrie des cellules eucaryotes et le nomme « cycle de Krebs » ce qui lui vaut d'être le lauréat de la moitié du prix Nobel de médecine pour cette découverte. En 1950, Palade et Sjöstrand isolent et observent pour la première fois les mitochondries au microscope électronique ce qui leur permet de décrire l'organisation générale des mitochondries et d'établir un modèle de structure (Palade, 1952, 1953). Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la phosphorylation oxydative, nécessaire à la production d'énergie sous forme d'ATP, est découvert en 1978 par Mitchell, prix Nobel de chimie pour cette découverte. L'ADN mitochondrial fut découvert en 1981 par Anderson ce qui souleva l'hypothèse d'une origine différente pour cet organite. En effet, le fait que la mitochondrie soit constituée de deux membranes (externe et interne) et qu'elle possède son propre génome indique une potentielle origine exogène, ces arguments tendent à confirmer l'hypothèse que les mitochondries proviendraient de l'endosymbiose d'une bactérie il y a environ 2 milliards d'années.

2.2.2. Généralités

Les mitochondries sont des organites intracellulaires essentiels pour les cellules eucaryotes. Elles constituent « l'usine énergétique de la cellule » via la production d'ATP issue de l'oxydation des nutriments, son rôle est primordial dans la transduction d'énergie (Rolfe and Brown, 1997). Cependant de nombreux travaux récents ont montré que les mitochondries jouent également un rôle central dans plusieurs voies de signalisations et de biosynthèses cellulaires et sont également impliquées dans les mécanismes d'apoptoses (Nunnari and Suomalainen, 2012). Dans la plupart des cellules, les mitochondries sont des organites protéiformes de forme filamenteuse ou ronde de 0,5 à 1 µm de diamètre. Les mitochondries sont réparties sous forme de réseau dans le cytoplasme (Bakeeva et al., 1978; Benard et al., 2007). Leur distribution peut varier en fonction de la morphologie de la cellule (Ball and Singer, 1982) et des sites cytoplasmiques nécessitant un apport en ATP plus important (Chen et al., 2009; Wagner et al., 2003).

2.2.3. Structure et composition des mitochondries

Établi dans les années 1950 par Palade et Sjöstrand, le modèle de structure des mitochondries est aujourd'hui, toujours d'actualité. Les mitochondries se composent d'une double membrane, une membrane mitochondriale externe (MME) et une membrane mitochondriale interne (MMI), qui délimitent deux milieux : l'espace intermembranaire mitochondrial, et la matrice mitochondriale (Frey and Mannella, 2000).

- La membrane mitochondriale externe, séparant la mitochondrie du cytosol et contenant l'ensemble de l'organite, est une bicouche lipidique d'environ 6 à 7,5 nm d'épaisseur. Sa composition est semblable à celle des membranes plasmiques des cellules d'eucaryotes c'est-à-dire environ 50% de protéines et 50% de lipides. La membrane externe contient des porines formant des canaux et permettant le transport passif de molécules avec une masse moléculaire inférieure à 10 kDa, ce qui facilite les échanges d'ions entre la mitochondrie et le cytosol. La porine la plus abondante à la surface de la MME est un canal anionique à voltage dépendent (VDAC) permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles telles que l'ATP, l'ADP, le pyruvate, le malate, les anions, des cations, différents métabolites (acides gras) et des nucléotides (Forte et al., 1987) mais est imperméable aux ions H⁺. VDAC est également capable de communiquer et de se lier avec les enzymes de plusieurs voies métaboliques, particulièrement les enzymes de la voie de la glycolyse dont l'hexokinase et la glucokinase. Les protéines mitochondriales codées par l'ADN nucléaire possèdent un signal d'adressage leur permettant de se lier à une translocase au niveau de la MME qui assure le transport actif vers la matrice. Donc la MME joue un rôle important dans la régulation du métabolisme et du flux énergétique (Neupert, 1997).
- L'espace intermembranaire, très étroit, est délimité par les membranes mitochondriales externes et internes et constitue un lieu de transit pour les molécules ayant traversé la MME. Du fait de l'imperméabilité de la MME aux ions H⁺, l'espace intermembranaire est saturé de protons provenant de la chaîne de transport des électrons se trouvant dans la MMI. De plus, des procaspases et du cytochrome C, impliqués dans l'apoptose, sont présents en quantité importante dans l'espace intermembranaire.
- La membrane mitochondriale interne sépare l'espace intermembranaire et la matrice et possède de nombreuses invaginations en direction de l'intérieur de la matrice mitochondriale appelées crêtes, caractéristiques de la mitochondrie. Cette bicouche lipidique de 5 à 6 nm est composée de 75% de protéines et de 25% de phospholipides, notamment un phospholipide double caractéristique de la MMI, la cardiolipine nécessaire au fonctionnement de la cytochrome c oxydase (Sinibaldi et al., 2010). De ce fait, cette bicouche de composition différente, majoritairement des protéines hydrophobes, est beaucoup moins perméable que les autres membranes biologiques. Donc les protons, les coenzymes (NADH, H⁺, FADH₂), les nucléotides, le malate, le fumarate et l'oxaloacétate passent majoritairement par des transporteurs membranaires spécifiques pour traverser la MMI tels que des perméases, assurant le cotransport des ions H⁺ et des molécules. Les protéines sont quant à elles transportées par des complexes de translocases situés dans la MMI. Une des fonctions

principales de cette membrane est d'abriter les enzymes et les complexes de la chaîne respiratoire et donc de permettre la production d'ATP par la phosphorylation oxydative.

- La matrice mitochondriale est l'espace inclus dans la membrane mitochondriale interne. Elle contient un mélange très concentré de nombreuses d'enzymes différentes dont principalement celles impliquées dans le cycle de Krebs et la β -oxydation, de ribosomes spécifiques aux mitochondries, d'ARN de transfert et de l'ADN du génome mitochondrial (Nunnari and Suomalainen, 2012). Elle joue donc un rôle déterminant dans la production d'ATP par la dégradation du pyruvate, dans la biosynthèse des protéines mitochondriales et dans la réplication du génome mitochondrial. En effet, la mitochondrie est le seul organelle à posséder son propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui est dépourvu d'histones et d'introns et est organisé sous forme de nucléotides dans la matrice (Anderson, 1981; Nass and Nass, 1963). Ce génome est présent en plusieurs copies dans la mitochondrie et représente 1 à 5 % de l'ADN présent dans la cellule. Le génome mitochondrial code pour 13 polypeptides que l'on retrouve dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Alexeyev et al., 2004). Cet ADNmt possède un taux de mutation de 10 à 17 fois plus fréquent que celui de l'ADN nucléaire car il n'est pas protégé par des histones et est situé près des zones de productions de radicaux libres (Neckelmann et al., 1987).

2.2.4. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries forment un ensemble de tubules interconnectés dans le cytosol appelé réseau mitochondrial (Bakeeva et al., 1978; Benard et al., 2007). Ce réseau est très dynamique et animé de nombreux mouvements dans les cellules vivantes et est en réorganisation permanente grâce à des phénomènes de fissions et de fusions (Cervený et al., 2007; Hales, 2004). Ces phénomènes jouent un rôle important dans de nombreux processus permettant le maintien de l'intégrité mitochondriale (Chen and Chan, 2009; Liesa et al., 2009).

Il existe un cycle continu de fusion et de fission mitochondriales et la balance entre ces deux phénomènes détermine la morphologie du réseau mitochondrial (Chen and Chan, 2004; Sauvanet et al., 2010a). Cette balance est étroitement régulée par le statut bioénergétique mitochondrial et cellulaire (Benard et al., 2007; Frey and Mannella, 2000; Sauvanet et al., 2010b; Youle and Karbowski, 2005).

De plus il a été montré que, le réseau mitochondrial s'étend dans le cytosol et entre en contact avec le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le cytosquelette (Amchenkova et al., 1988; Benard et al., 2007; Szabadkai et al., 2003).

En conclusion, la dynamique mitochondriale participe au fonctionnement du cycle de Krebs (Szewczyk and Wojtczak, 2002) et de la chaîne respiratoire, à la β -oxydation des acides gras, à l'homéostasie et la signalisation calcique, à la production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'aux processus de sénescence et la cascade apoptotique.

2.2.5. Biogénèse mitochondriale

Le nombre de mitochondries présent dans les cellules peut être ajusté pour répondre à la demande énergétique physiologique ou pathologique de la cellule. La quantité de mitochondries, correspondant au volume du réseau mitochondrial est le résultat de l'équilibre entre deux processus : la biogénèse mitochondriale et la dégradation mitochondriale, appelée mitophagie.

La biogénèse mitochondriale se fait dans des mitochondries déjà existantes dans la cellule et fait intervenir l'expression de gènes appartenant aux génomes nucléaire et mitochondrial (Hood et al., 2006) ainsi que différents facteurs de transcriptions. De nombreuses études ont permis de placer le coactivateur PGC-1 α comme un régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale chez les mammifères (cf. « PGC- α et biogénèse mitochondriale ») (Lehman et al., 2000; Puigserver et al., 1998a; Russell et al., 2004; Wu et al., 1999). Il contrôle l'expression génique et active des facteurs de transcription tels que NRF1 et NRF2 (Nuclear Respiratory Factor 1 et 2) (Scarpulla, 2002) et ERR α (Estrogen-Related Receptor α) (Schreiber et al., 2004b) impliqués dans la biogénèse mitochondriale ainsi que dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, des enzymes du cycle de Krebs et de la β -oxydation (Figure 21). En effet, NRF1 et NRF2 activent la transcription de TFAM (Transcription Factor A, Mitochondrial) qui entre dans la mitochondrie et induit l'expression des gènes du génome mitochondrial.

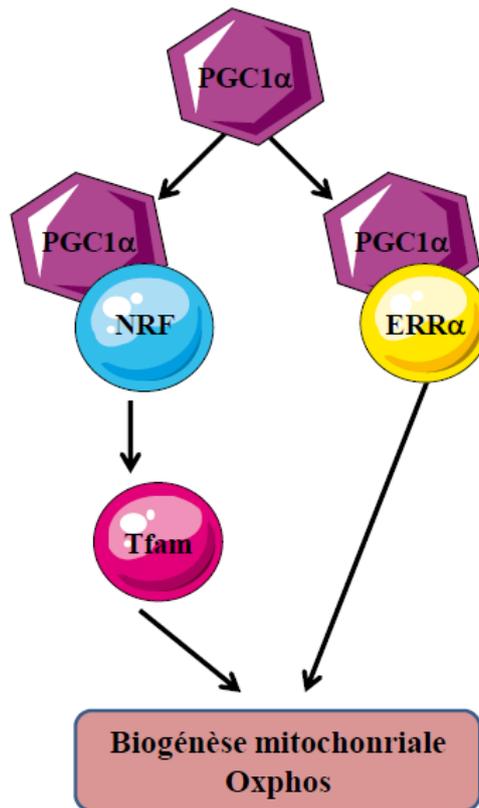


Figure 21 : Interactions de PGC-1 α avec ses différents partenaires dans la régulation des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale (Adapté de (Finck and Kelly, 2007))

Pour maintenir l'efficacité de cette machinerie complexe de transduction énergétique qu'est la mitochondrie, il est indispensable d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles ou endommagées. Pour cela les mitochondries sont prises en charge et éliminées par mitophagie (Ashrafi and Schwarz, 2013; Liu et al., 2014). La mitophagie, est la dégradation sélective des mitochondries via la voie autophagique, c'est un mécanisme vital de contrôle de la qualité mitochondriale dans les cellules. La mitophagie évite donc l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles qui pourrait entraîner des dommages irréversibles au niveau cellulaire (Ding and Yin, 2012).

2.2.6. Les voies métaboliques mitochondriales

Pour rappel, le rôle majeur de la mitochondrie consiste à produire de l'énergie sous forme d'ATP. Pour cela les voies cataboliques mises en place dans la mitochondrie sont la β -oxydation des acides gras (cf. « La β -oxydation »), le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative formant à eux deux la respiration cellulaire.

2.2.6.1. Le cycle de Krebs

En 1937, Hans Adolf Krebs a mis en évidence le fonctionnement du cycle de Krebs (ou cycle du citrate ou cycle des acides tricarboxyliques), en rassemblant des travaux de plusieurs années. Le cycle de Krebs

est le point final commun de la dégradation du glucose (provenant de la glycolyse), des polysaccharides (provenant de la voie des pentoses phosphates), des lipides (provenant de la β -oxydation) et des acides aminés, qui aboutissent à la formation d'acétyl-CoA. Le pyruvate, produit terminal de la glycolyse (cf. « La voie de la glycolyse »), est à l'origine de la plus grande part de production de l'acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs. Le pyruvate est synthétisé dans le cytoplasme, où se déroule la glycolyse, et doit donc entrer dans la mitochondrie pour être utilisé par le cycle de Krebs. Pour cela le pyruvate diffuse à travers la MME grâce aux pores formés par les porines, puis il traverse la MMI pour entrer dans la matrice mitochondriale grâce son transporteur spécifique, récemment identifié, le MPC (mitochondrial pyruvate carrier) (Herzig et al., 2012).

Une fois dans la matrice, le pyruvate est converti par une réaction de décarboxylation oxydative catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA à l'aide du coenzyme A. La PDH peut être inhibée par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). La première réaction propre au cycle de Krebs est réalisée par la citrate synthase qui va lier l'acétyl-CoA à l'oxaloacétate pour former du citrate. Cette réaction s'accompagne d'une réduction du NAD⁺ et de la formation d'une molécule de CO₂. Cette enzyme est très régulée par le NADH, le succinyl-CoA, le citrate et l'ATP qui l'inhibent et permettent ainsi de contrôler la vitesse du cycle. Le citrate peut également être exporté hors de la mitochondrie via son transporteur et peut aussi servir à la synthèse des lipides (cf. « La lipogenèse *de novo* »). C'est ainsi que l'on entre dans le cycle de Krebs. Ce cycle est composé de 8 réactions enzymatiques (Figure 22). Les enzymes de ce cycle se trouvent dans la matrice mitochondriale ou peuvent être ancrées dans la MMI. La réaction suivante est catalysée par l'aconitase qui permet la synthèse d'isocitrate par hydratation du citrate. L'isocitrate subit ensuite une décarboxylation oxydative par l'isocitrate déshydrogénase conduisant à la formation d' α -cétoglutarate et entraînant également la réduction d'une molécule de NAD⁺ en NADH (Stobbe et al., 2012). L' α -cétoglutarate déshydrogénase forme le succinyl-CoA, par la décarboxylation oxydative de l' α -cétoglutarate, avec une réduction du NAD⁺ en NADH. La succinyl-CoA synthétase convertit la succinyl-CoA en succinate et coenzyme A avec formation d'une molécule de Guanosine Triphosphate (GTP). La succinate déshydrogénase catalyse l'oxydation du succinate en fumarate tout en synthétisant une molécule de FADH₂, nécessaire au complexe II de la chaîne respiratoire. La fumarate hydratase permet la synthèse du malate par hydratation du fumarate. La dernière étape du cycle de Krebs fait intervenir la malate déshydrogénase qui transforme le malate en oxaloacétate. Cette réaction est accompagnée par la réduction du NAD⁺ (Stobbe et al., 2012).

Un tour de cycle permet à partir d'un acétyl-CoA, de réduire 3 moles de NAD⁺ en NADH,H⁺, une mole de FAD en FADH₂, de produire 2 moles de CO₂ et une mole de GTP. On constate que le cycle de Krebs ne produit qu'un seul équivalent ATP (1 GTP), soit moins que la glycolyse (2 ATP). L'essentiel de

l'énergie chimique potentielle est donc produite sous forme de pouvoir réducteur (NADH, H⁺ et FADH₂) qui pourra être utilisé par la suite dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour faire la phosphorylation oxydative et donc pour produire de plus grandes quantités d'ATP.

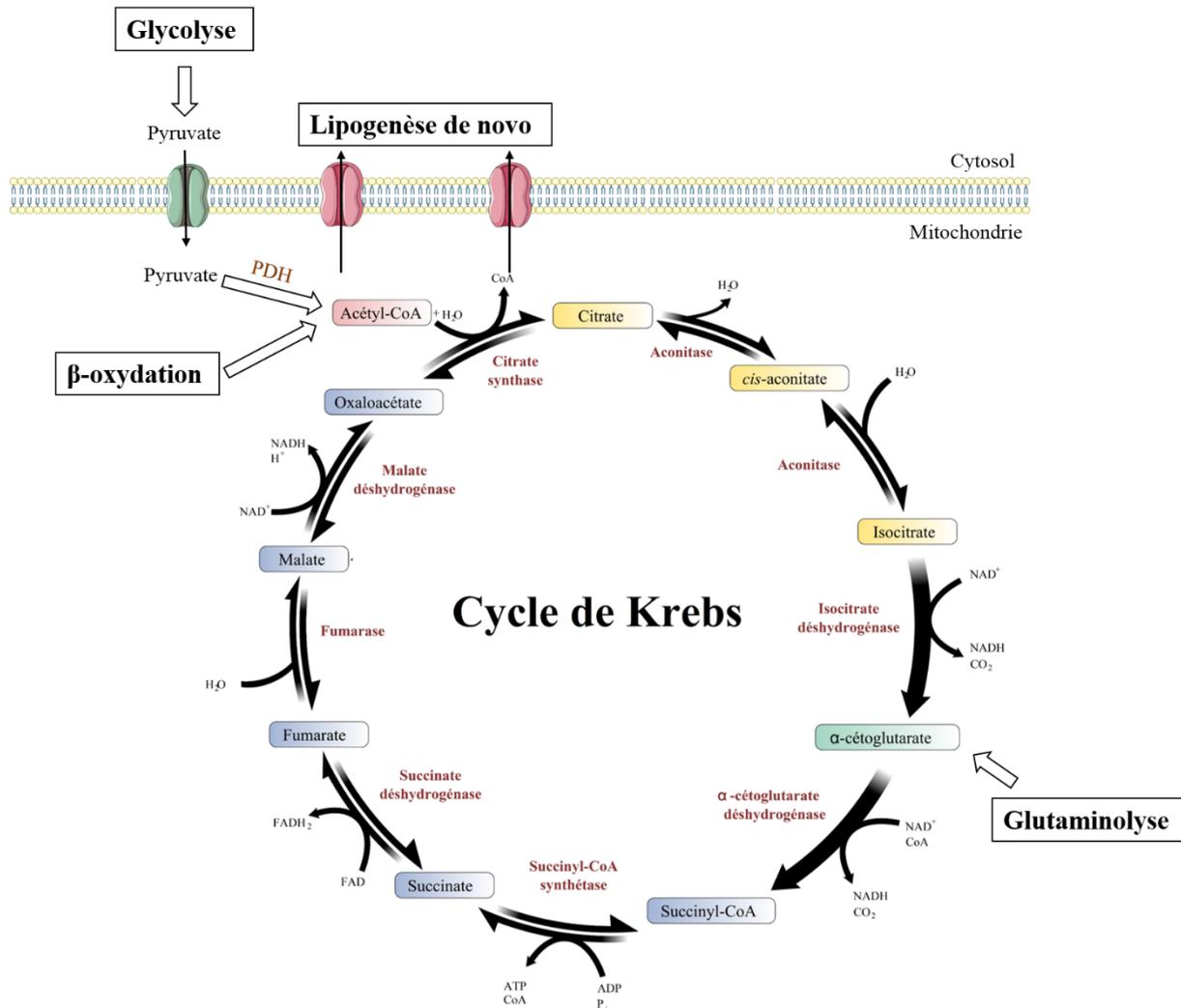


Figure 22 : Le cycle de Krebs et ses connections avec les autres voies métaboliques

2.2.6.2. La phosphorylation oxydative

Chez les mammifères, 80 à 90% de l'ATP est produit par la mitochondrie via la chaîne respiratoire dans un processus appelé phosphorylation oxydative. La chaîne respiratoire correspond à une association de complexes protéiques au sein de la membrane interne de la mitochondrie. La phosphorylation oxydative associe deux grandes étapes : (1) l'oxydation des coenzymes réduits, NADH et du FADH₂, produits lors de différentes voies cataboliques (glycolyse, cycle de Krebs, β-oxydation) par la chaîne de transport d'électrons, à (2) la production d'ATP par phosphorylation d'ADP et de phosphate inorganique ; ceci grâce à la formation d'un gradient de protons (Mitchell, 1966).

La chaîne respiratoire est localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Figure 23). Elle est composée de cinq complexes protéiques : Le complexe I (ou NADH-ubiquinone oxydoréductase), le complexe II (ou succinate ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ou cytochromes b et c1), le complexe IV (ou cytochrome c oxydase) et le complexe V (ou ATP synthase). Ces complexes sont spécialisés dans les réactions d'oxydo-réduction. En effet, ces composants peuvent être tour à tour accepteurs et donateurs d'électrons et forment ainsi une chaîne d'oxydo-réduction.

En pratique, les électrons à haut potentiel de transfert, libérés lors des réactions d'oxydations dans la mitochondrie (cycle de Krebs, β -oxydation) et présents dans la matrice, circulent le long d'un système de transport d'électrons (STE) jusqu'à un accepteur final qui est l'oxygène moléculaire O_2 . Ce transport d'électrons est indispensable pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire, qui est d'oxyder des coenzymes réduits, ce qui génère un gradient de concentration de protons (gradient chimique) de la matrice vers l'espace intermembranaire mais aussi une différence de charges (gradient électrique) transmembranaires (Mitchell, 1966). Ces deux gradients forment un gradient électrochimique capable d'emmagasiner l'énergie libérée par les oxydations de la chaîne respiratoire et de permettre par la suite la phosphorylation de l'ADP en ATP. Le couplage de la respiration à la synthèse d'ATP est un processus global appelé phosphorylation oxydative (OXPHOS) car la chaîne respiratoire utilise l'hydrogénation de l'oxygène pour produire de l'ATP.

L'OXPHOS débute avec l'entrée des électrons dans le STE au niveau des complexes I ou II. Le complexe I oxyde le NADH pour redonner du NAD^+ et transfère deux électrons à l'ubiquinone entraînant sa réduction en ubiquinol. L'énergie de cette réaction d'oxydoréduction permet le transfert de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe I est le plus gros complexe du système de transport des électrons avec 46 sous-unités, pour une taille totale d'environ 1000 kDa (Remacle et al., 2008).

Le complexe II réalise la même réaction chimique, à la différence qu'il utilise du $FADH_2$ comme cofacteur. Le complexe II oxyde donc le $FADH_2$ en FAD et transfère deux électrons à l'ubiquinone. Cette enzyme appartient à la fois au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. Ce complexe ne contribue pas à l'exportation de protons dans l'espace intermembranaire car la réaction d'oxydation du $FADH_2$ ne libère pas suffisamment d'énergie. Les complexes I et II constituent donc les principaux points d'entrée des électrons dans le STE. Néanmoins, il existe d'autres voies d'entrée pour les électrons, telles que l'ETF (électron-transfert-flavoprotéine) et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Watmough and Frerman, 2010). L'ubiquinone, réduite par ces différentes enzymes, joue un rôle clé dans le STE en liant les différentes voies d'entrée des électrons c'est-à-dire le complexe I et II aux autres complexes du STE et en particulier au complexe III.

Ensuite, le complexe III oxyde l'ubiquinone réduite permettant ainsi le transfert des électrons au cytochrome c et la réoxydation de ce complexe. L'oxydation d'une molécule d'ubiquinol conduit à la réduction de deux molécules de cytochrome c. En effet, contrairement à l'ubiquinone, qui transporte deux électrons par molécule, le cytochrome c ne transporte qu'un électron par molécule. Cette réaction permet la translocation de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire par molécule d'ubiquinone oxydée. Le cytochrome c assure le transfert des électrons entre le complexe III et le complexe IV.

Le complexe IV est l'enzyme terminale du STE et catalyse donc la dernière réaction d'oxydoréduction en transférant les électrons du cytochrome c réduit à l'accepteur final des électrons, l'oxygène (Yoshikawa et al., 2006). La réduction d'une molécule d'O₂ va permettre la réoxydation du complexe IV. Deux molécules d'eau H₂O sont formées par molécule d'oxygène réduite nécessitant quatre électrons, tandis que quatre protons sont expulsés vers l'espace intermembranaire mitochondrial, ce qui contribue à la génération du gradient de concentration de protons à travers la membrane interne mitochondriale.

Le transport des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire génère un potentiel électrochimique qui a été décrit sous le nom de théorie chimio-osmotique de Mitchell (Mitchell, 1961). La translocation de protons aboutit à l'acidification de l'espace intermembranaire et à la création d'un potentiel électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne car celle-ci possède une faible perméabilité aux protons. Ce gradient de protons constitue une réserve d'énergie qui est finalement utilisée par le complexe V pour produire l'ATP.

La dernière étape de l'OXPPOS est constituée par le complexe V ou ATP synthase. Comme son nom l'indique l'ATP synthase utilise la force proton-motrice afin de produire l'ATP à partir de l'ADP. En effet, le gradient électrochimique contribue à alimenter l'ATP synthase qui va propulser des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, 4 protons sont nécessaires pour produire une molécule d'ATP à partir d'un ADP et d'un orthophosphate inorganique (Pi). L'ATP synthase est composé de deux sous-unités (Arnold et al., 1998) : une permettant d'ancrer le complexe à la membrane et formant un pore perméable aux protons (F₀) (Collinson et al., 1994a, 1994b; García et al., 2006) et une autre contenant le site catalytique activé par le passage des protons (F₁), induisant ainsi la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP. Les protons précédemment transférés par les complexes I, III et IV sont présents en plus grande quantité dans l'espace intermembranaire et tendent donc à vouloir retourner dans la matrice mitochondriale. Comme la membrane interne est imperméable aux protons, ces derniers peuvent traverser la MMI au niveau du pore formé par l'ATP synthase. Ce flux provoque un changement de conformation du site catalytique de l'ATP synthase conduisant à son activation et la

fixation de l'ADP et du Pi (Nakamoto et al., 2008; Walker, 2013). Puis le site actif se resserre sur les substrats et les condense en ATP qui est ensuite libéré dans la matrice mitochondriale. L'hydrolyse de l'ATP est très exergonique et peut être couplée à plusieurs réactions endergoniques dans la cellule. L'ATP est pour cette raison une molécule riche en énergie, mais qui ne peut être considérée comme une réserve énergétique car la demi-vie de l'ATP est très courte (environ une minute).

Cet ATP, produit à l'intérieur de la mitochondrie, doit assurer l'énergie des réactions biochimiques de la cellule et doit donc de ce fait être exporté hors de la mitochondrie. L'ATP est exporté dans l'espace intermembranaire par des transporteurs de nucléotides adényliques (ANT) (Chevrollier et al., 2011). L'ANT échange une molécule d'ADP cytosolique contre une molécule d'ATP matricielle. Etant donné que ce processus est électrogénique, l'échange ADP-ATP s'accompagne d'une consommation du potentiel de membrane mitochondrial (Trézéguet et al., 2008). Puis l'ATP rejoint le cytosol de la cellule grâce à des canaux PTP (permeability transition pore) ou VDAC localisés dans la membrane externe de la mitochondrie.

Chez l'homme, la plus grande partie de l'énergie utilisée par les cellules est produite par la phosphorylation oxydative. Cependant le gradient de protons n'est pas seulement essentiel pour la production d'ATP, il est nécessaire à l'import des protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale (Geissler et al., 2000; Schleyer et al., 1982).

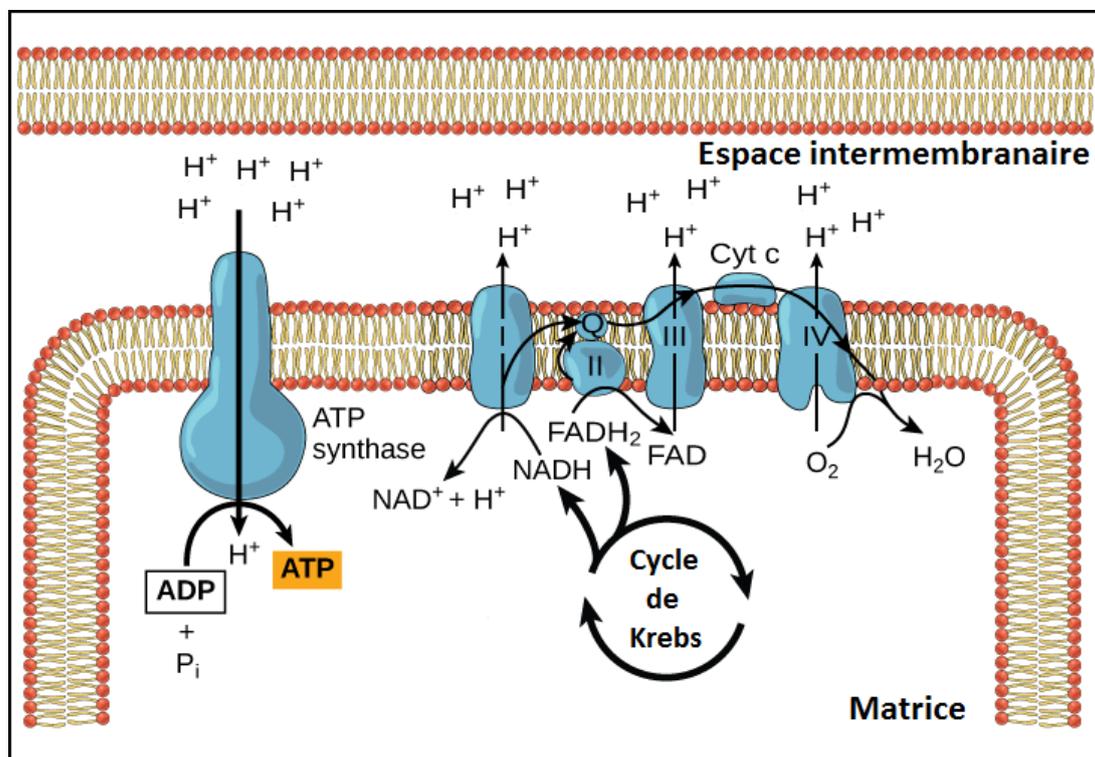


Figure 23 : La phosphorylation oxydative

*I : complexe I ; II : complexe II ; III : complexe III ; IV : complexe IV ; Q : coenzyme Q ; Cyt C : cytochrome c
(Adapté de : https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:7oTVAgrZ@7/Oxidative-Phosphorylation)*

2.2.7. Métabolisme mitochondrial et cancer

La glycolyse a longtemps été considérée comme le changement métabolique majeur pour la production d'énergie et la croissance des cellules tumorales (Warburg et al., 1927). Bien qu'une telle vision ait été déterminante pour le développement des outils d'imagerie médicale encore utilisés aujourd'hui (FDG-PET scan) (Vander Heiden et al., 2009), les outils et recherches du 20^{ème} siècle ont permis d'abolir deux grandes hypothèses fausses sur le cancer : la première est la notion que le cancer est un désordre exclusivement intrinsèque à la cellule provenant de modifications génétiques et épigénétiques (Bui and Schreiber, 2007; Kroemer et al., 2015). La deuxième est le point de vue selon lequel les cellules tumorales utilisent uniquement la glycolyse aérobie pour leurs besoins bioénergétiques et anaboliques (Danhier et al., 2017; Erez and DeBerardinis, 2015). En effet, il a été montré que des cellules tumorales dans lesquelles les mitochondries ont été rendues non-fonctionnelles se divisent moins rapidement. Donc toutes les fonctions propres à la mitochondrie sont requises pour maintenir la croissance et la prolifération rapides des cellules tumorales (Holmuhamedov et al., 2002; Mullen et al., 2011; Tan et al., 2015). Il est maintenant complètement accepté que les tumeurs se forment, croissent, métastasent et répondent aux thérapies grâce à des interactions avec le microenvironnement tumoral et le système immunitaire (Chen and Mellman, 2017; Galluzzi et al., 2015). De même qu'il est maintenant admis que le métabolisme mitochondrial influence fondamentalement toutes les étapes de l'oncogenèse comme la transformation maligne, la progression et l'échappement tumorale et la réponse aux traitements (Vyas et al., 2016; Wallace, 2012). L'intérêt pour l'étude des mitochondries dans le cancer est réapparu au milieu des années 1990 avec la mise en évidence que la perméabilisation de la MME est une étape décisive dans la régulation et le déclenchement de l'apoptose (Liu et al., 1996; Zamzami et al., 1995a, 1995b, 1996). Cette découverte a déclenché une importante vague d'investigation qui a permis, quelques années plus tard, de constater que la plus grande majorité des cellules cancéreuses présentent une résistance à la mort cellulaire, le plus souvent dû à des altérations dans le processus de régulation mitochondriale (Hanahan and Weinberg, 2000). De plus, ce ré engouement pour l'étude des mitochondries a mis en lumière de nouvelles perspectives sur l'implication du métabolisme mitochondrial dans le cancer. En effet, il est maintenant clair que plusieurs métabolites mitochondriaux sont suffisants pour entraîner la tumorigénèse (Dang et al., 2009b) et que les voies métaboliques mitochondriales peuvent être modulées aux besoins bioénergétiques et anaboliques des cellules cancéreuses, leur conférant ainsi une plasticité métabolique mitochondriale importante (Fendt et al., 2013; Wise et al., 2011). En conséquence, le métabolisme mitochondrial est devenu une cible thérapeutique prometteuse pour le développement de nouveaux agents anticancéreux et comme stratégie pour la chimio- et la radio-sensibilisation (Fulda et al., 2010; Galluzzi et al., 2013; Martinez-Outschoorn et al., 2017). C'est le cas

de la metformine, une molécule prescrite à la base contre le diabète de type II et possédant des propriétés antitumorales mises en évidence par plusieurs études épidémiologiques (Giovannucci et al., 2010; Quinn et al., 2013). De ce fait, plusieurs laboratoires, dont le nôtre, ont cherché, au cours de ces dernières années, à comprendre son implication dans de nombreux types de cancers différents. Ces études montrent que la metformine agit comme un perturbateur majeur du métabolisme des cellules cancéreuses en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant l'inhibition de la prolifération et de la croissance tumorale dans de nombreux type de cancers, dont le CaP (Ben Sahra et al., 2011; Dirat et al., 2015; Loubiere et al., 2017).

2.2.8. Métabolisme mitochondrial et cancer de la prostate

Le métabolisme du citrate, un intermédiaire du cycle de Krebs, joue un rôle important dans la prostate (cf « Métabolisme normal de la prostate saine »). Dans la prostate saine, le citrate s'accumule dans la mitochondrie à cause de l'inhibition de l'aconitase par les fortes concentrations de zinc (Figure 18) (Costello and Franklin, 2016; Costello et al., 2004, 2005a; Dakubo et al., 2006). L'inhibition de l'aconitase entraîne un blocage du cycle de Krebs, en aval de cette enzyme, et des voies anaplérotiques se mettent en place pour alimenter le cycle. Au début de leur transformation maligne, les cellules épithéliales de prostate ne sont pas dépendantes de l'effet Warburg (cf. « Métabolisme normal de la prostate saine ») mais semblent au contraire augmenter leur dépendance à l'O₂PHOS. Alors que la majorité des cancers augmentent la glycolyse aérobie, les cellules cancéreuses de prostate présentent une activité du cycle de Krebs beaucoup plus élevée que dans les cellules saines (Costello et al., 2004). Ceci s'explique par le fait que les cellules cancéreuses de prostate inversent le métabolisme du citrate, en stoppant l'accumulation de zinc et en oxydant le citrate dans le cycle de Krebs, entraînant donc un changement métabolique majeur (Franz et al., 2013) et crucial pour la pathogenèse du CaP. Cette reprogrammation métabolique permet aux cellules cancéreuses de prostate d'utiliser pleinement le cycle de Krebs et donc l'O₂PHOS. En effet, les cellules prostatiques malignes diminuent leur quantité de zinc stocké, à l'intérieur de leurs mitochondries, dans la but d'utiliser au maximum le cycle de Krebs et également d'échapper à l'apoptose (Feng et al., 2002) car une accumulation trop importante de zinc dans les mitochondries peut conduire à la mort cellulaire. Cette réduction de la quantité de zinc mitochondrial est médiée par la diminution de l'activité du transporteur du zinc (ZIP1) par les cellules cancéreuses de prostate lors de la transformation maligne. Cette baisse de la concentration de zinc lève l'inhibition de l'aconitase et donc augmente son activité et par conséquent celle du cycle de Krebs. Il est donc important de souligner que l'altération du métabolisme du citrate et du zinc dans le CaP a un double rôle : (1) permettre l'oxydation du citrate et par conséquent augmenter l'énergie disponible pour la croissance tumorale ; (2) permettre aux cellules du CaP d'échapper à la mort cellulaire (Costello et al., 2005a). De ce fait, de nombreuses preuves expérimentales ont montré les effets

antinéoplasiques du zinc (Cortesi et al., 2008; Costello et al., 2005b). Ces études, *in vitro* par supplémentation mais également *in vivo* au cours de régimes riches en zinc, ont montré, respectivement, une augmentation de l'apoptose des cellules prostatiques tumorales (Ku et al., 2012) et une diminution du développement et de la croissance tumorale chez des souris sous régimes supplémentés avec du zinc (Costello et al., 2015). De plus, des données épidémiologiques sur les effets du zinc (Gallus et al., 2007; Gonzalez et al., 2009) et en particulier sur la prévention du CaP ont été publiées (Epstein et al., 2011; Kristal et al., 2010). Actuellement des études sont en cours pour évaluer l'efficacité de la combinaison des thérapies anticancéreuses avec le zinc pour le traitement du CaP (Chen et al., 2013; Uzzo et al., 2002).

2.3. Métabolisme lipidique

Les acides gras jouent un rôle structurel fondamental pour les cellules en étant impliqués dans la synthèse et la perméabilité des membranes. Ils participent à l'homéostasie cellulaire via leurs interactions avec différentes voies de signalisation cellulaire et sont également une source importante d'énergie permettant de stocker plus d'énergie que les glucides. Leur dégradation, par une réaction dite de β -oxydation, fournit des substrats intermédiaires pour le cycle de Krebs et produit donc de grande quantité d'ATP. Les acides gras sont apportés en grande quantité par l'alimentation mais peuvent également être synthétisés par les cellules à travers un ensemble de processus métaboliques appelés lipogénèse *de novo* (Maier et al., 2006).

2.3.1. La lipogénèse *de novo*

La lipogénèse *de novo* est un processus anabolique permettant la synthèse de nouvelles molécules d'acides gras à partir de substrats non lipidiques et s'effectue dans le compartiment cytosolique des cellules (Figure 24). L'acétyl-CoA est le substrat essentiel de la biosynthèse des acides gras. Il est formé à partir du citrate provenant de la dégradation du glucose ou de la glutamine. Le pyruvate, produit final de la glycolyse, est métabolisé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui rentre dans le cycle de Krebs mitochondrial. En fonction de la teneur en oxygène et de besoins énergétique de la cellule, le citrate produit va soit continuer dans le cycle de Krebs soit être transporté dans le cytoplasme. L'autre source de citrate est la voie de catabolisme de la glutamine. En effet, la glutamine va être transformée, par plusieurs réactions enzymatiques cytoplasmiques successives (cf. « Glutaminolyse »), en citrate qui pourra être utilisé soit dans le cycle de Krebs soit dans la lipogénèse. Le citrate cytoplasmique produit par ces deux voies va ensuite être converti en oxaloacétate et acétyl-CoA via l'ATP citrate lyase (ACLY). A ce moment-là, l'acétyl-CoA formé va entrer dans la lipogénèse.

La première véritable étape de la lipogénèse est la métabolisation de l'acétyl-CoA et d'une molécule d'ATP pour former une molécule de malonyl-CoA, précurseur des acides gras, par l'acétyl-CoA

carboxylase (ACC). Ensuite, toutes les activités enzymatiques nécessaires à la lipogenèse sont regroupées au sein d'une même chaîne peptidique constituant un complexe protéique multienzymatique géant nommé acide gras synthase (FAS). Ceci permet un meilleur rendement en raison de la proximité des sites catalytiques (Turner et al., 2014). Chaque cycle de FAS ajoute deux carbones sur la chaîne d'acyl gras, l'élongation s'arrête en général après 7 ou 8 cycles quand une molécule d'acide palmitique a été obtenue.

Le bilan de la synthèse d'une molécule d'acide palmitique est la consommation de 7 molécules d'acétyl-CoA, 7 molécules de malonyl-CoA, 7 molécules d'ATP et 14 molécules de NADPH et la production d'une molécule d'acide palmitique (C16 :0), 8 molécules de coenzyme A, 7 molécules d'ADP et 14 molécules de NADP (Ecker and Liebisch, 2014). Les acides gras produits vont ensuite être estérifiés avec du glycérol-3-phosphate en triacylglycérol, la forme stockable des acides gras.

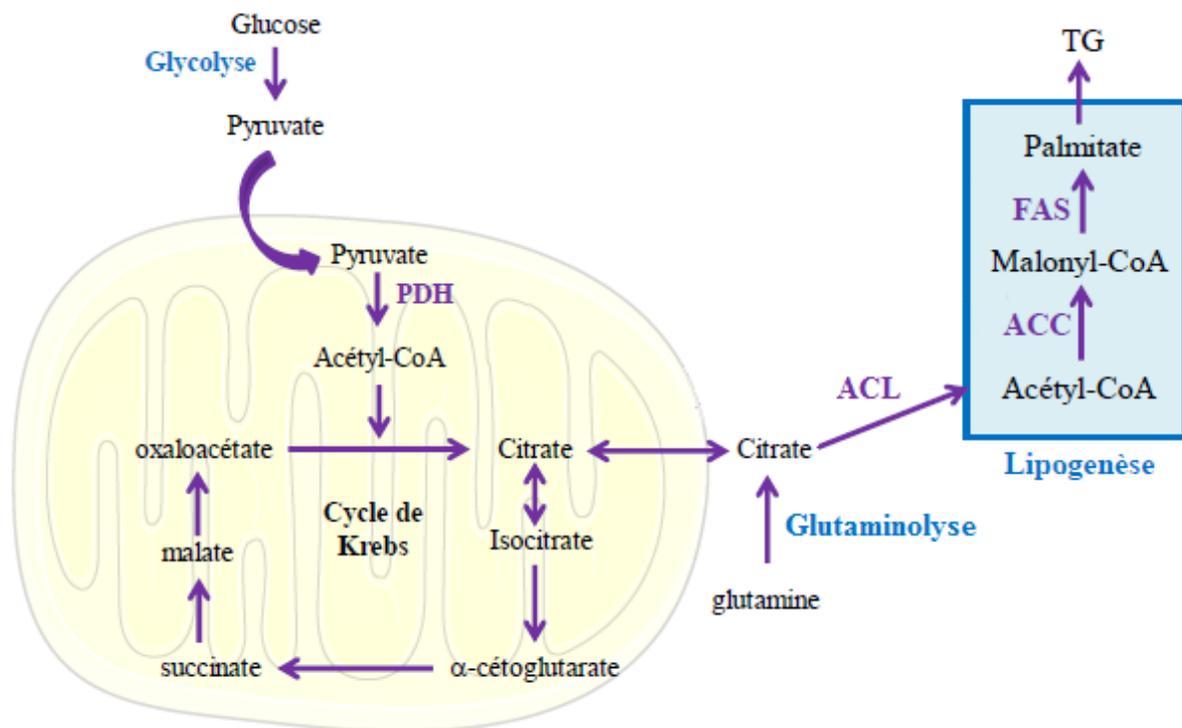


Figure 24 : Voie de biosynthèse des acides gras
(Adapté du livre de biochimie générale de Jacques-Henry Weil)

Lipogenèse et cancer

Les tumeurs solides requièrent de grandes quantités de lipides pour leurs proliférations et en particulier pour la synthèse de leurs membranes. Dans les tissus normaux, les lipides viennent principalement de la circulation sanguine, alors que les cellules cancéreuses utilisent principalement la lipogenèse *de novo* pour synthétiser les lipides (Medes et al., 1953). En fonction du type tumoral, les cellules cancéreuses synthétisent plus de 95% des acides gras par la lipogenèse *de novo* même avec un

approvisionnement suffisant par les lipides alimentaires. Donc l'augmentation de la lipogenèse est une caractéristique métabolique importante des cellules cancéreuses (Swinnen et al., 2006). De plus, il a été montré que cette augmentation de la lipogenèse est couplée au métabolisme du glucose et à l'effet Warburg. En effet, quand les cellules cancéreuses passent à un métabolisme glycolytique elles catabolisent du glucose au-delà de leurs besoins énergétiques et donc synthétisent du pyruvate en excès qui peut alors être redirigé vers la lipogenèse *de novo*. L'augmentation de cette dernière permet aux cellules cancéreuses de synthétiser de grandes quantités d'acides gras requis pour s'adapter à leur prolifération accrue (Menendez and Lupu, 2007).

Cette reprogrammation métabolique apparaît dès les premières étapes de tumorigénèse et s'expand au fur et à mesure que les cellules deviennent malignes. Un nombre important d'études ont montré que la lipogenèse joue également un rôle dans l'activation du cycle cellulaire et dans la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Ce qui suggère que l'activation de la synthèse des acides gras est nécessaire pour la carcinogénèse et pour la survie des cellules tumorales (Kuhajda et al., 2000; Menendez and Lupu, 2007; Zhou et al., 2007).

Il n'est donc pas surprenant que plusieurs études aient montrées une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de la lipogenèse dans différents types de tumeurs. C'est le cas de la FAS surexprimée dans de nombreux types de cancers comme les cancers du sein, de l'endomètre, des ovaires, des poumons, du colon et de la prostate, et en particulier dans les phases précoces de l'oncogénèse et sont corrélées avec la progression tumorale (Pizer et al., 2001; Rashid et al., 1997; Rossi et al., 2003; Swinnen et al., 2002).

Toutes ces observations constituent donc des preuves laissant penser que la lipogenèse est une cible pertinente pour le traitement du cancer (Kuhajda et al., 2000; Rysman et al., 2010). Plusieurs groupes de recherche ont montré que le ciblage thérapeutique par l'inhibition de différentes enzymes de la synthèse lipidique comme la FAS, l'ACC ou encore l'ACLY entraînait, *in vivo* et *in vitro*, la régression tumorale (Chajès et al., 2006; Hatzivassiliou et al., 2005; Kridel et al., 2004; Mashima et al., 2009). Cependant, les effets cytotoxiques de l'inhibition de la lipogenèse *de novo* peuvent être contournés par l'utilisation, par les cellules tumorales, des lipides fournis par l'alimentation (Zaidi et al., 2012). Les cellules cancéreuses peuvent donc incorporer et utiliser les lipides exogènes, pour leurs besoins, comme une source alternative d'acide gras, en addition de la synthèse *de novo* d'acides gras (Kuemmerle et al., 2011). Ces observations suggèrent donc l'implication des acides gras exogènes pour la croissance et la survie des cellules tumorales et soulignent également l'impact des régimes riches en graisses dans la biologie du cancer.

2.3.2. La β -oxydation

A l'inverse de la lipogenèse, la β -oxydation est la principale voie métabolique cellulaire de dégradation des molécules d'acides gras ce qui libère leur potentiel énergétique. Pour que cette réaction ait lieu, les acides gras doivent entrer dans les cellules, ce qui peut se faire uniquement s'ils sont sous forme libre, c'est-à-dire non complexés en triglycérides ou à l'albumine. La lipoprotéine lipase permet d'hydrolyser les triglycérides circulant dans le sang en acides gras libres, capables de pénétrer dans les cellules en diffusant à travers la membrane plasmique. Dans les cellules eucaryotes, la β -oxydation se déroule en aérobose au sein des mitochondries et plus spécifiquement dans la matrice mitochondriale, même si la première étape se situe dans le cytoplasme. En effet, avant d'être oxydés, les acides gras libres doivent être activés en acyl-CoA. Pour les acides gras à chaînes courtes pouvant diffuser à travers les membranes mitochondriales, cette activation en acyl-CoA peut être réalisée au sein de la matrice mitochondriale. Alors que, pour les acides gras à longues chaînes cette activation se fait dans le cytoplasme. Pour cela, ils vont être couplés à une molécule de coenzyme A pour former un acyl-CoA à longues chaînes, via l'acyl-CoA synthétase. Cette réaction nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Les acyl-CoA à longues chaînes ne traversent pas les membranes de la mitochondrie et sont transportés par la navette de la carnitine CPT1 et CPT2 (L-carnitine palmitoyltransferase 1 et 2). Une fois entrés dans la mitochondrie, les acyl-CoA sont dégradés en acétyl-CoA par une succession cyclique de quatre réactions enzymatiques se déroulant dans la matrice mitochondriale (Lynen, 1953) (Figure 25).

Le bilan pour chaque cycle d'oxydation d'un acyl-CoA est donc : une molécule d'acétyl-CoA, une molécule d'acyl-CoA raccourcie de 2 carbones, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH. L'acétyl-CoA formé pourra lui être utilisé soit par le cycle de Krebs, la lipogenèse ou encore la cétogenèse. L'acyl-CoA obtenu va lui être réengagé dans un cycle de β -oxydation jusqu'à ce que toute sa chaîne aliphatique soit dégradée en acétyl-CoA. Lorsque la chaîne aliphatique comprend un nombre impair de carbones, le dernier cycle d'oxydation conduit à la formation d'une molécule d'acétyl-CoA et une molécule de propionyl-CoA. Ce dernier est transformé en succinyl-CoA, qui entrera dans le cycle de Krebs.

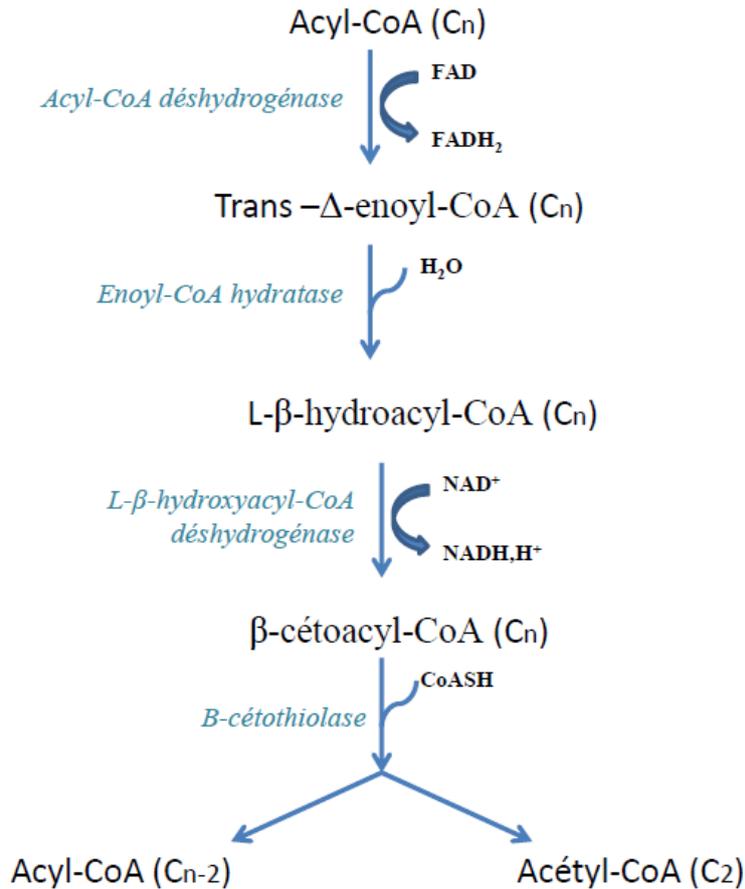


Figure 25 : La β -oxydation
(Adapté du livre de biochimie générale de Jacques-Henry Weil)

β -oxydation et cancer

Bien que la pertinence, dans le cancer, de l'oxydation des acides gras n'ait pas été aussi largement étudié que la synthèse des acides gras, des études récentes commencent à mettre en lumière les fonctions de l'oxydation des acides gras dans les cellules tumorales, principalement par l'étude de CPT1.

Il a été montré que CPT1, l'enzyme catalysant l'étape limitante de la β -oxydation, est surexprimée dans de nombreux types de cancers et est associée avec la progression tumorale dans, entre autres, les cancers du sein, gastriques, de la prostate, du poumon, de l'ovaire. La surexpression de CPT1 permet d'activer la β -oxydation et donc d'augmenter la quantité d'ATP et les réserves de NADH et de FADH₂. De plus, l'altération de la β -oxydation par l'inhibition de CPT1 bloque la croissance des cellules tumorales (Pucci et al., 2016; Ricciardi et al., 2015; Schlaepfer et al., 2014) et sensibilisent les cellules tumorales à l'apoptose (Giordano et al., 2005; Paumen et al., 1997). L'augmentation de la β -oxydation a donc la capacité d'alimenter la croissance tumorale et de conférer un avantage de survie aux cellules cancéreuses (Carracedo et al., 2013; Hossain et al., 2015; Ricciardi et al., 2015).

La β -oxydation est également impliquée dans la résistance aux chimiothérapies. En effet, il a été observé que l'inhibition de l'oxydation des acides gras sensibilise les cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques en abolissant la chimiorésistance (Li et al., 2013; Tung et al., 2013). En conclusion, l'inhibition de l'oxydation des acides gras semble être une approche intéressante pour la thérapie anti-cancéreuse mais nécessite de plus amples investigations.

2.3.3. Métabolisme lipidique et cancer de la prostate

Les tumeurs prostatiques sont connues pour être très dépendantes de la synthèse et de l'oxydation des acides gras. En effet, les acteurs centraux de ces deux voies sont surexprimés dans les CaP, la FAS et l'ACC pour la lipogenèse (Baron et al., 2004) et CPT1 pour la β -oxydation (Sadeghi et al., 2015; Schlaepfer et al., 2014).

La surexpression de FAS est un évènement précoce de la tumorigenèse prostatique et est associée avec la progression tumorale (Pflug et al., 2003) et la formation de métastases osseuses (Rossi et al., 2003; Swinnen et al., 2000, 2002). De plus, l'expression ectopique de FAS dans des cellules épithéliales saines de prostate conduit à la formation de PIN et à la progression vers un phénotype invasif (Migita et al., 2009). L'inhibition de FAS entraîne la suppression de l'adhésion cellulaire, réduit la migration et diminue la croissance tumorale (Wu et al., 2014). De ce fait, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de FAS sont actuellement testés pour leur potentiel intérêt thérapeutique dans le CaP (Flavin et al., 2010, 2011; Pemble et al., 2007).

Les tumeurs de prostate augmentent fortement leur consommation d'acide gras et utilisent la β -oxydation comme leur principale source d'énergie pour leur survie et leur croissance (Liu, 2006; Liu et al., 2010). En effet, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la β -oxydation diminue la quantité d'ATP disponible et empêche la prolifération des lignées cancéreuses de prostate (Liu, 2006). Ces tumeurs surexpriment certaines enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras (Zha et al., 2005), en particulier CPT1 (Liu, 2006; Schlaepfer et al., 2014). L'inhibition de CPT1 bloque la croissance tumorale prostatique et pourrait donc être une nouvelle cible thérapeutique pour les traitements antitumoraux (Schlaepfer et al., 2014). De façon intéressante, cette inhibition a également conduit à l'activation de la glycolyse aérobie et a permis d'améliorer le signal de détection des tumeurs prostatiques au scanner FGF-PET (Schlaepfer et al., 2015). On peut donc spéculer que l'activation de la glycolyse aérobie due à l'inhibition de CPT1 permettrait de compenser l'énergie perdue à cause de la β -oxydation non fonctionnelle, il pourrait donc y avoir un effet complémentaire de ces deux voies. De plus, il a été suggéré que l'inhibition simultanée de la lipogenèse *de novo* et de la β -oxydation pourrait être très efficace pour le traitement de certains cancers, en particulier le CaP (Schlaepfer et al., 2014).

2.4. Métabolisme de la glutamine

2.4.1. Glutaminolyse

La glutamine est l'acide aminé non essentiel le plus abondant dans la circulation (Cynober, 2002). Tout comme les autres acides aminés, elle joue un rôle important en tant que constituant des protéines (Hosios et al., 2016) et est également le principal transporteur d'ammoniac sous sa forme non toxique (Dang, 2010; DeBerardinis et al., 2007). La glutamine, en étant non essentielle, est indispensable à la biosynthèse des acides aminés essentiels, n'étant pas synthétisés par l'organisme (Hosios et al., 2016). Le métabolisme de la glutamine est aussi impliqué dans la biosynthèse des bases azotées. En effet, la glutamine est un donneur indispensable de nitrogène réduit, nécessaire à la synthèse des bases purines et pyrimidines (Hosios et al., 2016; Wise and Thompson, 2010). En plus de ce rôle, la glutamine, comme le glucose, est une importante source de carbone pour les besoins bioénergétiques et biosynthétiques des cellules. En effet, les intermédiaires carbonés dérivés de la glutamine interviennent dans des voies anaplerotiques, en particulier le cycle de Krebs (Altman et al., 2016; DeBerardinis et al., 2007), comme source alternative, au glucose, pour produire de l'ATP. La glutamine sert également à la production de précurseurs essentiels à la synthèse des acides gras (Metallo et al., 2011).

Les étapes de la glutaminolyse se déroulent dans la mitochondrie, de ce fait la glutamine doit en premier entrer dans la cellule puis ensuite dans la mitochondrie pour être dégradée. Le transporteur principal de glutamine dans les cellules est ASCT2 (ou SLC1A5) (Bhutia et al., 2015; Bode, 2001; Pochini et al., 2014). Une fois dans la mitochondrie, la glutamine est en premier convertie en glutamate via une glutaminase (GLS) (Matés et al., 2013). Le glutamate est ensuite converti en α -cétoglutarate par deux classes d'enzymes différentes qui produiront des intermédiaires différents en fonction des besoins de la cellule (Wise and Thompson, 2010; Yang et al., 2017). La première classe d'enzyme est les transaminases, incluant la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT), la glutamate-pyruvate transaminase (GPT), et la phosphosérine transaminase (PSAT). Ces enzymes sont capables de générer, à partir du glutamate, de l' α -cétoglutarate. La deuxième enzyme capable de métaboliser le glutamate en α -cétoglutarate est la glutamate déshydrogénase (GLUD). Cette réaction s'accompagne de la production de cofacteurs NADH ou NADPH. L' α -cétoglutarate généré sert principalement en tant que substrat anaplerotique dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP et régénérer des cofacteurs par l'OXPPOS (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). L' α -cétoglutarate peut également être carboxylé en citrate par l'isocitrate déshydrogénase 1 ou 2, dans respectivement le cytoplasme et la matrice mitochondriale. Ce citrate pourra, comme vu précédemment (chapitre XXX), être utilisé dans la lipogenèse *de novo* pour la synthèse d'acides gras l'OXPPOS (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). Les autres métabolites du cycle de Krebs dérivant de la glutaminolyse peuvent également sortir du cycle de Krebs et être utilisés dans d'autres

réactions. C'est, par exemple, le cas du malate qui, dans le cytoplasme, peut être transformé en pyruvate par l'enzyme malique (ME) (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). L'oxaloacétate peut également être converti en aspartate puis soit en en asparagine soit consommé dans la voie de synthèse des nucléotides l'OXPPOS (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). Donc l'anaplérose de la glutamine dans le cycle de Krebs fournit des précurseurs indispensables pour l'OXPPOS, la synthèse d'acides aminés non essentiels, de nucléotides et de lipides (Figure 26).

La glutaminolyse est donc un processus se mettant en place dans le cas où le niveau énergétique cellulaire est insuffisant. Quand les cellules ont un niveau d'énergie très élevé (forte concentration d'ATP, de NAD(P)H et d' α -cétooglutarate), elles se mettent préférentiellement à synthétiser de la glutamine plutôt que de la cataboliser. La glutamine est synthétisée de manière endogène à partir de l' α -cétooglutarate, via la glutamate déshydrogénase qui aboutit à la formation de glutamate. Ce dernier est métabolisé en glutamine grâce à la glutamine synthase. Cependant, quand les cellules sont hautement prolifératives, les besoins en glutamine augmentent et la synthèse intracellulaire de glutamine ne suffit plus, la glutamine doit donc être absorbée de façon exogène (Altman et al., 2016) ce qui fait que cet acide aminé peut devenir limitant dans certaines conditions.

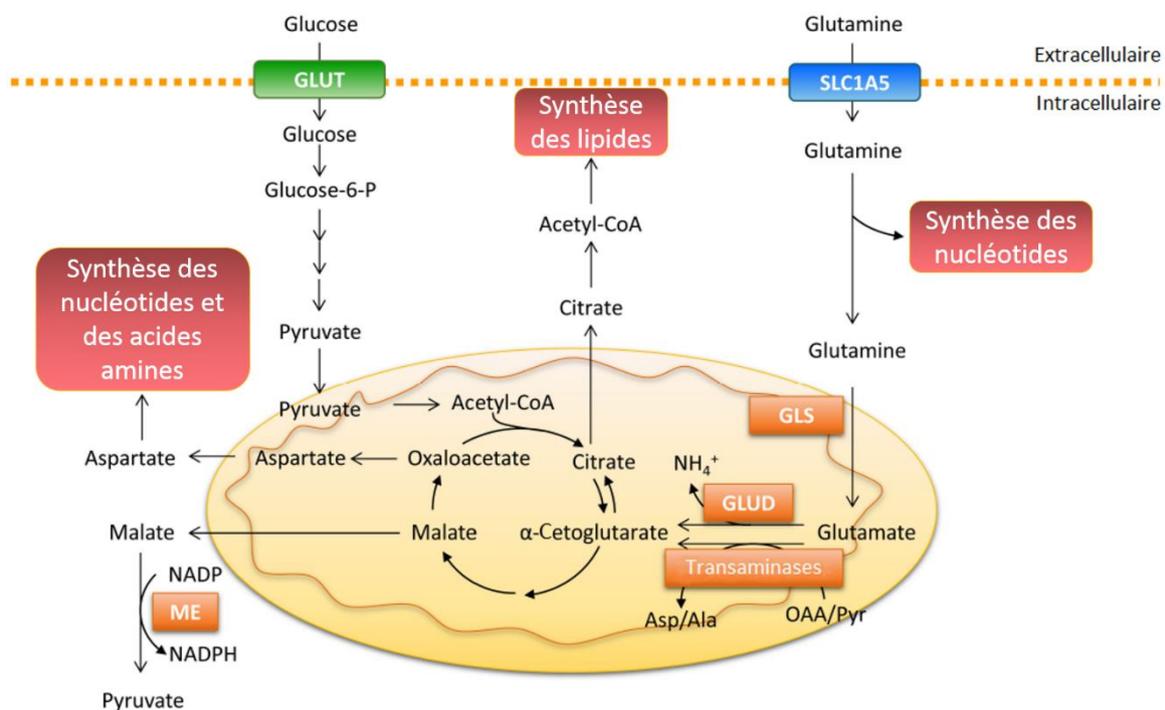


Figure 26 : Le métabolisme de la glutamine (Adapté de (Choi and Park, 2018))

2.4.2. Métabolisme de la glutamine et cancer

L'importance de la glutaminolyse pour la prolifération des cellules cancéreuses a été mise en évidence il y a quelques décennies par Harry Eagle, qui a montré que la croissance optimale des cellules HeLa requière des concentrations de glutamine de 10 à 100 fois supérieures aux autres acides aminés dans le milieu de culture (Eagle, 1955). Depuis il a été montré que, *in vitro*, la plupart des cellules cancéreuses consomment beaucoup plus de glutamine par rapport aux autres acides aminés et sont souvent dépendantes de la glutamine extracellulaire pour leur survie (DeBerardinis and Cheng, 2010). Plusieurs études ont également montré que beaucoup de cellules cancéreuses sont dépendantes de la glutamine et ne peuvent survivre en absence de glutamine exogène, ce qui a été appelé « glutamine addiction ». De plus, la glutamine est l'acide aminé consommé le plus rapidement par de nombreux types de tumeurs *in vivo* (Márquez et al., 1989; Sauer et al., 1982). En effet, de nombreuses tumeurs sont associées avec une déplétion de la glutamine dans l'environnement tumoral comparée au tissu sain correspondant (Márquez et al., 1989; Rivera et al., 1988; Roberts and Frankel, 1949; Yuneva et al., 2012). La glutamine est donc, avec le glucose, le principal nutriment supportant la survie et la demande biosynthétiques dans les cellules cancéreuses hautement prolifératives.

A travers l'augmentation du catabolisme de la glutamine, les cellules cancéreuses sont capables de maintenir leurs réserves de divers intermédiaires carbonés, qui sont indispensables pour la formation de macromolécules variées nécessaires à leur croissance et prolifération (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). En effet, durant la rapide prolifération des cellules tumorales, le citrate (dérivant du glucose) est continuellement exporté du cycle de Krebs en faveur de la biosynthèse des lipides (Vander Heiden et al., 2009). Donc pour remédier au troncage du cycle de Krebs, la glutamine, via l'anaplérose, réapprovisionne le cycle de Krebs et continue donc la synthèse de précurseurs biosynthétiques comme le citrate (DeBerardinis et al., 2007, 2008). En plus de la synthèse de citrate, la glutamine est une source alternative de carbone pour la formation de 10 à 25% d'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse de lipides (Jiang et al., 2016; Metallo et al., 2011). De plus, les cellules cancéreuses sont capables de contrôler par quelle voie elles vont oxyder la glutamine en fonction de leur besoin : soit par le cycle de Krebs pour produire du NADH et du FADH qui médient la génération d'ATP par l'OXPPOS, soit en produisant du NADPH, un puissant réducteur pour une large variété de réaction biosynthétiques et participant à la régulation de l'homéostasie redox cellulaire (Altman et al., 2016). De façon importante, empêcher la glutamine d'entrer dans le cycle de Krebs peut enrayer la croissance tumorale (Le et al., 2012; Xiang et al., 2015; Yuneva et al., 2012) (Xiang et al., 2015 ; Yuneva et al., 2012 ; Le et al., 2012) Donc l'anaplérose, indispensable à la synthèse d'énergie et d'acides gras dans les cellules cancéreuses, est hautement dépendante du métabolisme de la glutamine.

Dans le cancer, la glutamine n'est pas seulement un donneur de carbones, c'est également un donneur de nitrogène nécessaire à la biosynthèse *de novo* de plusieurs composés contenant du nitrogène, comme les bases purines et pyrimidines, requises pour la réplication de l'ADN des cellules cancéreuses, (DeBerardinis and Cheng, 2010; Locasale, 2013) et les acides aminés non essentiels, aspartate, alanine et sérine (DeBerardinis and Cheng, 2010). En effet, une étude a montré qu'au moins 50% des acides aminés non essentiels nécessaires à la synthèse protéique proviennent, dans les cellules cancéreuses, de la glutamine (Alberghina and Gaglio, 2014). L'implication de la glutamine a également été montrée dans l'absorption des acides aminés essentiels comme la leucine, l'isoleucine, la valine, la méthionine, tyrosine, le tryptophane, et la phénylalanine (Nicklin et al., 2009; Yanagida et al., 2001).

Durant la progression tumorale, l'activité intense de l'OXPPOS génère inévitablement des ROS qui en excès endommagent l'ADN et les autres composants cellulaires (Gorrini et al., 2013). Il été montré que le métabolisme de la glutamine est impliqué de façon indirecte dans les mécanismes, mis en place par les cellules cancéreuses, pour se protéger de la mort due à une exposition excessive aux ROS. La carboxylation réductive de la glutamine permet de générer du NADPH dans la mitochondrie capable de participer aux mécanismes de détoxification des ROS (Jiang et al., 2016).

Les mécanismes mis en place par les cellules cancéreuses pour augmenter la glutaminolyse dans les cellules cancéreuses ne sont encore pas totalement élucidés mais l'implication de l'oncogène c-MYC (Altman et al., 2016; Yuneva et al., 2007) a été mise en évidence (cf. « Principaux régulateurs des voies métaboliques dans le cancer ») dans la surexpression de plusieurs enzymes clés de la glutaminolyse : ASCT2 et GLS (Gao et al., 2009; Wise et al., 2008; Yuneva et al., 2012). Le premier phénomène mis en place par les cellules cancéreuses pour augmenter la glutaminolyse est d'accroître leur absorption de glutamine exogène. Pour cela, les cellules cancéreuses, en particulier celles hautement dépendantes de la glutamine pour leur croissance et leur survie, surexpriment le transporteur de la glutamine ASCT2 (Márquez et al., 2017; Mohamed et al., 2014). Pour cataboliser ces grandes quantités de glutamine absorbées, les cellules cancéreuses surexpriment très fréquemment la GLS, capable de convertir la glutamine en glutamate. Cette caractéristique est associée avec un stade tumoral plus élevé et un mauvais pronostic (Katt and Cerione, 2014; Yu et al., 2015a). Les importantes quantités de glutamate ainsi formées permettront d'assurer toutes les fonctions décrites précédemment.

S'inspirant du succès de la détection des tumeurs par le glucose marqué, des études cliniques et précliniques récentes montrent le rôle prometteur de la détection tumorale par glutamine radiomarquée dans le but d'apporter des informations supplémentaires (Lieberman et al., 2011; Venneti et al., 2015).

La dépendance des cellules cancéreuses à la glutamine et ses effets pléiotropiques font de la suppression thérapeutique du métabolisme de la glutamine une stratégie anticancéreuse attractive (Altman et al., 2016; Daye and Wellen, 2012; DeBerardinis and Cheng, 2010; Vander Heiden, 2011). Des essais cliniques utilisant des analogues de la glutamine pour traiter le cancer ont été initiés il y a plusieurs décennies mais ont dû être abandonnés par manque d'efficacité et de toxicité sévère chez les patients (Ahluwalia et al., 1990; Livingston et al., 1970; O'Dwyer et al., 1984). Ce qui peut s'expliquer par le fait que les médicaments n'étaient pas assez spécifiques et qu'un nombre important d'enzymes utilisant la glutamine a été affecté. Plus récemment, des inhibiteurs du transporteur de la glutamine ont montré des résultats *in vitro* intéressants dans le traitement des cancers dépendants de la glutamine, malheureusement ne ciblant pas une voie particulière, ces molécules induisent une forte toxicité dans des cellules saines qui requièrent la glutamine pour d'autres voies (Hassanein et al., 2015). Les recherches se sont donc concentrées sur des inhibiteurs plus sélectifs du catabolisme de la glutamine. Les tentatives actuelles pour cibler la glutaminolyse en clinique se concentrent largement sur l'inhibition de la glutaminase, dont l'expression est surexprimée dans de nombreux types de cancers. De ce fait, plusieurs inhibiteurs de la GLS ont été développés, le composé 968, le BPTES et le CB-389, inhibant les isoformes pas communément exprimées dans les cellules normales (Chen and Cui, 2015; Xiang et al., 2015). En effet, l'inhibition des deux formes de la GLS, avec des inhibiteurs chimiques, permet de diminuer la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Gross et al., 2014; Jacque et al., 2015; Le et al., 2012; Xiang et al., 2015; Yuneva et al., 2012). Le CB-839 (Gross et al., 2014; Jacque et al., 2015), actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase un chez des patients atteints de cancer, présente le plus grand potentiel thérapeutique. Même si cet inhibiteur de la GLS est très efficace et présente une faible toxicité, les potentiels effets secondaires de l'inhibition du métabolisme de la glutamine doivent être envisagés (Bunpo et al., 2008; Masson et al., 2006).

2.4.3. Métabolisme de la glutamine et cancer de la prostate

Les cellules cancéreuses de prostate augmentent de façon significative leur consommation de glutamine. Premièrement, pour satisfaire leur dépendance vis-à-vis de la synthèse de lipides *de novo* (cf. chapitre « Métabolisme lipidique et cancer de la prostate »). En effet, même en condition d'hypoxie, le catabolisme de la glutamine permet la synthèse d'acétyl-CoA et donc de lipides, qui sont une source d'énergie clé pour les cellules cancéreuses de prostate, particulièrement pour les cellules cancéreuses en cours de transformation (Metallo et al., 2011). Deuxièmement, l'augmentation de la glutaminolyse est également un phénomène mis en place par les cellules cancéreuses prostatiques pour produire de l'ATP.

Dans le CaP, l'augmentation du métabolisme de la glutamine se traduit par la surexpression de la GLS (Moncada et al., 2012; Pan et al., 2015). Il a été montré que cette enzyme favorise la prolifération et la survie cellulaire (Pan et al., 2015). De plus, un taux élevé de GLS corrèle avec un grade plus élevé du CaP et des formes plus avancées de CaP (Pan et al., 2015).

De ce fait, inhiber la glutaminolyse pourrait en théorie déréguler la production d'énergie, produite à partir de la glutaminolyse, des cellules cancéreuses de prostate. En effet, des études *in vitro* ont montrées que l'inhibition de GLS, par siARN ou avec le BPTES, diminue les niveaux d'ATP intracellulaires et inhibe la prolifération et la progression des cellules tumorales prostatiques (Pan et al., 2015). Une autre étude a également montré que bloquer l'absorption de glutamine, dans les cellules cancéreuses de prostate, par l'inhibition de ASCT2 limite la prolifération et l'invasion du CaP (Wang et al., 2015). Ces résultats indiquent que la glutaminolyse peut être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du CaP.

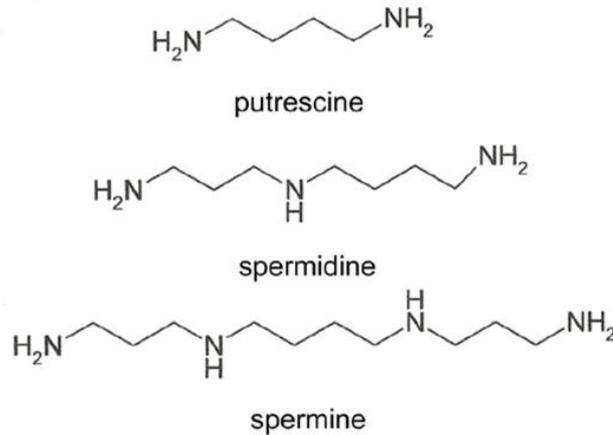
2.5. Métabolisme des polyamines

Les polyamines (ou polyamines aliphatiques) sont une famille de molécules dérivées de la décarboxylation d'un acide aminé, l'ornithine, et comprennent classiquement 3 molécules : la putrescine, la spermidine et la spermine. Ces molécules sont trouvées de façon ubiquitaire dans l'organisme et leur l'homéostasie est finement régulée par des étapes clés du métabolisme cellulaire. De plus, les polyamines jouent de nombreux rôles essentiels à la physiologie des cellules comme la croissance, la survie et le fonctionnement des cellules normales. Plusieurs anomalies dans le contrôle du métabolisme des polyamides sont impliquées dans des processus pathologiques sévères.

2.5.1. Structure des polyamines

Initialement mises en évidence dans le liquide séminal, les polyamines sont retrouvées à concentrations variables dans tous les types cellulaires, les niveaux les plus élevés étant mesurés dans les tissus à renouvellement rapide (Coffino, 2000; Jeevanandam and Petersen, 2001). Les polyamines sont des molécules dérivées de l'ornithine : la putrescine (Put ou 1,4-butane diamine ou tétraméthylène-diamine, la spermidine (Spd ou N-(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine ou aminopropyl-tétraméthylène-diamine) et la spermine (Spm ou N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine ou diaminopropyltétraméthylènediamine) (Figure 27). Les polyamines sont des composés organiques de faibles poids moléculaires, très solubles dans l'eau et composés de plus de deux groupements amines portant une charge positive (Seiler et al., 1996). Ce caractère de polycation leur permet des interactions ioniques fortes avec différents polyanions tels que l'ADN et les ARN, qui sont à la base de leurs effets biologiques (Gugliucci, 2004; Hoet and Nemery, 2000). Les dérivés de l'ornithine jouent un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire et dans la synthèse

des protéines et des acides nucléiques. Elles interviennent également dans la réparation de la matrice extracellulaire, l'adhésion cellulaire et certains processus de signalisation comme le cycle cellulaire, l'apoptose.



*Figure 27 : Structure schématique des polyamines
(Adapté de (Nowotarski et al., 2013))*

2.5.2. Synthèse des polyamines

La première étape de la biosynthèse des polyamines est la décarboxylation enzymatique de l'ornithine en putrescine par l'ornithine décarboxylase (ODC), l'enzyme limitante de la voie de synthèse des polyamines (Coffino, 2000; Coleman et al., 2004; Moinard et al., 2005). La spermidine dérive de la putrescine suite à la fixation irréversible d'un groupe propylamine par une aminopropyltransférase appelées spermidine synthétase. De la même façon, la spermine dérive de la spermidine après ajout d'un groupe propylamine par la spermine synthétase (Pegg and Michael, 2010). Dans les deux réactions, le donneur du groupements propylamines est la S-adénosyl-S-méthyl décarboxylée (dcSAM). dcSAM est synthétisée par la décarboxylation enzymatique de la S-adénosyl-méthionine (SAM) par grâce à la SAM-décarboxylase (AdoMetDC) (Jeevanandam and Petersen, 2001) (Figure 28). La SAM dérive de la condensation d'une molécule de méthionine avec une molécule d'ATP en présence d'ion Mg^{2+} . La synthèse de spermidine et de spermine est donc conditionnée par la disponibilité en méthionine, en ATP et en ions Mg^{2+} .

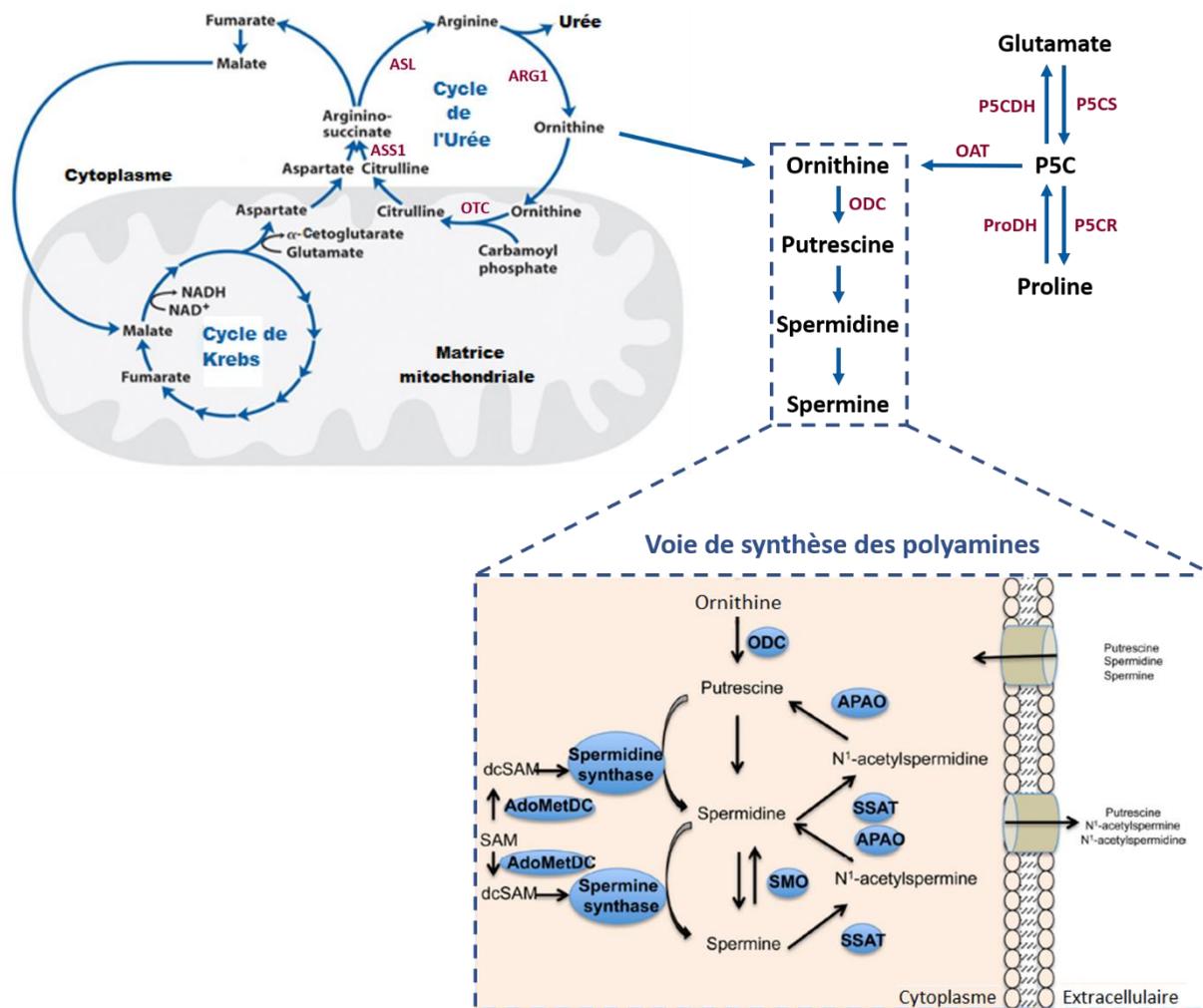


Figure 28 : La voie de synthèse des polyamines.

AdoMetDC : Adénosylmethionine décarboxylase ; *ARG1* : Arginase 1 ; *APAO* : Acétylpolyamine oxydase ; *ASL* : Argininosuccinate lyase ; *ASS1* : Argininosuccinate synthase ; *dcSAM* : S-adénosyl-S-méthyl décarboxylée ; *OAT* : Ornithine aminotransférase ; *ODC* : Ornithine décarboxylase ; *OTC* : Ornithine carbamoyltransférase ; *P5C* : Acide 1-pyrroline-5-carboxylique ; *ProDH* : Proline déshydrogénase ; *P5CDH* : Δ 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase ; *P5CR* : Δ 1-pyrroline-5-carboxylate réductase ; *P5CS* : Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthétase ; *SMO* : Spermine oxydase ; *SSAT* : Spermidine/spermine N1-acétyl-transférase cytosolique. (Adapté de (Nowotarski et al., 2013))

2.5.3. Interconversion des polyamines

Il existe des voies d'interconversions entre les 3 polyamines, la spm et spd peuvent être recyclées, respectivement, en spd et put par une réaction en deux temps (Figure 28). La spermine est d'abord acétylée, en présence d'acétyl-CoA, en N¹-acétylspermine par l'action de la spermidine/spermine N¹-acétyl-transférase cytosolique (SSAT) (Pegg, 2008), puis la acétylpolyamine-oxydase (APAO) permet la formation de spermidine (+ un N-acetyl-3-aminopropanaldehyde) (Henderson Pozzi et al., 2009; Takao et al., 2009; Wang et al., 2005; Wu et al., 2005). Sur le même principe, la spermidine est acétylée transitoirement en N1-acétylspermidine par la SSAT, consommant un acétyl-CoA. Dans un deuxième temps, l'APAO catalyse la synthèse de putrescine (+ un N-acetyl-3-aminopropanaldehyde) (Henderson Pozzi et al., 2009; Takao et al., 2009; Wang et al., 2005; Wu et al., 2005).

Une autre enzyme est impliquée dans la réaction inverse de conversion de la spermidine en spermine. En effet, la spermine oxydase (SMO) est capable d'oxyder de façon directe la spermine pour reformer une molécule de spermine (et une molécule de 3-aminopropanaldehyde) (Murray-Stewart et al., 2008; Seiler, 2004; Wang and Casero, 2006).

Lors des réactions catalysées par l'APAO et la SMO, il y a génération d'aldéhydes réactifs et de peroxydes d'hydrogène qui peuvent causer des dommages oxydatifs. Le but principal des réactions effectuées par les APAO/SSAT et la SMO est de convertir les polyamines spermidine et spermine en putrescine, qui est plus facilement excrétée de la cellule ou dégradée (Jänne et al., 2006). Les polyamines acétylés produits par les réactions impliquant la SSAT peuvent également être exportés (Jell et al., 2007). En conclusion l'activation de ces voies rétrogrades réduit la quantité intracellulaire de polyamines, qui en étant trop élevée devient délétère pour la cellule (Pirinen et al., 2007) et constitue donc un moyen pour la cellule de réduire l'activité physiologique des polyamines (Jeevanandam and Petersen, 2001). L'augmentation de l'excrétion des polyamines acétylées est donc un des mécanismes de contrôle de la concentration intracellulaire des polyamines (Jeevanandam and Petersen, 2001).

2.5.4. Catabolisme terminal des polyamines

Un des autres mécanismes mis en place par les cellules pour contrôler la concentration intracellulaire de polyamines est leur dégradation. Lors du catabolisme, les polyamines subissent une désamination oxydative sous l'action de la diamine-oxydase (DAO). La putrescine est catabolisée en un précurseur de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), principalement par l'action de la DAO. La N⁸-acétyl-transférase intervient également dans le catabolisme des polyamines et permet de dégrader la spermine, les dérivés N¹-acétylés et la putrescine.

La quantité intracellulaire de polyamines est donc le fruit de la régulation simultanée de leur synthèse, de leur catabolisme, de leur capture et de leur élimination.

2.5.5. Régulation du métabolisme des polyamines

La régulation du métabolisme des polyamines met en jeu trois enzymes clés : ODC, AdoMetDC et SSAT. En effet, la teneur en polyamines dans les cellules est contrôlée par des modifications de l'expression de ces enzymes clés plutôt que par l'altération de l'activité des polyamines. Ces enzymes ont une demi-vie courte (moins d'une heure) et leurs expressions et quantités intracellulaires sont finement régulées à plusieurs étapes de leurs synthèses et de leurs dégradations. De plus, la concentration intracellulaire en polyamines est aussi contrôlée par les systèmes de transports des polyamines qui sont l'absorption et l'efflux.

2.5.5.1. Les enzymes clés

2.5.5.1.1. L'ornithine décarboxylase (ODC)

ODC catalyse la première étape de la biosynthèse des polyamines, consistant à la décarboxylation de l'ornithine en putrescine (Figure 28). Cette enzyme se caractérise par un besoin en phosphate de pyridoxal (PLP) comme cofacteur pour fonctionner (Wallace et al., 2003). Elle a une demi-vie très courte, environ dix minutes (Jeevanandam and Petersen, 2001; Pegg, 2006) et une importante sensibilité à l'oxydation à cause de sa forte teneur en cystéine (Davidson et al., 1999). ODC est active quand elle est sous forme d'un homodimère (Lee et al., 2007; Pegg, 2006). Chaque monomère renferme deux domaines : un domaine N-terminal formé d'une structure en tonneau α/β qui inclus le site de fixation de l'enzyme avec son cofacteur PLP ; un domaine C-terminal composé d'une structure en feuillets β (Lee et al., 2007). L'homodimérisation d'ODC se fait par liaison entre le domaine N-terminal d'une sous unité enzymatique le domaine C-terminal d'une autre sous unité enzymatique (Lee et al., 2007). L'homodimère formé présente, à l'interface entre deux ODC, deux sites actifs (Lee et al., 2007; Pegg, 2006). Les formes dimériques sont donc les seules formes actives mais l'association entre deux unités est assez faible et les dimères sont rapidement dissociés et en équilibre avec les monomères inactifs (Pegg, 2006).

L'activité d'ODC est régulée principalement par des changements de quantité de l'enzyme plutôt que par des modifications au niveau de son activité catalytique (Figure 29). En effet, la régulation d'ODC apparait au niveau post traductionnel en particulier au cours de la synthèse de l'ARN messenger (ARNm) d'ODC, de la traduction et de la stabilité de cet ARNm et de façon importante au niveau de la dégradation de la protéine (Pegg, 2006; Shantz and Levin, 2007; Yuan et al., 2001). Cependant, après l'induction de l'expression d'ODC, l'augmentation de l'activité d'ODC est beaucoup plus forte que la quantité d'ARNm de l'enzyme, ce qui prouve l'importance des mécanismes de régulation post-traductionnelle (Persson et al., 1998; Wallström et al., 1998). L'ODC en ayant une demi-vie très courte et un taux de renouvellement très important, nécessite un niveau de dégradation élevé et très régulé. La dégradation d'ODC est contrôlée par une voie complexe impliquant deux enzymes : l'ornithine décarboxylase antizyme (AZ) et l'inhibiteur de l'antizyme (AZI) (Ivanov et al., 2008; Kahana, 2007; López-Contreras et al., 2006; Pegg, 2006; Takeuchi et al., 2008). Le catabolisme de l'ODC implique la fixation non covalente d'un monomère d'ODC avec l'AZ (Gandre et al., 2002; Hayashi et al., 1996; Mangold, 2005; Yuan et al., 2001), une protéine régulatrice dépourvue d'activité enzymatique. Cette fixation entraîne une modification conformationnelle de l'enzyme provoquant son inactivation, ce qui accélère sa dégradation par le protéasome 26S, sans ubiquitinylation préalable (Hayashi et al., 1996; Pegg, 2006). La seconde protéine appelée AZI est un analogue inactif du monomère ODC (Albeck et al., 2008) et présente une plus grande affinité pour l'AZ que l'ODC (Pegg, 2006, 2009a). L'AZI est donc

capable de se fixer plus facilement à l'AZ que ODC, remplaçant ODC dans le complexe AZ/ODC et par conséquent empêchant la dégradation d'ODC (Tang et al., 2009; Yuan et al., 2001).

L'excès intracellulaire de polyamines inhibe l'activité d'ODC par différents mécanismes. Les polyamines sont capables d'induire des modifications de la conformation d'ODC favorisant sa liaison à l'antizyme et donc sa dégradation (Yuan et al., 2001). Il a également été observé que des niveaux intracellulaires élevés de polyamine augmentent la dégradation d'ODC en induisant la synthèse de l'ARNm de l'AZ (Ivanov and Atkins, 2007; Ivanov et al., 2008; Kankare et al., 1997; Pegg, 2006; Petros et al., 2005). L'accumulation intracellulaire de polyamines inhibent également la dégradation d'ODC en bloquant l'ubiquitinylation de l'AZ et donc sa dégradation (Kahana, 2007; Pegg, 2006, 2009a). Les polyamines en excès conduisent à la dissociation du complexe OAZ/AZI ce qui favorise la liaison de l'AZ à ODC (Yuan et al., 2001).

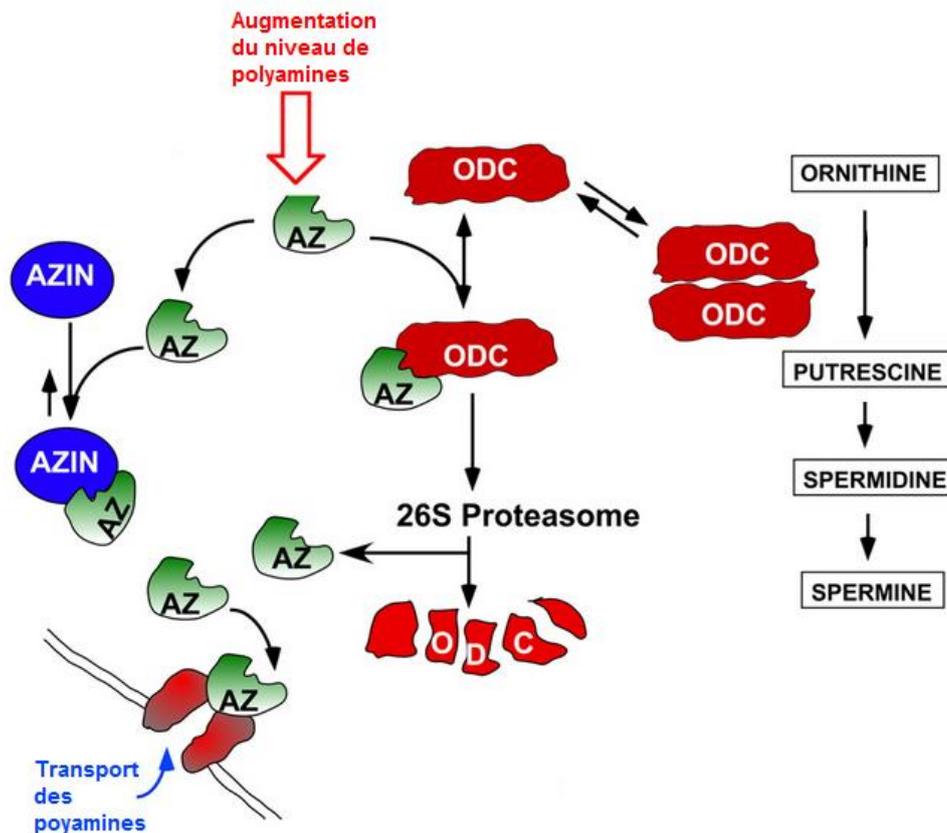


Figure 29 : Mécanismes de régulation d'ODC
(Adapté de (Pegg, 2006))

Tout comme sa dégradation, la transcription d'ODC est également finement régulée par plusieurs stimuli capables d'augmenter le niveau de l'ARNm d'ODC (Casero and Marton, 2007; Gerner and Meyskens, 2004; Jänne et al., 2004; Pegg, 1986, 1988, 2006; Pegg and McCann, 1982; Wallace et al., 2003; Wang and Casero, 2006). La région promotrice du gène codant pour ODC contient des sites de

fixation à des hormones, des facteurs de croissances et des facteurs de transcriptions incluant un élément de réponse à l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique), des motifs CAAT et LSF, des sites AP-1 et AP-2, des sites de fixation SP-1 riches en GC et une boîte TATA. De façon très intéressante, le promoteur génique d'ODC contient deux « E-boxes » qui sont, de base, occupées par le complexe Mnt/Myc inactif dans les cellules quiescentes. La transcription d'ODC est activée par l'augmentation de l'expression de c-MYC (sous forme de complexe Myc/Max) (Nilsson et al., 2004). c-MYC est donc capable d'induire l'expression d'ODC (Pegg, 2006, 2009a).

Enfin, la régulation traductionnelle d'ODC est également un facteur important contribuant à la modulation des niveaux d'ODC. Il a été montré que la traduction de l'ARNm d'ODC est induite par des haut niveau d'expression du facteur de traduction eIF4A (Pyronnet et al., 2005).

2.5.5.1.2. La S-adénosyl-méthionine décarboxylase (AdoMetDC)

La AdoMetDC procède à la décarboxylation de son substrat SAM en dcSAM (Figure 28) (Pegg, 2009b). Cette réaction est l'étape limitante de la conversion de la putrescine en spermidine et spermine car elle fournit le donneur aminopropyl aux spermidine et spermine synthase. AdoMetDC fait partie d'une classe limitée de décarboxylase qui utilisent un pyruvate lié de façon covalent comme groupement prosthétique (Bale and Ealick, 2010; Pegg, 2009b; Pegg et al., 1998). AdoMetDC dérive d'une proenzyme unique inactive de 334 acides aminés. Cette proenzyme est capable de s'autoactiver suite à une étape de clivage de la liaison peptidique entre les résidus Glu 67 et Ser 68 (Bale and Ealick, 2010; Pegg, 2009b; Pegg et al., 1998). Ce processus conduit au clivage de la proenzyme en deux sous-unités : la sous-unité α qui est la partie C-terminale contenant le site actif et la sous-unité β constituant la partie N-terminale (Bale and Ealick, 2010; Pegg, 2009b; Pegg et al., 1998). Des études structurales et biochimiques ont montré qu'il y a un site de liaison à la putrescine par unité $\alpha\beta$ de l'enzyme et que ce site est situé loin du site actif (Bale and Ealick, 2010; Bale et al., 2008; Pegg, 2009b). L'enzyme AdoMetDC, sous forme de dimère $(\alpha\beta)_2$, se lie à une molécule de pyruvate ce qui provoque des altérations structurales et électrostatiques au niveau du site actif conduisant à l'activation de l'enzyme (Bale and Ealick, 2010; Bale et al., 2008; Pegg, 2009b). La conséquence physiologique de l'activation de l'enzyme par la putrescine est de fournir les substrats pour la spermidine et la spermine synthase et ainsi permettre la conversion efficace de la putrescine en spermidine puis en spermine.

Comme l'ODC, l'activité de la AdoMetDC est finement régulée à de nombreux niveaux pour maintenir des niveaux intracellulaires optimales de polyamines (Bale and Ealick, 2010; Pegg, 2009b; Pegg et al., 1998). En plus de se fixer à l'enzyme pour activer son site catalytique, la putrescine est capable d'activer de façon indirecte l'enzyme en induisant la maturation de la proenzyme en enzyme fonctionnelle. A contrario, la quantité de AdoMetDC est négativement régulée par l'augmentation de

la concentration intracellulaire en spd/spm à toutes les étapes de sa synthèse (Zhao et al., 2008). En effet, les polyamines spd et spm sont capables de diminuer la synthèse de l'enzyme en inhibant directement la transcription du gène de l'enzyme et la traduction de l'ARNm de AdoMetDC (Hanfrey et al., 2005; Raney et al., 2002). Ces deux polyamines sont également capables d'induire la dégradation de la AdoMetDC par le protéasome 26S suite à sa polyubiquitination (Kahana, 2007; Yerlikaya and Stanley, 2004). Il a également été montré que plusieurs processus physiologiques, comme la stimulation hormonale, la différenciation et la régénération tissulaire, augmentent l'activité de la AdoMetDC via l'augmentation de l'expression de la protéine (Dayoub et al., 2006; Lam et al., 2005; MacLean et al., 2008). Cependant les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus même si le gène de l'enzyme contient plusieurs sites de fixations pour des facteurs de transcriptions importants.

2.5.5.1.3. La spermidine/spermine N1-acétyl-transférase (SSAT)

L'acétylation des polyamines par la SSAT est le facteur limitant de la dégradation et de l'interconversion des polyamines (cf. « Interconversion des polyamines » et « Catabolisme terminal des polyamines »). La SSAT est donc l'enzyme clé de ces deux processus, elle est, par conséquent, extrêmement impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire des polyamines. La SSAT est sous forme d'un homodimère contenant deux sites actifs qui sont chacun formés à partir des résidus des deux sous-unités au niveau de l'interface du dimère (Pegg, 2008).

Comme pour les deux autres enzymes, la régulation de la SSAT intervient à toutes les étapes de sa synthèse que sont la transcription génique *Sat1*, l'épissage alternatif et la traduction de l'ARNm de SSAT et la stabilisation de la protéine. En effet, la SSAT est une enzyme extrêmement inductible dont la quantité est ajustée en réponse à des altérations au niveau de la teneur en polyamines et via une variété d'autres signaux incluant, entre autres, des hormones, des cytokines et des voies de stress (Pegg, 2008; Tjabringa et al., 2008; Wang and Casero, 2006). Une forte teneur intracellulaire en polyamines augmente la transcription du gène *Sat1* codant pour SSAT via la fixation des polyamines sur leurs éléments de réponse situés sur le promoteur du gène. Le contenu intracellulaire en polyamines contrôle également l'épissage alternatif du transcrit de SSAT. En effet, des faibles concentrations en polyamines entraînent l'épissage d'un ARNm de SSAT non fonctionnel qui va être rapidement dégradé, alors que la présence de polyamines inhibe la formation de cet ARNm et permet l'épissage alternatif correct et donc la formation d'un ARNm de SSAT stable et fonctionnel. De plus, l'excès de polyamines déclenche également la traduction de l'ARNm de SSAT en empêchant la fixation d'une protéine cytoplasmique, non identifiée, entraînant l'inhibition de l'ARNm. Quand il y a peu de polyamines dans les cellules, l'homodimère SSAT actif est rapidement ubiquitinylé et dégradé par le protéasome 26S. A contrario, la liaison des polyamines sur la SSAT empêche l'ubiquitinylation et donc

la dégradation de cette dernière par le protéasome 26S. Cette interaction est donc indispensable dans le recyclage de SSAT mais aide également à la stabilisation de la protéine SSAT en augmentant sa demi vie, donc son activité, initialement de 15 minutes à plus de 12 heures (Pegg, 2008).

2.5.5.2. Le transport des polyamines

La concentration intracellulaire en polyamines n'est pas régulée seulement au niveau de leurs synthèses mais également au niveau de leurs systèmes de transports, que sont l'absorption et l'efflux des polyamines (Figure 30) (Igarashi and Kashiwagi, 2010a; Poulin et al., 2012). En dépit d'intenses recherches, les systèmes de transports des polyamines dans les cellules eucaryotes sont peu connus. Les systèmes identifiés sont rapidement saturés, très consommateurs d'énergie et ne présentent pas une haute affinité pour les polyamines pouvant transporter de nombreux autres composés (Kaur et al., 2008; Rossi et al., 2008). L'entrée des polyamines dépend fortement du potentiel de la membrane plasmique et de la présence de cations bivalents comme le Mg^{2+} et le Ca^{2+} . Le transport des polyamines est également influencé par le pH et l'osmolarité.

Ces systèmes de transports peuvent être catégorisés en fonction des polyamines qu'ils transportent préférentiellement (Figure 30). De ce fait, on retrouve des transporteurs qui transportent principalement la putrescine et d'autres qui transportent préférentiellement la spermidine et la spermine. Parmi ces systèmes de transports identifiés grâce à des polyamines fluorescents, un mécanisme implique des voies d'endocytoses (Igarashi and Kashiwagi, 2010a; Soulet et al., 2004). Les protéoglycanes à héparane sulfate présents à la surface des cellules ont également été impliqués dans le transport des polyamines car l'absorption de ces derniers est bloquée par un anticorps dirigé contre ces structures (Welch et al., 2008). L'endocytose dépendante des cavéoles a également été décrite comme jouant un rôle important dans l'absorption cellulaire des polyamines en condition pathologique (Roy et al., 2008). L'entrée de putrescine peut aussi mettre en jeu un mécanisme dépendant de la nitrique oxyde synthase 2 (Uemura et al., 2010). Le transporteur SLC3A2, déjà connu comme un transporteur des acides aminés, a été identifié comme un composant du système d'export des polyamines (Uemura et al., 2008). Ce transporteur est capable de former un complexe avec SSAT et d'exporter la putrescine ou les polyamines acétylés par une réaction d'échange avec une molécule d'arginine. En condition de faible concentration intracellulaire de polyamines, SLC3A2 est aussi capable d'importer de la putrescine dans les cellules (Uemura et al., 2008, 2010). Finalement, d'autres perméases comme CCC9 (un variant d'épissage de SLC12A8) et SLC22A16 présentent une activité de transport pour la spermidine et la spermine (Poulin et al., 2012).

L'absorption des polyamines est bloquée par l'enzyme AZ (cf. « L'ornithine décarboxylase ») et stimulée par des facteurs de croissances, ce qui semble indiquer que la régulation du transport des

polyamines pourrait être corrélée avec la régulation d'ODC (Igarashi and Kashiwagi, 2010a; Poulin et al., 2012).

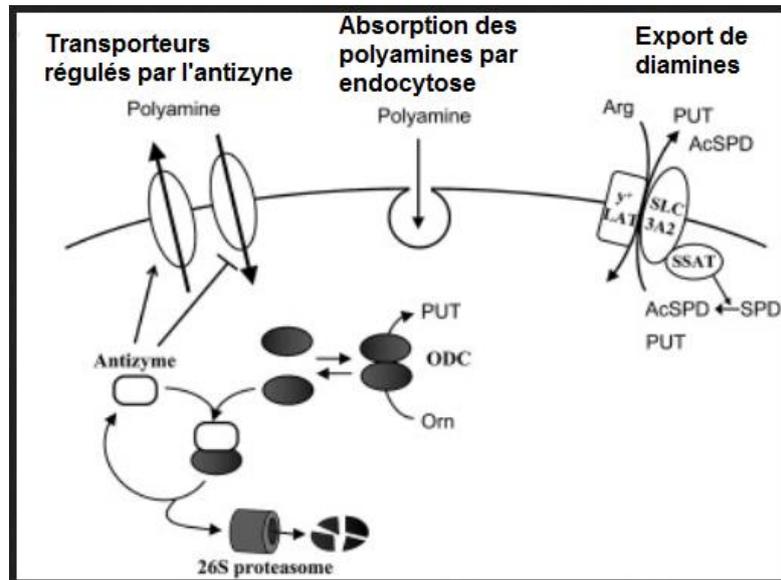


Figure 30 : Les mécanismes de transports des polyamines
(Adapté de (Igarashi and Kashiwagi, 2010a))

2.5.6. Fonctions biologiques des polyamines

L'importance des polyamines pour le développement et le fonctionnement des cellules de mammifères a été mise en avant par l'intermédiaire d'études avec des souris délétées pour les gènes d'ODC ou de AdoMetDC, qui sont létales à des stades très précoces de développements embryonnaires.

Les polyamines sont des petites molécules polycationiques souvent liées à des molécules polyanioniques comme l'ADN, l'ARN et les phospholipides (Childs et al., 2003; Pegg, 1988; Sarkar et al., 2009). Ces interactions sont indispensables pour leur permettre d'assurer leurs fonctions biologiques mais font que le pool de polyamines libres est faible comparé à la quantité totale de polyamines. De ce fait, des changements rapides de la quantité de ce pool de polyamines libres, tout comme une modulation de leurs synthèses, leurs absorptions et leurs excréctions, peuvent avoir des effets marqués et critiques sur la physiologie cellulaire même si la quantité totale de polyamines ne change que très peu.

Les polyamines, par l'intermédiaire de ces interactions, sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques cellulaires (Figure 31). Cependant, de nombreux articles ont décrit le rôle de ces interactions et de leurs altérations par des études majoritairement *in vitro*. Il est donc difficile de savoir l'importance physiologique de ces résultats mais il est clair que les polyamines affectent la structure de

l'ADN et de l'ARN, la fonction des ribosomes et l'activité de nombreuses enzymes (Childs et al., 2003; Pegg, 1988; Sarkar et al., 2009).

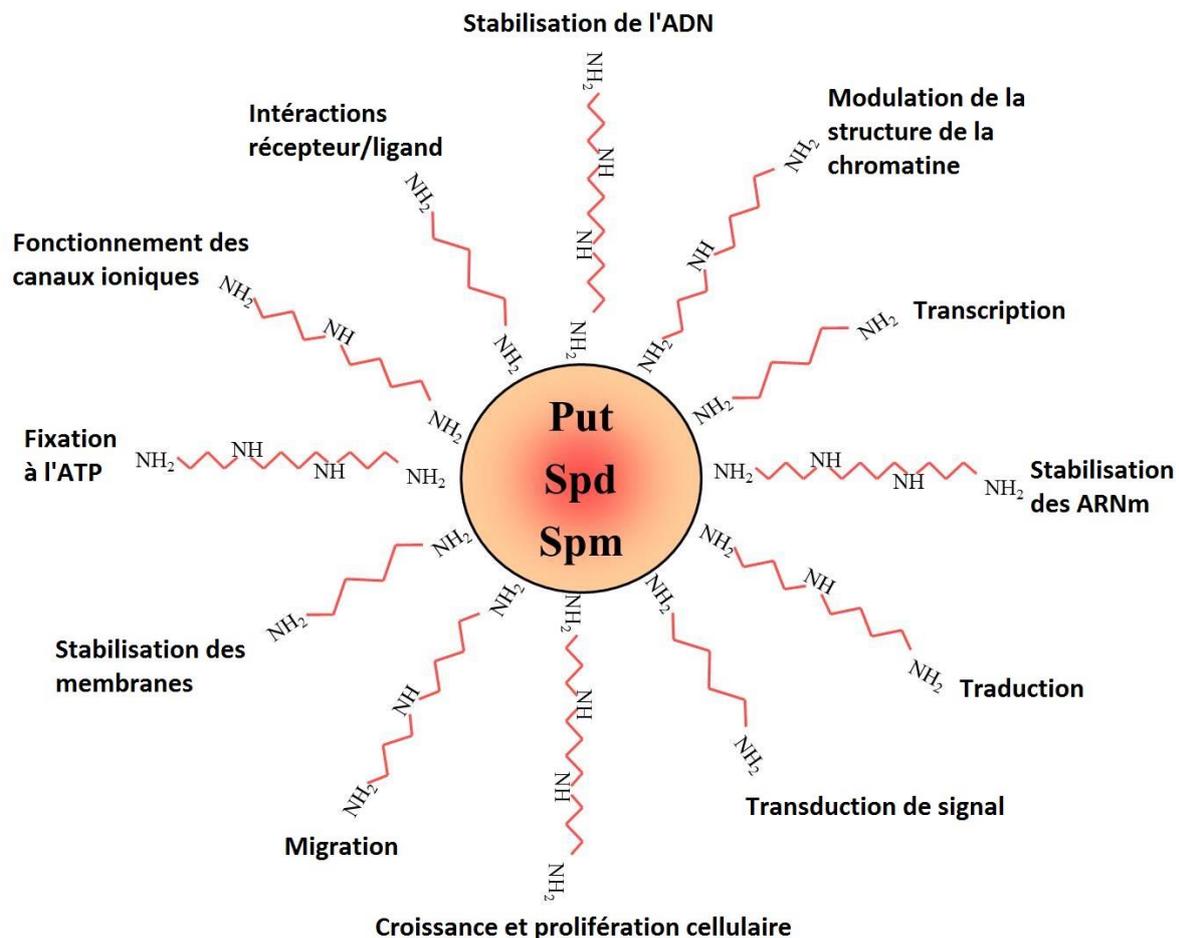


Figure 31 : Fonctions biologiques des polyamines

2.5.6.1 Stabilisation et modulation de la conformation de l'ADN par les polyamines

Les polyamines sont capables d'interagir de façon directe avec l'ADN des cellules de plusieurs manières : soit par des interactions ioniques entre leurs fonctions amines et les groupements phosphates de l'ADN, soit par des interactions hydrophobes, soit par des liaisons cationiques du groupe amine des polyamines avec les bases azotées (Childs et al., 2003; Ouameur and Tajmir-Riahi, 2004). Ces interactions sont indispensables pour la stabilisation du double et du triple brin d'ADN et pour la bonne conformation de l'ADN en stabilisant les bases azotées et en facilitant de ce fait la condensation de l'ADN, rendant accessibles certaines zones de l'ADN aux facteurs de transcriptions par exemple. Les polyamines protègent également l'ADN des radiations ionisantes comme les UV, des ROS et des enzymes DNAses. De plus, ils sont impliqués dans le remodelage de la chromatine en modulant l'acétylation des histones (Wei et al., 2007). De ce fait, les polyamines sont impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes.

2.5.6.2 Régulation de l'expression de gènes par les polyamines

Les polyamines stimulent la transcription et la traduction de nombreux gènes, particulièrement ceux impliqués dans leur propre métabolisme, mais également dans la prolifération et la survie cellulaire. Cela est la conséquence directe de la capacité de ces polycations à se lier aux acides nucléiques et à modifier leur conformation, rendant ainsi accessibles certains sites de régulation à leurs effecteurs. Des éléments de réponses aux polyamines (PRE) ont été identifiés sur certains gènes (Casero and Marton, 2007; Childs et al., 2003) et la transcription de beaucoup de gènes est influencé par les concentrations de polyamines intracellulaires (Childs et al., 2003; Gerner and Meyskens, 2004; Jänne et al., 2004; Pegg, 1986, 1988; Wallace et al., 2003).

2.5.6.2.1. Régulation de la transcription des gènes par les polyamines

De nombreuses études montrent les effets des polyamines sur des voies de signalisations cellulaires impliquant des enzymes tels que des phosphatases et des kinases, via la modulation de l'expression de ces enzymes (Xiao et al., 2007a; Zou et al., 2008). La grande majorité de ces papiers utilisent des inhibiteurs de la synthèse des polyamines, comme l' α -difluorométhylornithine (DFMO) qui inactive ODC, dans le but d'altérer la quantité de polyamines pour pouvoir les comparer à des cellules contrôles et identifier les voies de signalisations altérées. De cette façon, des effets sur les niveaux d'expression et de phosphorylation de plusieurs protéines ont été observés, c'est le cas entre autres pour PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/AKT (Kucharzewska et al., 2009), AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Zou et al., 2008), ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases), GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) (Vaidya et al., 2006), p53 (Bhattacharya et al., 2009), p21 (Rounbehler et al., 2009), p27 (Koomoa et al., 2008), EGFR (Epidermal growth factor receptor) (Nilsson et al., 2005; Rajeeve et al., 2013; Ray et al., 2007). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les propriétés de ces polyamines. En effet, les polyamines sont capables soit de stimuler directement les activités phosphorylatrices de ces enzymes, soient de réguler leurs expressions et leurs activations en stimulant leurs transcriptions.

Les polyamines sont également capables, par l'intermédiaire de leur PRE, d'induire l'expression de facteurs de transcriptions comme c-MYC, c-Jun, c-Fos et AP-1 (Activator protein 1) qui conduisent à l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire (Bachrach et al., 2001; Liu et al., 2006; Tabib and Bachrach, 1994; Xiao et al., 2007b). Grâce à leur PRE, les polyamines influencent aussi la transcription des gènes impliqués dans leur métabolisme de synthèse comme l'ODC, la AdoMetDC et la SSAT (cf. « Les enzymes clés »).

Une des nombreuses fonctions des polyamines est donc de moduler la transcription de protéines jouant des rôles cruciaux dans la transduction du signal de voies de signalisations nombreuses et variées.

2.5.6.2.2 Régulation de la traduction des ARN par les polyamines

Les polyamines intracellulaires se retrouvent principalement fixés sur un brin d'ARN et sont très peu sous forme libre (Igarashi and Kashiwagi, 2010b). Ces polyamines fixés sont capables de modifier la structure des ARN et peuvent donc moduler la synthèse protéique à plusieurs niveaux. En effet, la spermidine participe à la régulation de la formation du complexe d'initiation de la transcription (Shimogori et al., 1996a, 1996b). Les polyamines se lient aussi aux ARN de transfert (ARNt) via des interactions avec leurs bases azotées ce qui a pour conséquences de stabiliser la structure des ARNt (Igarashi and Kashiwagi, 2000; Ouameur et al., 2010). Les polyamines sont capables de réguler la traduction des ARNm de protéines impliqués dans leurs synthèses tels que la AdoMetDC et l'AZ via le décalage du cadre de lecteur de ces ARNm (Ivanov and Atkins, 2007; Ivanov et al., 2008, 2010; Petros et al., 2005). Un autre mécanisme, permettant aux polyamines de réguler indirectement la synthèse protéique, implique protéine HuR (Hu antigène R). Cette dernière augmente la stabilité des ARNm en se liant aux éléments riches en AU situés au niveau des régions 3' des ARNm non traduits. Les polyamines sont capables de moduler la localisation subcellulaire de HuR, ce qui inhibe sa liaison avec les ARNm et entraîne leurs dégradations. Les polyamines régulent donc négativement, par ce mécanisme, l'expression de différents gènes, majoritairement impliqués dans le contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire. Ce mécanisme d'inhibition implique la stimulation de l'import dans le noyau de HuR par les polyamines via l'AMPK et l'importine $\alpha 1$ (Zou et al., 2008). A contrario, les polyamines stimulent, en plus de la transcription, la traduction de c-MYC en augmentant la liaison de HuR à l'ARNm de c-MYC (Liu et al., 2009a). Le dernier mécanisme connu implique la spermidine qui joue un rôle essentiel en tant que substrat pour la modification du facteur d'initiation de la traduction eIF5A (eukaryotic initiation factor 5A) (Park, 2006). Ce dernier est une protéine cruciale pour la phase d'élongation de la traduction. En effet, eIF5A subit une modification post traductionnelle d'une lysine interne pour former une hypusine, essentielle à son fonctionnement. eIF5A est en premier modifié par la déoxyhypusine synthase qui attache le groupement aminobutyl de la spermidine à un résidu lysine spécifique puis est ensuite hydroxylé en hypusine par la déoxyhypusine hydroxylase (Park et al., 2010). Cette forme mature de eIF5A est indispensable à la synthèse protéique et à la croissance chez les mammifères (Chatterjee et al., 2006; Chattopadhyay et al., 2008; Childs et al., 2003), même si ces fonctions exactes ne sont encore pas pleinement élucidées.

2.5.6.3 Polyamines et microtubules

Les polyamines, plus spécifiquement la spermidine et la spermine, sont impliqués dans les mécanismes d'assemblages des microtubules. En effet, leur propriété de cation leur permet de se fixer sur l'extrémité C-terminale chargée négativement de la tubuline, et d'attirer ainsi d'autres hétérodimères de tubuline (Mechulam et al., 2009). De façon logique, la déplétion intracellulaire en polyamines induit une forte perturbation du réseau de microtubules qui disparaît suite à un apport de spermine exogène. Pour finir, les polyamines peuvent en plus moduler les interactions des microtubules avec d'autres protéines permettant la stabilisation de ce réseau (Savarin et al., 2010). Les microtubules sont des constituants indispensables du cytosquelette cellulaire et de son maintien et jouent un rôle clé dans la division cellulaire, la mobilité cellulaire et les transports cytoplasmiques de molécules. Les rôles des polyamines dans l'assemblage de ce réseau microtubulaire sont donc par conséquent vitaux à la cellule.

2.5.6.4 Polyamines et membranes cellulaires

En grande partie grâce à leur propriété cationique, les polyamines sont capables d'interagir avec de nombreux constituants anioniques des membranes cellulaires, comme les phospholipides, les cadhérines et les canaux ioniques.

2.5.6.4.1. Polyamines et phospholipides membranaires

La fraction de polyamines intracellulaires liée à des phospholipides membranaires anioniques représente 3 à 6 % du pool total de polyamines intracellulaires. Les polyamines se lient à des phosphatidylsérines et des phosphatidylinositols ce qui stabilise la membrane plasmique cellulaire. Ils jouent également un rôle dans la réorganisation du cytosquelette, en particulier celui d'actine, en médiant la synthèse du PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate). Ils participent également aux phénomènes de fusions membranaires durant la division cellulaire et l'exocytose (Coburn, 2009; Igarashi and Kashiwagi, 2010b; Schuber, 1989).

2.5.6.4.2. Polyamines et jonctions cellulaires

On retrouve également les polyamines au niveau des jonctions adhérentes entre deux cellules, en particulier dans les cellules épithéliales où l'expression des E-cadhérines (Liu et al., 2009b) et des TLR (Toll-like récepteur) (Chen et al., 2007b), une protéine indispensable des jonctions adhérentes, est dépendante des polyamines (Wang, 2005). Dans la formation des jonctions serrées, les polyamines participent à la synthèse et à la stabilisation de l'occludine, une protéine structurale de ce type de jonction, assurant l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires (Guo et al., 2005). Enfin, ils sont impliqués dans l'expression des connexines nécessaires à la formation des jonctions communicantes

(Lin and Veenstra, 2007; Savarin et al., 2010), mettant en relation le cytoplasme de deux cellules voisines.

Cependant en situation pathologique, comme lors de la cicatrisation, les polyamines interviennent dans le désassemblage des jonctions adhérentes en stimulant la phosphorylation de la β -caténine, qui perturbe le complexe cadhérine/caténine, tout cela dans le but de promouvoir la migration cellulaire et donc la cicatrisation de l'épithélium (Guo et al., 2002).

2.5.6.4.3. Polyamines et canaux ioniques

Les polyamines jouent un rôle important dans la régulation de canaux ioniques, tel que le récepteur ionotrope du glutamate (Dingledine et al., 1999), les canaux Kir (K⁺ inward rectifier) (Stanfield and Sutcliffe, 2003), des canaux affectant la signalisation calcique intracellulaire ou des canaux sodiques (Fleidervish et al., 2008).

2.5.6.4.3.1. Polyamines et récepteurs du glutamate

Les récepteurs ionotropes du glutamate ont des fonctions majeures dans le système nerveux où l'acide glutamique est le neurotransmetteur excitateur le plus répandu et un précurseur du GABA dans les neurones GABAergiques. Le glutamate active plusieurs récepteurs ionotropes : le récepteur NMDA (N-methyl-D-aspartate) qui est à réponse voltage dépendante lente, le récepteur AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) produisant une réponse rapide aux synapses excitatrices et le récepteur kainate (KAR) (Chao et al., 1997; Dingledine et al., 1999; Pegg, 2009a). Les polyamines sont capables d'interagir et de moduler l'activité de ces trois récepteurs.

2.5.6.4.3.2. Polyamines et canaux Kir

Les canaux Kir sont des canaux potassiques ubiquitaires formant une famille de 7 membres (Kir1 à 7). Ces canaux permettent la formation d'un courant potassique entrant, indispensable au maintien du potentiel de membrane. Le mécanisme commun d'action des polyamines intracellulaires sur tous les canaux Kir se fait par l'intermédiaire du blocage des courants sortants (Kurata et al., 2007, 2008; Yan et al., 2005). Ce blocage, dépendant de la tension, par les polyamines entraîne une conduction efficace du courant uniquement vers l'intérieur, permettant de maintenir le potentiel membranaire de repos (Guo and Lu, 2003; Stanfield and Sutcliffe, 2003).

2.5.6.5. Polyamines et prolifération cellulaire

Le rôle crucial des polyamines dans la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire est bien établi (Igarashi and Kashiwagi, 2010b; Oredsson, 2003; Thomas and Thomas, 2001; Wallace et al., 2003). De plus, la quantité intracellulaire en polyamines est très élevée dans les tissus à croissance

rapide. En effet, les polyamines activent les cyclines CDK2 et 4 (cyclin-dependent kinase), impliquées dans la transition G1/S. La baisse de la quantité intracellulaire de polyamines entraîne une augmentation de p21 et p27 qui inhibent CDK2 et CDK4, ce qui conduit à la baisse de l'expression de la cycline D1 (Choi et al., 2000; Ray et al., 1999). Ce processus est associé à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Choi et al., 2000; Oredsson, 2003). De façon logique, une augmentation de la quantité de putrescine est liée à une augmentation de la quantité de cycline D1. Quant à la spermidine et la spermine, leurs baisses impactent négativement les niveaux protéiques de la cycline E (Ravanko et al., 2000). De plus la déplétion des polyamines est capable d'inhiber la synthèse de l'ADN via la diminution de l'expression de la cycline A et de l'activité d'enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (cf. « Stabilisation et modulation de la conformation de l'ADN par les polyamines » et « Régulation de l'expression de gènes ») (Igarashi and Kashiwagi, 2010b; Oredsson, 2003; Thomas and Thomas, 2001; Wallace et al., 2003). Ces implications ont, en partie, été mises en évidence par l'utilisation du DFMO, l'inhibiteur d'ODC, qui induit une déplétion en polyamines dans les cellules, résultant en l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 des cellules traitées. De façon similaire, l'inhibition de la AdoMetDC, permettant la biosynthèse des polyamines, augmentent la durée de la phase S (Wallace et al., 2003). De façon très intéressante, il a été montré que la biosynthèse des polyamines, et par analogie leurs quantités, dépendent de la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve. Le contenu cellulaire en polyamine double lors de la transition G1/S et de la transition G2/S dû à l'augmentation de l'activité des enzymes de la biosynthèse. Lors de la transition G2/M et de la phase M, la quantité intracellulaire de polyamines diminue à cause de l'augmentation de l'activité de la SSAT (Alm and Oredsson, 2009; Oredsson, 2003; Wallace et al., 2003).

Les polyamines sont également impliqués dans la prolifération cellulaire via leur interaction avec p53, qui, quand il est activé suite à des signaux de stress, entraîne un arrêt du cycle cellulaire. En effet, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la déplétion en polyamines par le DFMO entraîne une augmentation de l'expression et une stabilisation importante de la protéine p53, conduisant à une inhibition de la croissance cellulaire (Bhattacharya et al., 2009; Li et al., 2001). Cette augmentation de l'activité de p53, en réponse à la déplétion des polyamines, module les points de contrôles du cycle cellulaire via l'augmentation de l'expression de p21 et p27 deux cibles de p53 et l'inhibition de gènes cibles responsables de l'apoptose (Bhattacharya et al., 2009).

2.5.6.6. Polyamines et apoptose

Selon le type cellulaire ou les signaux reçus par la cellule, les polyamines peuvent soit induire soit au contraire inhiber l'apoptose en fonction de leur quantité et par différents mécanismes. En effet, une accumulation excessive des polyamines entraîne majoritairement un déclenchement de l'apoptose via

un stress oxydatif (Hoet and Nemery, 2000) ou l'induction des caspases (Flamigni et al., 2007), alors que la déplétion en polyamine ralentit l'apoptose (Ray et al., 2000) par, entre autres, l'inhibition de la protéine pro-apoptotique BAX (Deng et al., 2005). Dans ces conditions, l'apport exogène de putrescine ou l'induction d'une accumulation intracellulaire de putrescine par inhibition de la AdoMetDC restaure l'apoptose (Ray et al., 2000).

Au contraire, des niveaux élevés de polyamines, en particulier la putrescine, inhibent l'apoptose dans des lignées cellulaires neurales et dans une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses. Dans ces lignées cellulaires, il a été montré qu'une déplétion en polyamines déclenche l'apoptose par dissipation du potentiel membranaire mitochondriale et par l'activation de la caspase 3 (Igarashi and Kashiwagi, 2010b; Schipper et al., 2000).

2.5.7. Effets biologiques des polyamines

De par leur rôle dans le cycle cellulaire, l'expression de gène, la migration, la stabilité membranaire et le fonctionnement de canaux calciques, les polyamines sont indispensables à la prolifération cellulaire et au maintien de l'intégrité et de la physiologie de tissus ayant un taux élevé de division, comme le système digestif, immunitaire et reproducteur.

2.5.7.1. Polyamines et appareil digestif

Les polyamines exogènes dérivent majoritairement de l'alimentation, avec une consommation journalière chez l'homme de 350 à 500 μmol de polyamines, correspondant pour moitié à de la putrescine (Bardócz et al., 1995; Zoumas-Morse et al., 2007). L'autre source exogène vient des bactéries du microbiote intestinal qui peuvent soit produire ou dégrader les polyamines (Blachier et al., 2007; Larqué et al., 2007; Matsumoto et al., 2011). Les grandes quantités de polyamines qui se retrouvent dans le duodénum et le jéjunum sont très rapidement absorbés. En effet, il a été observé que deux heures seulement après un repas, le niveau de polyamines de la lumière digestive est revenu à l'état initial. Cette absorption se fait par le biais de diffusions passives et de transporteurs (cf. « Le transport des polyamines ») (Milovic, 2001; Seiler and Raul, 2007). Une fois absorbée, la putrescine est soit convertie en spermidine et spermine, soit elle est oxydée en acide γ -aminobutyrique, par la diamine oxydase puis en CO_2 . Après absorption intestinale, la spermidine et la spermine restent inchangées et sont principalement dégradées dans le foie et les reins. L'absorption des polyamines par l'intestin est stimulée par différents facteurs de croissances, comme l'insuline, l'IGF1 (insulin-like growth factor 1) et l'EGF (epidermal growth factor) (Milovic, 2001; Milovic et al., 2001; Seiler and Raul, 2007).

La muqueuse intestinale a le taux de renouvellement tissulaire le plus élevé de tous les tissus du corps, son intégrité et son fonctionnement résultent d'un équilibre complexe entre prolifération, différenciation, migration et apoptose. Il a été montré que les polyamines sont essentiels au bon fonctionnement de l'intestin et à la régulation du renouvellement de la muqueuse. En effet, les polyamines sont capables d'induire la prolifération des cellules épithéliales intestinales par l'intermédiaire, d'une part, de l'augmentation de l'expression gènes pro-prolifératifs comme c-MYC, c-Jun ou c-Fos et d'autre part, par l'inhibition de gènes antiprolifératifs comme p53. Logiquement, le blocage de l'absorption des polyamines inhibe la croissance et le renouvellement de la muqueuse intestinale (Wang, 2007).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence l'importance des polyamines dans les processus de maturation de la muqueuse intestinale (Biol-N'Garagba et al., 2002; Greco et al., 2000; Gréco et al., 2001; Seiler and Raul, 2007). Les polyamines sont également essentiels pour l'intégrité et la perméabilité de la barrière épithélio-intestinale. En effet, comme décrit au chapitre « Polyamines et jonctions cellulaires », les polyamines sont capables d'augmenter l'expression de protéines impliquées dans les jonctions adhérentes et les jonctions serrées, respectivement, la E-cadhérine et l'occludine. En effet, la déplétion des polyamines au niveau de l'intestin entraîne un dysfonctionnement de la barrière épithéliale avec une augmentation importante de la perméabilité entre les cellules (Guo et al., 2003, 2005; Wang, 2005). Les polyamines participent également à la mise en place de l'immunité intestinale en induisant la maturation des lymphocytes (Pérez-Cano et al., 2010; ter Steege et al., 1997) et leur activité lysosomal (Powroznik et al., 2004).

Lors d'une lésion, la muqueuse intestinale possède la capacité de se réparer par deux phénomènes, soit par reformation via la migration de cellules provenant de zones voisines ou sous-jacentes soit par remplacement des cellules perdues par division cellulaire (Johnson and McCormack, 1999). Les polyamines facilitent ces deux phénomènes et sont donc absolument requis pour la cicatrisation de la muqueuse gastrointestinale, en particulier dans la reformation précoce de la muqueuse à travers leurs rôles essentiels dans la migration cellulaire et dans le remplacement de la muqueuse via leurs rôles dans la division cellulaire (Banan et al., 1996, 1998; Johnson and McCormack, 1999; Konturek et al., 1998).

2.5.7.2. Polyamines et système immunitaire

En plus de leurs implications dans le système immunitaire intestinal, les polyamines contribuent également au développement de l'immunité splénique à travers la maturation et la différenciation des lymphocytes spléniques et intestinaux et participent à la régulation de la réaction inflammatoire (Jolois et al., 2002; Pérez-Cano et al., 2010). Ainsi, la putrescine est un modulateur important de l'activité des

lymphocytes T (Ferioli et al., 2000) et la spermine exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose sur les précurseurs lymphocytaires.

Par ailleurs, au cours de la réaction immunitaire innée, la spermine, libérée par les cellules lysées ou phagocytées, favorise la migration et la croissance cellulaire (Soulet and Rivest, 2003). Dans ce cadre, la spermine exerce un effet anti-inflammatoire sur l'activation des macrophages, ce qui permet de contrôler l'intensité de l'inflammation (Zhang et al., 2000). La spermine empêche l'activation des macrophages en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (tumor necrosis factor) et l'IL1 (interleukine 1) (Zhang et al., 2000).

2.5.7.3. Polyamines et système nerveux central

Les polyamines modulent l'excitabilité des neurones en bloquant en position ouverte les canaux cationiques voltages dépendants des neurones, permettant la propagation du potentiel d'action (Fleidervish et al., 2008). Les polyamines sont également indispensables au développement du système nerveux central, en particulier par leurs rôles au moment de la réplication et de la migration des cellules neurales, leurs rôles dans la formation des axones et des synapses (Slotkin and Bartolome, 1986). Ils sont également impliqués dans les mécanismes de régénérations mis en place par les axones après une lésion (Chu et al., 1995; Schreiber et al., 2004a).

2.5.7.4. Polyamines et système reproducteur

Les polyamines ont également un rôle très important dans le système reproducteur masculin et féminin, en particulier dans la fertilité. En effet, au niveau du système reproducteur masculin, les polyamines sont essentiels pour la spermatogénèse et la bonne mobilité des spermatozoïdes. Dans le système reproducteur féminin, ils sont indispensables à la synthèse des hormones stéroïdiennes par les ovaires, au développement folliculaire et au déclenchement de l'ovulation. Finalement, ils sont nécessaires au développement du placenta et à la croissance embryonnaire et fœtale (Lefèvre et al., 2011).

2.5.8. Polyamines et pathologies

Du fait de toutes les implications des polyamines dans de nombreux processus biologiques, il est logique de penser que les polyamines sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme et que l'altération de ce métabolisme peut conduire à des pathologies. En effet, plusieurs études ont montré que l'inactivation *in vivo* de l'ODC ou de la AdoMetDC sont létales à un stade très précoce de l'embryogénèse.

2.5.8.1. Polyamines et maladies héréditaires

A l'heure actuelle, la seule pathologie héréditaire, associée avec des désordres du métabolisme des polyamines, est le syndrome de Snyder-Robinson. C'est un syndrome de retard mental liée à l'X, qui est causé par des mutations dans le gène SpmS codant pour la spermine synthase et localisé sur le chromosome X (de Alencastro et al., 2008; Becerra-Solano et al., 2009; Cason et al., 2003). Les autres symptômes liés à ces mutations sont une baisse du tonus musculaire, une déformation de la colonne vertébrale, une ostéoporose, une asymétrie faciale et des troubles du mouvement et de la marche. Ces mutations induisent principalement un épissage incorrect entraînant la formation d'une spermine synthase tronquée et inactive mais une petite quantité de protéine fonctionnelle est aussi formée. Cette dernière permet de synthétiser un peu de spermine mais dans l'ensemble, il y a une importante augmentation du ratio spermidine/spermine. Les mutations ne sont pas observées dans le site actif de l'enzyme mais empêchent la dimérisation, indispensable à l'activité de la spermine synthase (Wu et al., 2008).

Pour étudier les changements moléculaires causés par l'altération du gène SpmS, une souche de souris transgénique ayant un déficit total en spermine synthase, les souris gyro, ont été générées. Cependant, mise à part une atteinte neurologique, le phénotype de ces souris ne reflète pas celui des patients atteints du syndrome de Snyder-Robinson. Donc les bases moléculaires des altérations phénotypiques causées par le syndrome de Snyder-Robinson ne sont pas encore établies.

2.5.8.2. Polyamines et cancers

Le rôle principal des polyamines dans le maintien de la prolifération et de la survie cellulaire a suscité un grand engouement et des recherches intensives pour déterminer leur implication dans la tumorigénèse. Le premier lien entre polyamines et cancer a été mis en évidence à la fin des années 1960, par l'observation de l'augmentation de la synthèse des polyamines, à travers la surexpression d'ODC, dans le cancer (Russell and Snyder, 1968). Depuis ces observations, l'implication d'ODC et d'autres enzymes de la synthèse et du catabolisme des polyamines, telles que AdoMetDC, SSAT et SMO, dans le cancer ont été constatées. De plus il a été montré que les polyamines ne sont pas seulement impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire mais participent également à l'invasion tumorale et à la formation de métastases. Par conséquent, des molécules ciblant le métabolisme des polyamines ont été et sont encore testées pour la prévention et le traitement du cancer.

2.5.8.2.1. Cibler la biosynthèse des polyamines

2.5.8.2.1.1. ODC et cancers

Suite aux premières observations de Russel et Snyder en 1968 démontrant des niveaux élevés de l'activité d'ODC dans les cancers humains (Russell and Snyder, 1968). L'expression et l'activité d'ODC

et les niveaux des polyamines ont depuis été observés comme fortement augmentés dans de nombreux types de cancers.

Le premier exemple est la polypose adénomateuse familiale, qui est une prédisposition génétique au cancer du côlon due à une mutation génétique inactivatrice d'APC (adenomatous polyposis coli), un gène suppresseur de tumeurs. En effet, dans la muqueuse intestinale des patients atteints de cette pathologie mais également dans des polypes coliques non liés à cette pathologie, l'activité d'ODC est augmentée, dû à l'inactivation d'APC, par stimulation de la transcription d'ODC via la surexpression de l'oncogène c-MYC et l'inhibition de l'activité de l'AZ (Gerner and Meyskens, 2004; Giardiello et al., 1997). De plus, une corrélation entre un polymorphisme nucléotidique dans un intron d'ODC et le risque de développer un cancer du côlon chez l'homme a été confirmé (Martinez et al., 2003).

Les polyamines, à travers la surexpression d'ODC, sont également impliqués dans les carcinomes cutanés non mélanomes, que sont les carcinomes basocellulaire et spinocellulaire, et aussi dans un autre type de cancer cutané, le carcinome à cellule squameuses (Elmets and Athar, 2010; Gilmour, 2007; Pegg, 2009a). Dans ces cancers, la surexpression d'ODC est stimulée par une large variété de stimuli induisant la carcinogénèse, comme entre autres les radiations UV (Tang et al., 2004) et la surexpression de l'oncogène MEK (Feith et al., 2006). Le rôle des polyamines est essentiel dans la phase précoce de survenue de la tumorigénèse cutanée via leur stimulation de la prolifération de l'épiderme, l'altération de la différenciation des kératinocytes, l'augmentation de la néo-vascularisation et l'augmentation de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (Elmets and Athar, 2010; Gerner and Meyskens, 2004; Gilmour, 2007; Pegg, 2009a).

Des niveaux plus élevés de polyamines sont également retrouvés dans les cancers du sein en comparaison aux tissus adjacents normaux (Brown et al., 2009; Manni et al., 1995, 1996; Thomas and Thomas, 2018). Dans ce cancer, les hormones, en particulier, les œstrogènes sont impliqués dans l'origine et la progression du cancer. De ce fait, il a été observé que ces hormones stimulent l'expression de la synthèse des polyamines via la surexpression d'ODC (Brown et al., 2009; Manni et al., 1995, 1996; Thomas and Thomas, 2018).

2.5.8.2.1.1.1. ODC comme cible thérapeutique

Le ciblage de la voie de biosynthèse des polyamines comme thérapie antitumorale a débuté rapidement après avoir découvert que l'augmentation du niveau de polyamines est une caractéristique de nombreux type de tumeurs. Par conséquent, les premières thérapies ciblant le métabolisme des polyamines se sont faites par l'inhibition d'ODC. Les propriétés antitumorales du DFMO, l'inhibiteur irréversible d'ODC, ont pour la première fois été montrées dans les années 1980 (Prakash et al., 1978; Weeks et al., 1982), depuis c'est l'inhibiteur le plus utilisé pour inhiber cette

enzyme. Le DFMO entre en compétition avec les substrats naturels d'ODC et se lie de façon covalente avec ODC conduisant à l'inactivation définitive de ce dernier (Danzin et al., 1979). Plusieurs études utilisant le DFMO pour prouver l'importance des polyamines dans la prolifération des cellules eucaryotes ont également élucidé plusieurs caractéristiques importantes du traitement au DFMO (Mamont et al., 1978). Les conséquences du traitement au DFMO sur les cellules et tissus qui y répondent conduisent à un effet cytostatique plutôt qu'à un effet cytotoxique (Mamont et al., 1978; Porter and Bergeron, 1983; Seidenfeld and Komar, 1985). *In vitro*, le DFMO déplete les cellules en putrescine et spermidine, mais son effet est variable sur la concentration de spermine (Mamont et al., 1978). Cette déplétion du pool intracellulaire de polyamines est associée avec un arrêt du cycle cellulaire et donc de la prolifération sans déclencher l'apoptose (Mamont et al., 1978). Ces effets ne sont pas seulement vrais dans les cellules normales mais aussi dans les cellules tumorales. De ce fait, le DFMO a été considéré comme un nouvel agent antiprolifératif novateur comparé à la plupart des traitements anticancéreux étant cytotoxiques sur les cellules saines. De plus il a été montré qu'en plus de son effet cytostatique, le DFMO peut avoir un effet cytotoxique spécifique aux cellules tumorales. Cet effet a été démontré, *in vitro* et *in vivo*, sur certaines leucémies (Luk et al., 1982) et sur de nombreuses lignées de cancers du poumon à petites cellules (Luk et al., 1981, 1982, 1983). L'ensemble de ces travaux a conduit à la mise en place d'essais cliniques avec le DFMO seul ou en combinaison avec d'autres traitements (Abeloff et al., 1984, 1986). Alors que le DFMO est extrêmement bien toléré, il n'y a pas de réponse clinique significative observée dans les essais précoces (Abeloff et al., 1984, 1986; Horn et al., 1987; Meyskens et al., 1986). Les effets suppresseurs de tumeurs du DFMO ont également été montrés dans le cancer colorectal, de la vessie, cutanée, du sein (Meyskens and Gerner, 1999) et du pancréas (Mohammed et al., 2014). Cependant, dans ces cancers, l'efficacité thérapeutique du DFMO est également limitée car il a seulement un effet cytostatique (Gerner and Meyskens, 2004). Le manque d'efficacité du DFMO en tant qu'agent chimiothérapeutique est probablement dû à son faible transport à l'intérieur des cellules, son effet cytostatique et la mise en place par les cellules tumorales de mécanismes de compensations, comme l'augmentation du transport des polyamines et la surexpression de AdoMetDC. Les cellules tumorales peuvent donc surmonter les effets de l'inhibition d'ODC. Pour y remédier, de récentes études ont combiné le DFMO soit avec des agents cytotoxiques soit avec des agents bloquant le transport des polyamines. La combinaison du DFMO avec des agents cytotoxiques ont montré des résultats intéressants pour certains cancers (Alexiou et al., 2015; Levin et al., 2000), en particulier dans le traitement du neuroblastome en combinaison avec l'étoposide (Saulnier Sholler et al., 2015). Un inhibiteur efficace du transport des polyamines, le AMXT 1501, a démontré une efficacité antitumorale synergique significative avec le DFMO dans des lignées cellulaires de cancer du sein, de mélanome, de

carcinomes cutanés à cellules squameuses et dans les neuroblastomes (Burns et al., 2009; Grossi et al., 2016; Hayes et al., 2014; Muth et al., 2014; Samal et al., 2013).

2.5.8.2.1.1.2. ODC comme cible dans la prévention du cancer

La prévention du cancer est un sujet de recherche en pleine expansion et peut prendre plusieurs formes : de la réduction de l'exposition à des carcinogènes avérés ou suspects à la chimioprévention d'individu avec une prédisposition génétique pour un type de cancer. Bien qu'il y ait d'importantes bénéfices dans la chimioprévention, le principal problème est l'identification de cibles pertinentes, puis le développement d'agents spécifiques et avec peu ou pas d'effets secondaires. Le ciblage du métabolisme des polyamines est considéré comme une stratégie potentielle pour la chimioprévention par le fait que l'inhibition d'ODC a principalement un effet cytostatique plutôt qu'une importante toxicité. Par conséquent, le DFMO, en combinaison avec d'autres molécules, est le premier à avoir été testé pour la chimioprévention ciblant le métabolisme des polyamines (Malt et al., 1985; Slaga, 1984; Tempero et al., 1989). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ainsi que le résultat d'un essai clinique combinant le DFMO au Sulindac, un anti-inflammatoire non stéroïdien, ont montré des résultats très prometteurs chez les patients avec des antécédents de différents types adénomes réséqués (Meyskens and Gerner, 1995; Meyskens et al., 2008; Rial et al., 2009). En effet, il a été observé que les patients traités par le DFMO et le sulindac ont un nombre réduit de tumeurs colorectales. De plus, une étude a montré que les patients atteints de polypose adénomateuse familiale après un traitement de 3 ans au DFMO et Sulindac présentent une baisse de 70% des adénomes métachrones et une baisse de plus de 90% des adénomes colorectaux multiples et/ou avancés (Babbar and Gerner, 2011). Ces données suggèrent que le DFMO puisse agir comme un agent chimiopréventif efficace pour le cancer du côlon, particulièrement en combinaison avec un anti-inflammatoire non stéroïdien.

Pour les néoplasies épithéliales, le DFMO ne semble pas avoir d'effet préventif. En effet, un essai clinique de phase III, avec administration quotidienne de DFMO et conduit sur plus de 5 ans chez des patients avec des antécédents de cancers cutanés non-mélanomes, ne montre pas de résultats significatifs sur la rechute de ces patients (Bailey et al., 2010; Kreul et al., 2012). De plus, un essai de phase II pour la chimioprévention des cancers cutanés non-mélanomes combinant DFMO et Diclofénac, un autre anti-inflammatoire non stéroïdien, n'a pas non plus montré de bénéfices (Jeter et al., 2016).

2.5.8.2.1.2. ODC dans le cancer de la prostate

La surexpression d'ODC et donc par conséquent des niveaux élevés de polyamines sont associés avec le cancer de la prostate (Gerner and Meyskens, 2004; Gupta et al., 2000). En effet, ODC est surexprimé dans des échantillons tumoraux prostatiques (Shukla-Dave et al., 2016). De plus, la surexpression

ectopique d'ODC entraîne la transformation maligne de cellules épithéliales prostatiques « normales » immortalisées, tandis que son inhibition réduit l'activation de la signalisation androgénique dans des cellules dépendantes des androgènes.

Plusieurs études anciennes ont montré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* du DFMO seul ou en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques sur l'inhibition de la croissance de lignées cancéreuses de prostate (Carvalho et al., 1989; Duzendorfer et al., 1983; Mickey et al., 1989). Cependant, le seul essai clinique mis en place dans le but de tester l'effet chimiothérapeutique du DFMO n'a pas apporté de résultats significatifs (Herr et al., 1986).

Le DFMO a donc plutôt été proposé comme pouvant avoir un rôle bénéfique en tant que stratégie chimiopréventive (Esmat et al., 2002; Meyskens et al., 2014; Simoneau et al., 2008). Malheureusement, ces études n'ont pas montré de résultats probants de l'utilisation de DMFO pour la chimioprévention du CaP.

Toutes ces données conduisent à l'hypothèse que le manque d'efficacité du DFMO sur la croissance tumorale peut être dû aux polyamines exogènes. De ce fait, plusieurs études ont évalué l'efficacité antitumorale de la combinaison d'une déprivation de polyamines, constituée de l'association d'un régime sans polyamine et d'une décontamination partielle du tractus gastro-intestinal pour empêcher la formation de polyamines par les bactéries du microbiote, au DFMO. Ces études ont montré que la déprivation en polyamines combinant le DFMO avec un inhibiteur des polyamines oxydases inhibe la croissance prostatique tumorale dans plusieurs modèles animaux (Moulinoux et al., 1991). De plus la déprivation en polyamines seule augmente l'efficacité des chimiothérapies antitumorales prostatiques et stimule l'activité des natural killer dans des souris (Chamaillard et al., 1993). L'efficacité de la déprivation en polyamines a aussi été testée chez l'homme. En effet, dans les cancers prostatiques hormono-réfractaires, cette déprivation en polyamines améliore la qualité de vie des patients via une baisse de la douleur et une augmentation de leur survie (Cipolla et al., 2010; Oredsson, 2003).

2.5.8.2.1.3. Autres enzymes de la synthèse des polyamines et cancers

2.5.8.2.1.3.1. AdoMetDC et cancers

Une étude récente dans le CaP a identifié une altération tumorale impactant la production de dcSAM et donc la synthèse de polyamines (Zabala-Letona et al., 2017). Cette altération est celle de la AdoMetDC appelée AMD1, dont l'étude montre qu'elle est régulée par mTORC1. En effet, AMD1 est surexprimée dans les CaP où mTCOR1 est activé, se traduisant par une augmentation de la prolifération et de la croissance tumorale (Zabala-Letona et al., 2017).

Donc en plus de cibler l'ODC, des inhibiteurs de l'enzyme métabolique AdoMetDC ont également été étudiés pour leurs implications dans le cancer. Le premier est le MGBG (Methylglyoxal bis ou guanylhydrazone), un analogue structurel de la spermidine, qui est capable, *in vitro*, de diminuer l'expression de spermidine et spermine ce qui augmente la quantité de putrescine (Mihich, 1963; Williams-Ashman and Schenone, 1972). Cet inhibiteur est capable d'inhiber la croissance cellulaire. Malgré le potentiel de cet inhibiteur, le rôle de MGBG comme agent chimiothérapeutique est très limité à cause de son importante toxicité mitochondriale (Nass, 1984). Par la suite d'autres inhibiteurs de l'enzyme ont été synthétisés, basés sur la structure de SAM, le substrat de la AdoMetDC (Secrist et al., 1987; Wu and Woster, 1992). Le plus efficace est le AbeAdo (5'([(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino)-5'-deoxy-adenosine), un inactivateur irréversible de la AdoMetDC (Danzin et al., 1990) capable, comme le MGBG, de diminuer la quantité de spermidine et de spermine et d'augmenter la putrescine. Cet inhibiteur a un effet cytostatique dû au défaut d'hyposylation de eIF5A (Byers et al., 1993). Plus récemment, un inhibiteur compétitif de la AdoMetDC, le SAM486A (4-amidinoindan-1-one-2'-amidinhydrazone) produisant peu de toxicité mitochondriale, a été testé dans des essais clinique de phase I et II pour de multiples cancers (Eskens et al., 2000; Paridaens et al., 2000; Siu et al., 2002; Zhou et al., 2000), avec une réponse partielle dans les lymphomes non-Hodgkinien (Pless et al., 2004). Le SAM486A, comme les deux inhibiteurs précédents baisse la spermidine et la spermine et augmente la putrescine et par conséquent inhibe la croissance cellulaire (Regenass et al., 1994).

2.5.8.2.1.3.2. Spermidine et spermine synthèses et cancers

Des inhibiteurs ont aussi été développés pour cibler les polyamines synthèses, l'AdoDATO (S-adenosyl-3-thio-1,8-diaminooctane) ciblant la spermidine synthase et l'AdoDATAD (S-adenosyl-1,12-diamino-3-thio-9-azadodecane) ciblant la spermine synthase. Leur but premier était de comprendre le rôle de chaque enzyme mais ces deux inhibiteurs causent une petite inhibition de la croissance de lignées cellulaires cancéreuses (Pegg et al., 1982, 1989). Cependant, ces données doivent être approfondies.

2.6. Principaux régulateurs des voies métaboliques dans le cancer

Les cellules eucaryotes normales ne prolifèrent pas de façon autonome mais entrent en division cellulaire seulement quand elles en ont reçu l'ordre par des facteurs de croissance et les voies de signalisation en aval de ces facteurs, influençant l'expression de gènes et la physiologie cellulaire. Etant donné que la prolifération cellulaire dépend de l'activité métabolique, il n'est pas surprenant de constater que les signaux, régulant le métabolisme, peuvent être stimulés par des facteurs de croissance. En effet, en absence de signalisation par les facteurs de croissance les cellules normales perdent rapidement l'expression de leurs transporteurs de nutriments et ne sont alors plus capables

de maintenir leurs synthèses bioénergétiques de base, indispensables à leur prolifération et survie. Donc les cellules prolifératives dépendent des facteurs de croissance pour augmenter leur consommation de glucose et glutamine dans le but d'accroître leur métabolisme quand cela est nécessaire à leurs besoins. De plus, la signalisation par les facteurs de croissance réorganise les voies métaboliques indépendamment des voies de régulations traditionnelles utilisant des mécanismes allostériques.

Les mécanismes qui intègrent la transduction des signaux et le métabolisme cellulaire sont largement conservés entre les cellules normales et les cellules tumorales. La différence majeure est que dans les cellules normales, l'initiation de la signalisation nécessite une stimulation extracellulaire alors que les cellules cancéreuses présentent, le plus souvent, des mutations qui activent de façon chronique ces voies, leur permettant donc de maintenir un phénotype métabolique de biosynthèse indépendamment des contraintes physiologiques normales. Les cellules cancéreuses sont donc capables d'augmenter de façon autonome leur métabolisme pour l'adapter à leurs nouveaux besoins.

Parmi les régulateurs participant à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, les plus connus et les plus étudiés sont les voies PI3K/Akt/mTOR (mechanistic target of rapamycin) et AMPK et les facteurs de transcription HIF-1 (hypoxia inducible factors 1), c-MYC. Les mécanismes d'implications de ces régulateurs dans le cancer étant très nombreux et variés, cette partie se focalise sur leurs implications dans le métabolisme des cellules tumorales.

2.6.1. La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est hautement conservée et largement exprimée dans les cellules pour répondre aux facteurs de croissance (Franke et al., 2003). La liaison d'un facteur de croissance sur son récepteur de surface active la PI3K qui phosphoryle les phosphatidylinositol bisphosphates (PIP2) en phosphatidylinositol triphosphates (PIP3) au niveau de la membrane plasmique (Figure 32). Ces lipides sont ensuite capables de recruter et/ou d'activer des effecteurs, particulièrement les sérines/thréonines kinases AKT et mTOR. Une fois activée la voie PI3K/AKT/mTOR ne permet pas seulement d'induire une forte croissance et la survie des cellules cancéreuses mais affectent de façon importante leurs métabolismes (Elstrom et al., 2004; Fan et al., 2010; Plas and Thompson, 2005). En effet, l'activation de AKT permet aux cellules cancéreuses d'augmenter l'expression des transporteurs de nutriments à leur surface, en particulier les récepteurs au glucose et à la glutamine, permettant ainsi d'augmenter l'absorption de ces nutriments et par conséquent augmenter la glycolyse et la glutaminolyse (Barata et al., 2004; Edinger and Thompson, 2002; Roos et al., 2007; Wieman et al., 2007; Xu et al., 2005) (Figure 32). L'activation d'AKT stimule également la glycolyse et la production de lactate en phosphorylant et activant des enzymes clés de cette voie comme l'héxokinase 2 et la

phosphofructokinase-2 (Elstrom et al., 2004; Plas et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Robey and Hay, 2009) (Figure 32). Un des autres rôles d'AKT est d'augmenter la biosynthèse lipidique en surexprimant et activant des enzymes de la lipogenèse comme l'ACLY qui va détourner le citrate mitochondrial du cycle de Krebs vers la production d'acétyl-CoA (cf. « Métabolisme lipidique » et Figure 32) (Bauer et al., 2005; Berwick et al., 2002; Hatzivassiliou et al., 2005).

Finalement, AKT stimule la signalisation cellulaire en activant mTOR via l'inhibition de TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), son régulateur négatif (Robey and Hay, 2009). mTOR activé joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire et dans le métabolisme mitochondrial et est souvent activé de façon constitutive dans la tumorigénèse (Guertin and Sabatini, 2007). mTOR est bien connu pour augmenter la synthèse protéique (Gingras et al., 2001), en activant la traduction des ARN et la biogénèse ribosomale, la lipogenèse *de novo* via SREBP (Sterol regulatory element-binding proteins) (Chang et al., 2005; Düvel et al., 2010) et la biogénèse mitochondriale via PGC-1 α (Bentzinger et al., 2008; Cunningham et al., 2007; Ramanathan and Schreiber, 2009; Schieke et al., 2006) (Figure 32).

En raison de ses fonctions importantes, l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR est sûrement la voie de signalisation la plus fréquemment altérée dans les cancers humains spontanés et se fait via plusieurs mécanismes. En effet, cette voie est activée par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur comme la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) (Figure 32) qui contrebalance l'activité de la PI3K en déphosphorylant les PIP mais également par des mutations dans les composants de la voie, les rendant constitutivement actifs (Wong et al., 2010; Zhong et al., 2000). De plus, il a été montré que l'augmentation de l'activité de AKT est suffisante pour induire l'effet Warburg dans des cellules non transformées ou tumorales (Buzzai et al., 2005; Elstrom et al., 2004), confirmant l'importance de l'activation de AKT dans les modifications métaboliques des cellules tumorales.

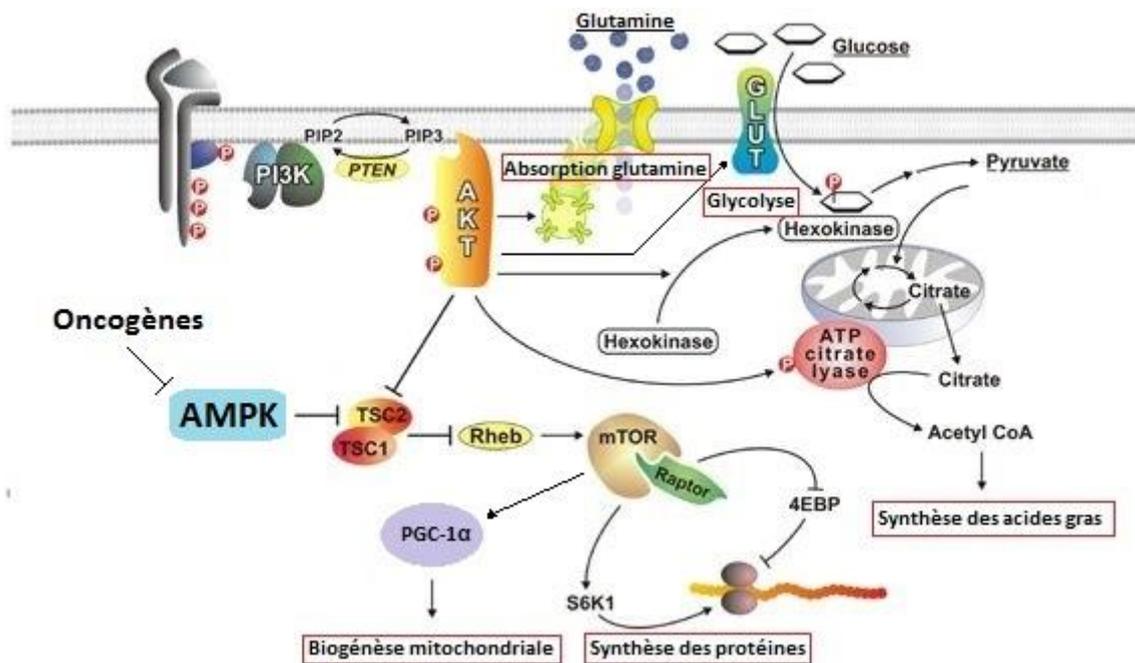


Figure 32 : Implications des voies PI3K/AKT/mTOR et AMPK dans le métabolisme des cellules tumorales (Adapté de (Plas and Thompson, 2005))

2.6.2. La voie AMPK

L'AMPK est un senseur crucial du statut énergétique cellulaire et a un rôle pléiotropique important dans les réponses cellulaires aux stress métaboliques (Steinberg and Kemp, 2009). Il est bien connu que la voie AMPK met en relation le statut énergétique et les signaux de croissance. D'un point de vue moléculaire, l'AMPK a des effets opposés à AKT et fonctionne comme un inhibiteur de mTOR, en phosphorylant et activant TSC2 qui à son tour inhibe mTOR (Figure 32) (Inoki et al., 2003). L'AMPK agit donc comme un point de contrôle du métabolisme modulant la réponse des cellules vis-à-vis de la disponibilité énergétique. Plus précisément, l'AMPK est activée physiologiquement en réponse à une augmentation du ratio AMP/ATP lors des situations de carences énergétiques. De ce fait, l'activation de l'AMPK réduit les voies métaboliques consommatrices d'énergie et augmente les voies productrices d'ATP, ce qui a pour conséquence de réduire drastiquement la prolifération cellulaire (Jones et al., 2005; Kuhajda, 2008; Shackelford and Shaw, 2009). Les cellules tumorales doivent donc passer au-dessus de ce point de contrôle pour pouvoir continuer à proliférer même dans un microenvironnement qui leur est peu favorable (Shackelford and Shaw, 2009). De ce fait, plusieurs mutations oncogéniques et voies de signalisations ont été identifiées comme étant capables d'inhiber la voie de signalisation de l'AMPK (Figure 32) (Shackelford and Shaw, 2009). Cette inhibition permet aux cellules tumorales de répondre à toutes les voies de signalisations activées, de façon exacerbée, par les oncogènes et la perte des gènes suppresseurs de tumeurs. De nombreux types de tumeurs présentent une perte de la signalisation normale de l'AMPK (Ji et al., 2007; Wingo et al., 2009), ce qui contribue également à la

mise en place de l'effet Warburg via l'activation de mTOR et indirectement de HIF-1 (Hudson et al., 2002; Majumder et al., 2004).

Ces observations suscitent un grand intérêt en clinique et des agonistes de l'AMPK sont actuellement en cours d'évaluation dans le but de réassembler le statut énergétique et les signaux de croissance dans les cellules tumorales et ainsi inhiber la croissance cellulaire. L'agoniste le plus utilisé est la metformine, un inhibiteur de mTOR dont l'efficacité antitumorale a été mise en évidence dans plusieurs types de cancers via différents mécanismes (Anisimov et al., 2005; Libby et al., 2009; Wang and Guan, 2009).

2.6.3. HIF-1

La concentration en oxygène est significativement réduite (hypoxie) dans la plupart des cancers comparée au tissu normal adjacent (Vaupel, 2004). La réduction de la disponibilité en oxygène induit le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) constitué d'une sous-unité HIF-1 α régulée par l'oxygène et la voie PI3K/AKT/mTOR (Düvel et al., 2010; Jiang et al., 2001) et d'une sous-unité HIF-1 β constitutivement exprimée (Bertout et al., 2008; Wang et al., 1995) (Figure 33). Dans des cellules bien oxygénées, différents résidus proline de HIF-1 α sont hydroxylés post-traductionnellement par PHD2 (propyl hydrolase domaine protein 2) (Kaelin, 2008), ce qui entraîne la fixation du suppresseur de tumeur VHL (von Hippel-Lindau) capable de recruter une ubiquitine ligase E3 entraînant la dégradation de HIF-1 α par le protéasome (Kaelin and Ratcliffe, 2008) (Figure 33). En condition d'hypoxie, l'hydroxylation propyle de HIF-1 α est inhibée par la déprivation en oxygène et la génération de ROS mitochondriaux (Brunelle et al., 2005; Kaelin, 2005), ce qui conduit à la stabilisation de HIF-1 α et à l'activité de facteur de transcription de HIF-1 (Guzy and Schumacker, 2006; Mansfield et al., 2005). Les cibles de HIF-1 comprennent de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées à tous les niveaux dans la biologie du cancer (Gordan and Simon, 2007; Mole et al., 2009; Semenza, 2010a, 2010b; Xia et al., 2009), donc dans le métabolisme énergétique et en particulier la glycolyse aérobie (Iyer et al., 1998; Semenza, 2010b) (Figure 33). En effet, HIF-1 active la transcription des gènes codant pour les transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3, pour la plupart des enzymes de la glycolyse (Semenza et al., 1994) comme l'héxokinase 1 et 2 (HK1 et HK2) (Iyer et al., 1998; Kim et al., 2007), l'aldolase (ALDO), la phosphoglycérate kinase (PGK), l'énolase (ENO) (Sedoris et al., 2010; Vander Heiden et al., 2009) et pour la LDHA qui convertie le pyruvate en lactate (Iyer et al., 1998; Vander Heiden et al., 2009). Dans de nombreuses tumeurs, HIF-1 est souvent stabilisé et activé même en normoxie grâce à des voies de signalisations oncogéniques tel que PI3K/AKT/mTOR (Majumder et al., 2004; Zundel et al., 2000), et par des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs comme VHL (Kaelin, 2008; Kapitsinou and Haase, 2008), et d'autres enzymes comme SDH (succinate

déshydrogénase) (Hewitson et al., 2007; Selak et al., 2005) et FH (fumarate hydratase) (Hewitson et al., 2007; Isaacs et al., 2005).

Alors que le rôle de HIF-1 dans la promotion de la glycolyse est clairement établi, il a été montré que HIF-1 active également la PDK1 (Kim et al., 2006, 2007; Papandreou et al., 2006) qui inactive le complexe PDH, ce qui a pour conséquence de limiter l'entrée de pyruvate dérivé de la glycolyse dans le cycle de Krebs et augmente la conversion du pyruvate en lactate (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). Cette réduction du flux de pyruvate dans le cycle de Krebs baisse le taux de phosphorylation oxydative et de consommation d'oxygène (Papandreou et al., 2006), donc diminue la respiration cellulaire et renforce le métabolisme glycolytique et la survie cellulaire (Figure 33). Cette adaptation est importante pour la survie des cellules tumorales en hypoxie en empêchant la surproduction de ROS mitochondriaux (Guzy et al., 2005) mais est critique pour la synthèse d'intermédiaires nécessaires à la biosynthèse cellulaire (Lum et al., 2007).

L'inhibition pharmacologique de l'activité de HIF-1 ou PDK1 augmente la consommation d'oxygène des cellules tumorales et donc reverse certains des effets métaboliques tumorigènes de HIF-1 (Cairns et al., 2007; Semenza, 2003, 2010a). De ce fait, plusieurs candidats incluant l'inhibiteur de PDK1, l'acide dichloroacétique, sont actuellement en cours d'évaluation pour leur utilité thérapeutique (Cairns et al., 2009; Michelakis et al., 2008; Onnis et al., 2009).

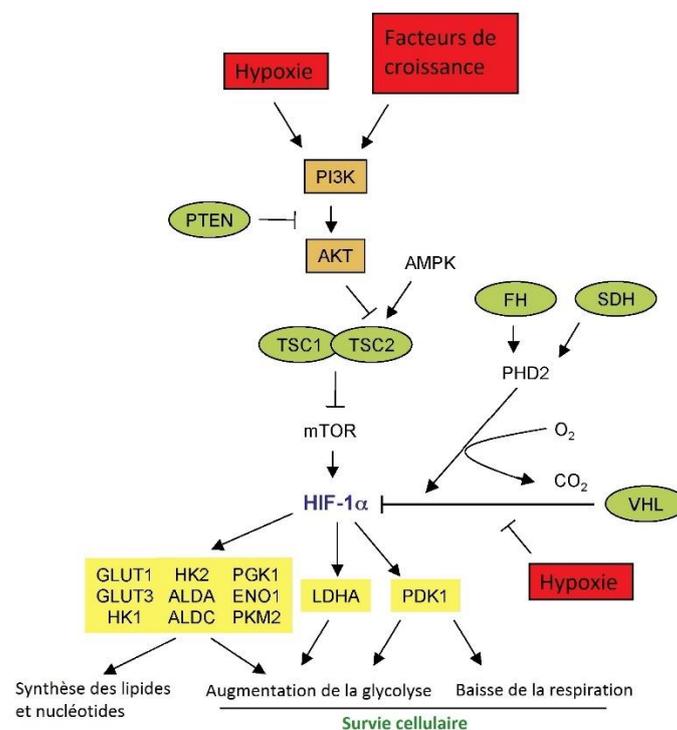


Figure 33 : Régulations et rôles de HIF-1 dans le métabolisme des cellules tumorales
(Adapté de (Semenza, 2010b))

2.6.4. c-MYC

Les gènes de la famille MYC, en particulier c-MYC, sont fréquemment surexprimés dans les tumeurs (Beroukhim et al., 2010; Dalla-Favera et al., 1982; Dang et al., 2009a; Shou et al., 2000) et ont un rôle bien décrit dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire (Armelin et al., 1984; Eilers and Eisenman, 2008; Freie and Eisenman, 2008; Kelly et al., 1983). De plus, le facteur de transcription oncogénique c-MYC est impliqué à plusieurs niveaux dans les modifications métaboliques des cellules tumorales (Dang, 2013; Dang et al., 2009a; Deberardinis et al., 2008; Fan et al., 2010; Miller et al., 2012).

En effet, comme la voie PI3K/AKT/mTOR et HIF-1, c-MYC joue un rôle important et direct dans la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses (Goetzman and Prochownik, 2018; Hu et al., 2011), en activant plusieurs transporteurs du glucose comme GLUT1 (Osthus et al., 2000), des enzymes glycolytiques (Kim et al., 2004; Osthus et al., 2000), en particulier, HK2 (Kim et al., 2007), PFK, ENO1 et PKM2 (Kim et al., 2004; Osthus et al., 2000) et également en favorisant la conversion du pyruvate en lactate en surexprimant la LDHA (Lewis et al., 1997; Ramanathan et al., 2005; Shim et al., 1997) (Figure 34).

La transformation maligne stimule la glutaminolyse (Deberardinis et al., 2008) et de nombreuses cellules tumorales sont très dépendantes de cet acide aminé nécessaire à leur croissance et prolifération (Dang, 2010; Kaadige et al., 2010; Wise et al., 2008). c-MYC est connu pour avoir un rôle majeur dans la régulation et dans l'augmentation de la glutaminolyse dans les cellules tumorales (Dang, 2013; Goetzman and Prochownik, 2018; Miller et al., 2012). Il permet de produire des macromolécules et des antioxydants nécessaires à la croissance cellulaire (Wise et al., 2008). En effet, la surexpression de l'oncogène c-MYC augmente l'absorption de glutamine dans les cellules tumorales en induisant de façon directe l'expression des transporteurs de la glutamine : SLC5A1 et SLC7A1 (Gao et al., 2009) (Figure 34). c-MYC induit également l'expression de la glutaminase 1, l'enzyme limitante du catabolisme de la glutamine qui désamine la glutamine en glutamate (Curthoys and Watford, 1995; Gallagher et al., 2008; Gao et al., 2009). Ce dernier sera ensuite soit métabolisé à travers le cycle de Krebs, comme source de carbone, pour maintenir les voies anaplerotiques et donc le métabolisme mitochondrial (Li et al., 2005), soit servir de substrat pour la synthèse de glutathion indispensable au contrôle du statut redox des cellules, soit permettre la biosynthèse de protéines et nucléotides en étant une source de nitrogène (Dang, 2013; DeBerardinis et al., 2007). Il a été montré que les cellules tumorales surexprimant c-MYC sont totalement dépendantes de la glutamine pour leur survie et leur prolifération (Reitzer et al., 1979). En effet, la déprivation en glutamine ou l'inhibition pharmacologique de la GLS dans les cellules tumorales transformées par c-MYC suffit à déclencher

l'apoptose des cellules tumorales (cf. « Métabolisme de la glutamine et cancer ») (Klimberg and McClellan, 1996; Yuneva et al., 2007), en déplaçant le cycle de Krebs de ces intermédiaires. Donc les cellules tumorales dépendantes de la glutaminolyse induite par c-MYC reprogramment leur métabolisme mitochondrial pour soutenir l'anaplerose du cycle de Krebs et leur viabilité cellulaire via le catabolisme de la glutamine, même en présence de glucose (Le et al., 2012; Yuneva et al., 2007).

En condition d'hypoxie et/ou de déficience en glucose, c-MYC est également capable de maintenir le métabolisme de la glutamine pour faire tourner le cycle de Krebs et permettre ainsi la survie cellulaire (Dang et al., 2008; Miller et al., 2012). Dans ces conditions, c-MYC est également capable d'augmenter la conversion de la glutamine en glutathionne afin de contrôler l'accumulation des ROS mitochondriaux et empêcher l'apoptose (Miller et al., 2012).

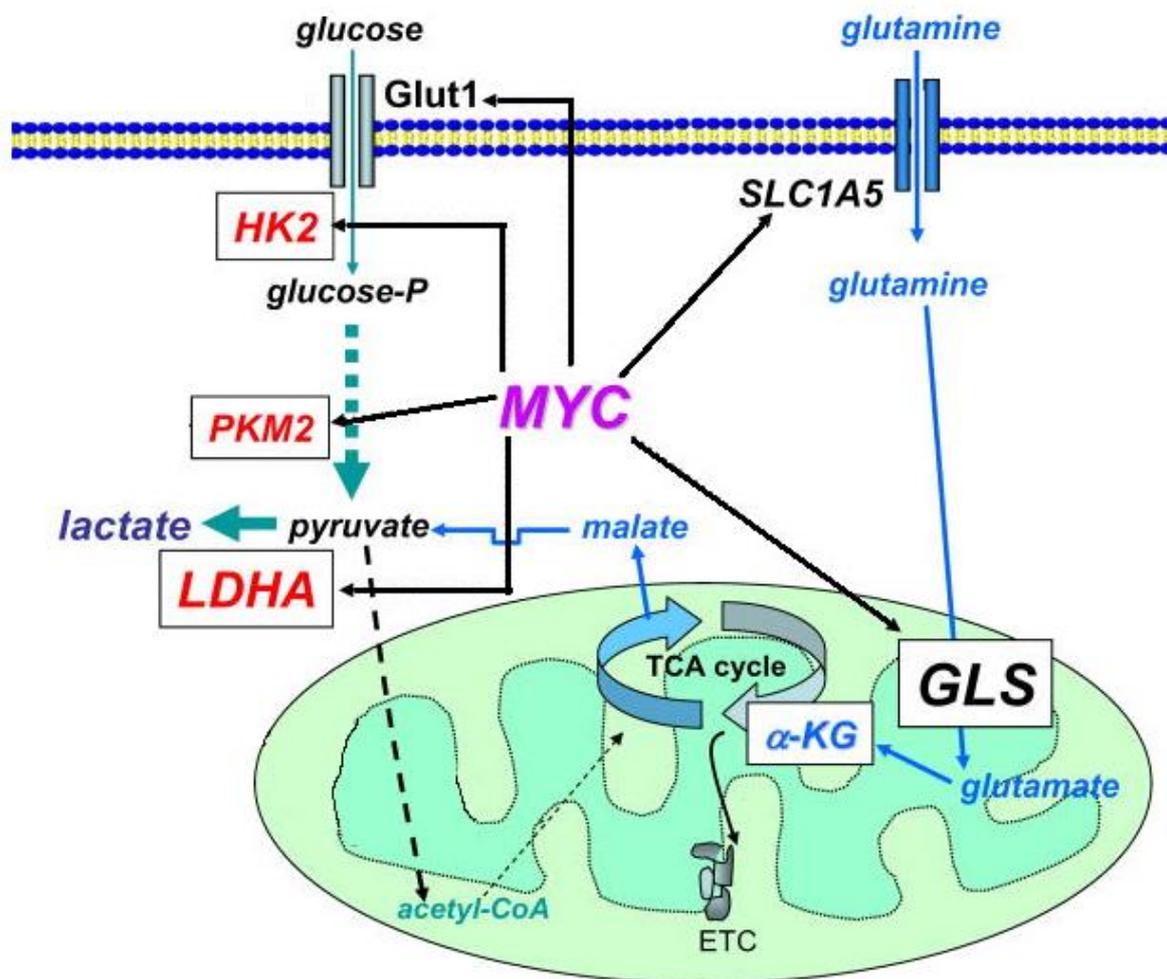


Figure 34 : Implications de c-MYC dans la régulation du métabolisme des cellules tumorales
ETC : chaine respiratoire ; α-KG : α-cétoglutarate ; TCA cyle : cycle de Krebs (Adapté de (Dang et al., 2009a))

Partie 3 : Le coactivateur transcriptionnel

PGC-1 α

L'activation de gènes est un processus multi étapes impliquant un très grand nombre de complexes protéiques. La fonction des facteurs de transcription est de recruter des coactivateurs ou de corépresseurs transcriptionnels pour permettre l'activation ou la répression de gènes. Bien que les facteurs de transcription se lient à l'ADN, ils sont généralement dépourvus des activités enzymatiques nécessaires à la modification de la chromatine, au déroulement de l'ADN et au recrutement de l'ARN polymérase II. Ces activités biochimiques sont le travail des corégulateurs, qui sont généralement présents sous forme de complexes multi protéiques dans le noyau et qui sont recrutés par les facteurs de transcription en réponse à des signaux cellulaires. La plupart des études sur la régulation de l'activité des gènes au niveau transcriptionnel se sont concentrées sur les changements des quantités ou des activités des facteurs de transcription. Bien que cela soit un mode de régulation majeur, de récentes recherches ont montré que le contrôle des systèmes de régulation des gènes n'est pas uniquement le terrain d'action des facteurs de transcription. En effet, les coactivateurs sont hautement régulés et sont capables de participer à la régulation des gènes, pas seulement en étant des éléments nécessaires au recrutement de la machinerie transcriptionnelle, mais en étant également des cibles principales de signaux physiologiques (Spiegelman and Heinrich, 2004). Le meilleur exemple est peut-être la famille de co-activateurs PGC-1 (PPAR γ co-activateur 1). Même si ces protéines n'ont pas été les premiers co-activateurs décrits comme étant hautement régulés, leurs régulations et leurs fonctions biologiques ont été étudiées en détails. En effet, les membres de la famille de co-activateur PGC-1 sont des acteurs majeurs de voies de signalisations impliquées dans le contrôle du métabolisme cellulaire et systémique.

1. Découverte, structure et fonction des PGC-1

1.1. Les gènes de la famille de PGC-1 α

La famille PGC-1 est composée de trois membres, PGC-1 α , PGC-1 β et PRC (PGC-1-Related Coactivator), qui partagent des caractéristiques structurelles et des modes d'action. Le premier membre de la famille PGC-1 a été identifié à la fin des années 1990 comme interagissant avec le facteur de transcription PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) dans le tissu adipeux brun, un tissu riche en mitochondries et spécialisé dans la thermogénèse, il a été appelé PGC-1 α (Puigserver et al., 1998a). PGC-1 α est un coactivateur dont l'expression est largement induite en réponse à divers stimuli externes : son expression est drastiquement augmentée en réponse à une exposition au froid dans le

tissu adipeux brun et dans le muscle squelettique (Puigserver et al., 1998a) en association avec l'expression de protéines mitochondriales découplantes (UCPs : uncoupling proteins).

PGC-1 β est l'homologue le plus proche de PGC-1 α . PGC-1 α et PGC-1 β sont tous les deux exprimés dans des tissus à forte capacité oxydative tels que le tissu adipeux brun, le cœur, le rein, les muscles squelettiques et le cerveau (Handschin and Spiegelman, 2006). Ces deux coactivateurs partagent de larges identités de séquence (Kressler et al., 2002; Lin et al., 2002a), regroupées dans plusieurs domaines distincts comprenant un domaine d'activation en position N-terminal (40%), un domaine de régulation central (35%) et un domaine de liaison à l'ARN en position C-terminal (48%) (Figure 35). PRC, exprimé de façon ubiquitaire, partage une homologie plus restreinte avec les deux autres membres de la famille (Andersson and Scarpulla, 2001).

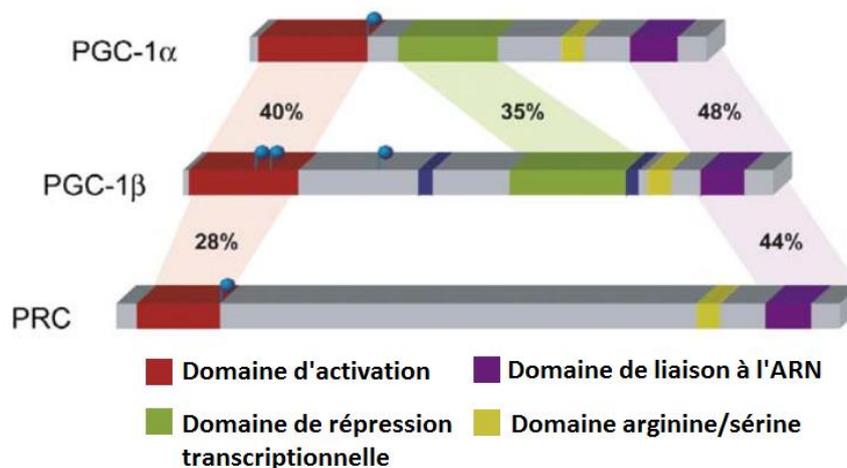


Figure 35 : Homologie de structure entre les membres de la famille PGC-1 (Adapté de (Lin et al., 2005a))

Plus précisément, l'extrémité N-terminale de ces coactivateurs contient un domaine d'activation transcriptionnelle ainsi qu'un motif majeur d'interaction avec les récepteurs nucléaires : le motif LXXLL riche en leucine (Figure 36) (Puigserver and Spiegelman, 2003). Cette extrémité contient également un domaine impliqué dans l'inhibition de PGC1 α . La partie C-terminale présente la plus grande homologie entre les trois coactivateurs PGC-1 (Kressler et al., 2002; Lin et al., 2002a) et comprend un site de reconnaissance et de liaison à l'ARN (RRM, RNA recognition motif) et un domaine riche en sérine et arginine (RS, serine/arginine - rich domain). Ces deux domaines sont connus pour être impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN (Figure 36).

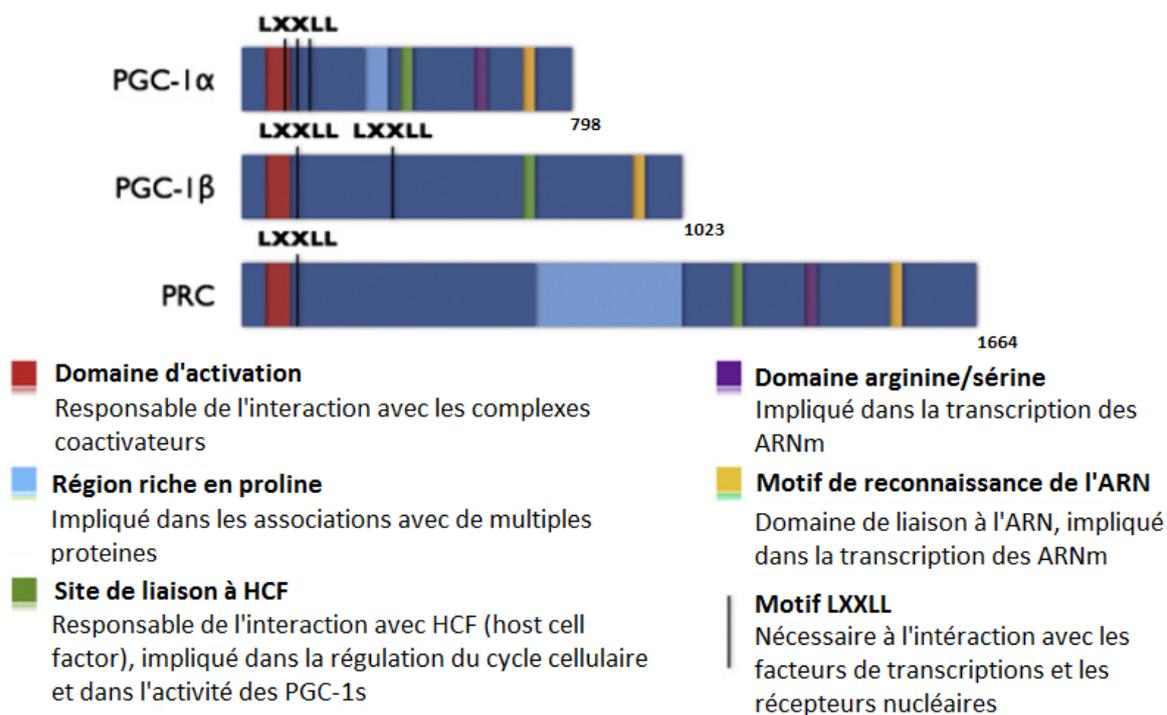


Figure 36 : Structure des co-activateurs de la famille PGC-1 (Adapté de (Jones et al., 2012))

Des analyses de séquences ont révélé que la famille de coactivateurs PGC-1 est conservée dans de nombreuses espèces incluant les primates, les rongeurs, les ruminants, les oiseaux, les amphibiens et les poissons. Ces coactivateurs présentent également des domaines structuraux et plusieurs motifs de séquences similaires que l'on retrouve chez tous les membres de la famille, le plus notable est DHDYCQ (Lin et al., 2002a). A ce jour, aucun homologue de PGC-1 n'a été trouvé chez les vers, mouches et levures.

1.2. Interaction de PGC-1 α avec des facteurs de transcription

Les coactivateurs PGC-1 exercent leur fonction de régulateur transcriptionnel en se fixant à divers facteurs de transcription et récepteurs nucléaires qui reconnaissent des séquences spécifiques sur leurs gènes cibles. En effet, ils ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN. Alors que d'autres coactivateurs de transcription possèdent d'une activité histone acétyltransférase intrinsèque qui facilite le remodelage de la chromatine et la transcription de gènes, les membres de la famille PGC-1 sont dépourvus d'activité enzymatique. Par conséquent, les coactivateurs PGC-1 exercent leur fonction de modulation sur la transcription de gènes en agissant comme une plateforme d'ancrage pour les autres protéines avec une activité histone acétyltransférase et en favorisant l'assemblage de la machinerie de transcription pour déclencher la transcription de gènes.

La région N-terminale de PGC-1 α possède plusieurs motifs riches en leucines LXXLL, aussi appelés NR boxes, qui sont cruciales pour permettre l'interaction de PGC-1 α avec une large variété de récepteurs nucléaires comme PPAR α (Vega et al., 2000), ER (estrogen receptor) (Tcherepanova et al., 2000), RXR α (retinoid X receptor α) (Delerive et al., 2002), GR (glucocorticoid receptor) (Knutti et al., 2000), HNF4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α) et entrainer leur activation. L'analyse de la séquence de PGC-1 α a permis de mettre en évidence trois motifs LXXLL : L1 (acides aminés 88 à 92), L2 (acides aminés 144 à 148) et L3 (acides aminés 210 à 214) (Huss et al., 2002; Knutti and Kralli, 2001). Le motif L2 est absolument requis pour les interactions dépendantes des ligands avec le récepteur aux estrogènes alpha (Tcherepanova et al., 2000), le récepteur PPAR α (Vega et al., 2000), le récepteur PPAR β (Wang et al., 2003), le récepteur à l'acide rétinoïque (Delerive et al., 2002), le récepteur aux glucocorticoïdes (Knutti et al., 2000; Yoon et al., 2001), le récepteur à l'hormone thyroïdienne (Wu et al., 2002b; Zhang et al., 2004a) et le récepteur LXR α (liver X récepteur alpha) (Oberkofler et al., 2003). Le récepteur HNF-4 α (Yoon et al., 2001) et PPAR γ (Wallberg et al., 2003) interagissent également avec le motif L2 mais la présence de leur ligand respectif n'est pas indispensable. Les motifs L2 et L3 sont tous les deux impliqués dans l'interaction de PGC-1 α avec les récepteurs orphelins ERR α et ERR γ (Huss et al., 2004; Schreiber et al., 2003, 2004b).

En partie N-terminal, on trouve également un domaine riche en proline, entre les acides aminés 200 à 400, qui interagit avec la région charnière de PPAR γ , le domaine de liaison à l'ADN de NRF1 (Figure 37) (Mootha et al., 2003; Wu et al., 1999) et avec le récepteur au farnésoid X (FXR) (Zhang et al., 2004a). Finalement, une autre séquence située entre les acides aminés 400 et 500 permet l'interaction de PGC-1 α avec le facteur MEF2C (myocyte enhancer factor 2C) (Figure 37) (Lin et al., 2002b; Michael et al., 2001). Pour certains facteurs de transcription, le site de liaison sur PGC-1 α n'est pas encore exactement identifié. C'est le cas du récepteur prénagène X (PXR) (Bhalla et al., 2004). Quant au facteur FOXO1 (Forkhead box protein O1) il semble se lier dans la région C-terminale mais la localisation exacte n'est pas connue (Puigserver et al., 2003).

L'ensemble de ces interactions est responsable de la régulation du métabolisme oxydatif mitochondrial mais également de l'homéostasie glucidique lipidique. Le tableau suivant présente l'ensemble des facteurs de transcription interagissant avec PGC- α ainsi que les régulations géniques qui en résultent.

Facteur de transcription	Fonctions	Références
NRF1/NRF2	Biogénèse mitochondriale	(Mootha et al., 2003; Wu et al., 1999)
PPAR α /PPAR β	Biogénèse mitochondriale ; oxydation des acides gras	(Vega et al., 2000; Wang et al., 2003)
PPAR γ	Biogénèse mitochondriale ; induction d'UCP1	(Guan et al., 2005; Huss et al., 2002, 2004; Kamei et al., 2003; Puigserver et al., 1998a)
ERR α /ERR β	Biogénèse mitochondriale	(Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2004b)
TR β	Induction de CPT1	(Wu et al., 2002a; Zhang et al., 2004a)
FXR	Métabolisme des triglycérides	(Zhang et al., 2004b)
LXR α /LXR β	Sécrétion de lipoprotéines	(Lin et al., 2005b; Oberkofler et al., 2003)
GR ; HNF4 α ; FOXO1	Gluconéogenèse	(Kressler et al., 2002; Lin et al., 2002a; Mortensen et al., 2006; Puigserver et al., 2003; Yoon et al., 2001)
MEF2	Induction gènes des fibres musculaires de type I	(Lin et al., 2002b; Michael et al., 2001)
Er α /Er β ; PXR	Inconnu	(Bhalla et al., 2004; Kressler et al., 2002)
SREPB1/SREBP2	Lipogenèse ; sécrétion de lipoprotéines	(Lin et al., 2005b)
Sox9	Chondrogenèse	(Kawakami et al., 2005)

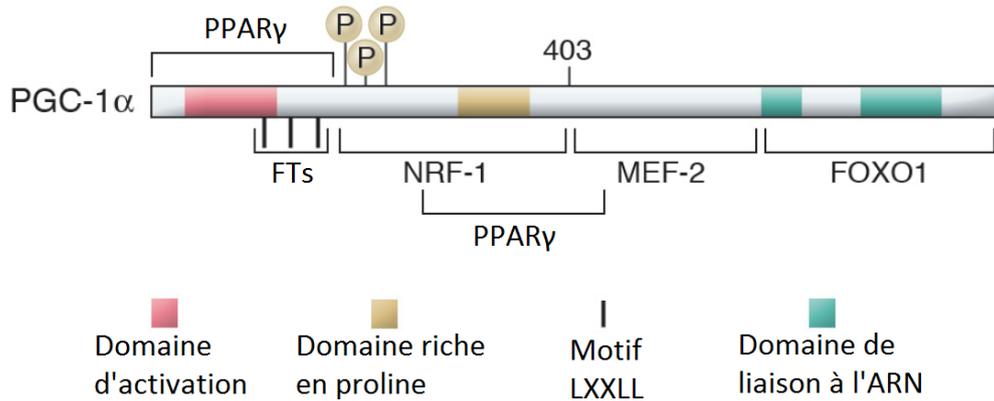


Figure 37 : Site de fixations de certaines protéines interagissant avec PGC-1 α
 FTs : Facteurs de transcription (Adapté de (Finck and Kelly, 2006))

1.3. Interaction de PGC-1 α avec la machinerie transcriptionnelle

Contrairement à la plupart des coactivateurs qui possèdent des activités enzymatiques spécifiques responsables du remodelage de la chromatine, PGC-1 α est dépourvu d'activité enzymatique propre (Puigserver and Spiegelman, 2003). Cependant, la région N-terminale de PGC-1 α possède un domaine d'activation très conservé qui sert de site de fixation pour le recrutement de plusieurs protéines avec une activité histone acétyltransférase comme SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), CBP (CREB-binding protein) et p300 (Puigserver et al., 1999). Ces protéines acétylent les histones et remodelent la structure de la chromatine pour permettre son accès aux facteurs de transcription. Ce recrutement nécessite la liaison avec un facteur de transcription ce qui permet un changement de conformation au niveau de la région N-terminale (Monsalve et al., 2000; Puigserver et al., 1999) (Figure 38). Cette partie N-terminale confère également à PGC-1 α un rôle dans la mise en place du complexe de pré-initiation de la transcription et du complexe d'élongation, en interagissant avec l'ARN polymérase II sous forme hypophosphorylée (Figure 38). Cette interaction en complément du remodelage de la chromatine effectué par les protéines SRC-1 et CBP/p300 permet l'initiation de la transcription.

La région C-terminale de PGC-1 α constitue un site d'amarrage pour plusieurs protéines formant le complexe TRAP (thyroid receptor-associated protein)/DRIP (vitamin D receptor-interacting protein)/Mediator, dont la fonction principale est de transmettre les signaux des facteurs de transcription à la polymérase (Allen and Taatjes, 2015) dans le but d'initier la transcription (Figure 38).

Cette région contient aussi un motif bien conservé de reconnaissance de l'ARN, impliquée dans la liaison avec l'ARN et l'ADN simple brin. On y trouve également des domaines RS, qui sont des portions riches en serine/arginine, sur PGC-1 α et PRC mais pas sur PGC-1 β . Le motif de reconnaissance de l'ARN et les domaines RS sont retrouvés dans des protéines impliquées dans l'épissage des pré-ARNm ou l'export des ARNm, ceci suggère donc que leur présence pourrait conférer à PGC-1 α des capacités à

processer les ARNs (Figure 38). Bien qu'il ait été montré *in vitro* que la région C-terminale de PGC-1 α participe à l'épissage d'ARN messagers pour réguler l'expression de gènes (Monsalve et al., 2000), sa contribution *in vitro* à l'expression de gènes cibles nécessite plus d'investigation. La partie C-terminale contient aussi deux motifs dont la fonction est peu connue mais qui sont très bien conservés dans les trois membres de la famille PGC-1. Le premier est un tetra-peptides DHDY, identifié comme site fixation pour la protéine HCF (Host Cell Factor). HCF peut agir comme un co-activateur pour réguler l'expression de gènes lors du cycle cellulaire et peut également augmenter l'activité transcriptionnelle des PGC-1 (Lin et al., 2002a). Finalement, des sites d'interactions avec d'autres facteurs de transcription ont également été identifiés dans la partie C-terminale des co-activateurs PGC-1, c'est le cas MEF2C, YY1 (yin yang-1), FOXO1 (Cunningham et al., 2007; Michael et al., 2001; Puigserver et al., 2003), ainsi que qu'avec des co-régulateurs comme BAF60a (BRG1-associated factor 60a) (Li et al., 2008).

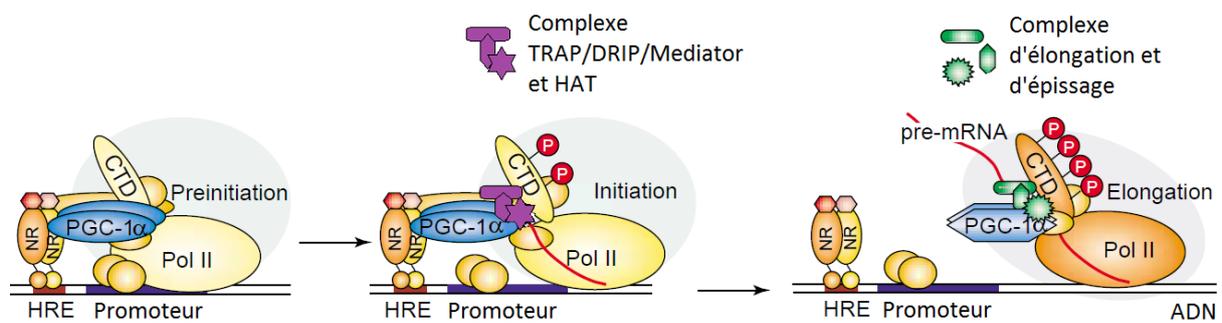


Figure 38 : Mécanisme d'action de PGC-1 α dans la synthèse d'ARNm

Une fois recruté par un récepteur nucléaire (NR), PGC-1 α change de conformation pour se lier à des coactivateurs dotés d'une activité histone acétyltransférase (HAT) tels que SRC-1 ou CBP/p300. PGC-1 α s'associe également par son extrémité N-terminale à la sous-unité Pol II de l'ARN polymérase II, impliquée dans la pré-initiation de la transcription, et par son extrémité C-terminale au complexe TRAP/DRIP/Mediator. Le domaine C-terminal de Pol II (CTD) est ensuite phosphorylé et se dissocie des partenaires du complexe d'initiation. Une nouvelle série de protéines, incluant les protéines de la machinerie d'élongation et d'épissage, se rallie à la forme activée de Pol II. PGC-1 α s'associe à ce nouveau complexe d'élongation par son extrémité C-terminale. Enfin, PGC-1 α se dissocie du facteur de transcription ou récepteur nucléaire et progresse avec le complexe d'élongation et d'épissage le long de l'ARNm pour participer à l'épissage du pré-ARNm. (Adapté de (Knutti and Kralli, 2001))

Plus récemment, des isoformes tronquées de PGC-1 α ont été identifiées et appelées NT-PGC-1 α (Chang et al., 2012; Zhang et al., 2009) et PGC-1 α 4. Ces nouvelles isoformes sont fonctionnelles et formées de la partie N-terminale de PGC-1 α , il leur manque donc les motifs permettant l'épissage des ARNs. Cependant, ils sont toujours capables d'interagir avec différents facteurs de transcription et ainsi entrainer la transcription de leurs gènes cibles.

2. Régulation de l'activité de PGC-1 α

Les niveaux d'expression des membres de la famille PGC-1 sont régulés en réponse à de nombreux stimuli et peuvent varier en fonction du tissu ou de la situation, même s'il existe un schéma commun.

Ces stimuli peuvent être des signaux environnementaux ou physiologiques qui entraînent des régulations transcriptionnelles ou des modifications post-traductionnelles (Figure 39). C'est ce qui va être présenté dans cette partie, en se focalisant plus sur PGC-1 α dont la régulation a été le plus étudiée.

Parmi les facteurs environnementaux qui régulent les mécanismes transcriptionnels on retrouve la température (Figure 39a). En effet, PGC-1 α a été découvert en premier dans le tissu adipeux brun et le muscle en réponse à l'exposition au froid. Dans le tissu adipeux brun par exemple, une importante exposition au froid induit l'expression de PGC-1 α par le système nerveux sympathique par l'intermédiaire du récepteur β 3 adrénergique. L'activation de ce récepteur déclenche la voie de signalisation de l'AMPc et l'activation de la PKA (protéine kinase A) dont une des cibles la mieux caractérisée est CREB. Comme nous l'avons vu précédemment, PGC-1 α possède un site de fixation pour CREB (C-AMP Response Element-binding protein) qui une fois activé entraîne l'expression de PGC-1 α de manière spécifique (Boss et al., 1999; Gómez-Ambrosi et al., 2001; Puigserver et al., 1998a).

Dans le muscle, l'expression de PGC-1 est également induite après un exercice (Figure 39a). De nombreuses voies de signalisations sont impliquées durant ce processus. En effet, il a été montré que l'expression de PGC-1 α répond à la signalisation calcique médiée par l'activation de la CaMKIV (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV) et la calcineurine A. Cette dernière est capable d'interagir et d'activer le facteur de transcription myogénique MEF2C qui se fixe sur le gène PGC-1 α et entraîne sa transcription (Akimoto et al., 2004; Handschin et al., 2003). De façon intéressante, MEF2C est connu pour être une cible de PGC-1 α , ce qui crée une boucle d'autorégulation par laquelle PGC-1 α augmente sa propre expression (Lin et al., 2002b). D'un autre côté, une des cibles de la protéine CaMKIV est le facteur de transcription CREB qui, comme dans le tissu adipeux brun, se fixe sur PGC-1 α et entraîne son expression (Akimoto et al., 2004; Wu et al., 2002a).

Un autre mécanisme connu pour réguler l'expression de PGC-1 α dans le muscle, après un exercice, implique l'activation de la protéine p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase ; Figure 39a). Cette kinase est capable d'activer le facteur de transcription MEF2C qui comme vu précédemment entraîne l'expression de PGC-1 α par fixation en amont du promoteur de PGC-1 α (Knutti et al., 2001; Zhao et al., 1999). p38 MAPK active également le facteur de transcription ATF2 (activating transcription factor 2) qui permet la transcription de PGC-1 α en se fixant sur l'élément de réponse à CREB présent en amont du promoteur de PGC-1 α (Akimoto et al., 2005).

PGC-1 α est très sensible au statut énergétique cellulaire, il est donc finement régulé par des senseurs de stress comme la protéine AMPK qui est un senseur crucial du statut énergétique de la cellule et qui devient actif quand le ratio AMP/ATP est élevé ce qui déclenche un grand nombre de réactions

cataboliques pour augmenter le niveau cellulaire d'ATP (Figure 39b). AMPK est activée dans le muscle durant un exercice ce qui active la fonction et la biogénèse mitochondriale. Il a été montré que cette activation mitochondriale médiée par l'AMPK requière l'activité de PGC-1 α (Jørgensen et al., 2005; Knutti et al., 2001). De plus, il a été montré que des cellules musculaires traitées avec de l'AICAR, un composé chimique activant l'AMPK, ont une expression de PGC-1 α augmentée (Suwa et al., 2003). Il a également été montré que l'AMPK phosphoryle directement PGC-1 α *in vitro* et *in vivo*. Ces phosphorylations de PGC-1 α se font sur la thréonine 177 et la serine 538 et peuvent moduler la capacité de PGC-1 α à se lier avec les facteurs de transcription mais également affecter la fixation ou la fonction d'autres cofacteurs dans le complexe formé par PGC-1 α (Jäger et al., 2007).

Le jeûne est un autre signal environnemental connu pour réguler l'expression de PGC-1 α (Figure 39a). En effet dans le foie, l'expression de PGC-1 α est augmentée en réponse au glucagon, une hormone pancréatique qui induit l'activation d'AMPK et CREB (Herzig et al., 2001). Cette induction de PGC-1 α dans le foie lors du jeûne conduit à une augmentation de l'expression des gènes de la gluconéogénèse afin de favoriser la production de glucose hépatique et maintenir l'homéostasie du glucose (Yoon et al., 2001) via l'association de PGC-1 α avec des facteurs de transcription comme HNF4 α (Rhee et al., 2003) ou FOXO1 (Puigserver et al., 2003). Comme dans le tissu adipeux brun et le muscle, l'activation de p38 MAPK dans le foie par le jeûne augmente la transcription de PGC-1 α et induit la gluconéogénèse (Cao et al., 2005).

L'activité transcriptionnelle de PGC-1 α peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles qui affectent de façon positive ou négative sa capacité à recruter des complexes capables de remodeler la chromatine et activer la transcription des gènes (Figure 39b). Ces modifications post-traductionnelles qui sont des phosphorylations, acétylations, méthylation, ubiquitinations, sont très importantes car elles sont capables de réguler l'intensité de la réponse médiée par PGC-1 α et également de déterminer avec quel facteur de transcription ou co-régulateur PGC-1 α va interagir et donc quels gènes spécifiques seront exprimés. PGC-1 α est phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines à différents endroits par plusieurs kinases dont les mieux caractérisés sont p38 AMPK (Fan et al., 2004; Knutti et al., 2001; Puigserver et al., 2001), AKT (Li et al., 2007), AMPK (Jäger et al., 2007), S6 kinase (Ribosomal protein S6 kinase) (Lustig et al., 2011), GSK3 β (Olson et al., 2008). Ces phosphorylations peuvent être activatrices, c'est le cas de p38 MAPK qui stabilise la protéine (Knutti et al., 2001) et AMPK qui active PGC-1 α (Jäger et al., 2007), ou inhibitrices comme Akt qui inhibe l'activité de PGC-1 α (Li et al., 2007), GSK3 β qui augmente la dégradation par le protéasome de PGC-1 α (Olson et al., 2008) et S6 kinase qui empêche l'interaction de PGC-1 α avec HNF4 α (Lustig et al., 2011). PGC-1 α est également régulé sur les résidus lysines par désacétylation par SIRT1 (sirtuin 1) ce qui active PGC-1 α (Gerhart-Hines et al., 2007; Rodgers et al., 2005) ou par acétylation par GCN5

(lysine acetyltransferase 2A) ce qui inactive PGC-1 α (Lerin et al., 2006). PGC-1 α peut aussi être méthylé sur les résidus arginines en position C-terminale par PRMT1 (proteine arginine méthyltransferase 1) ce qui augmente son activité (Teyssier et al., 2005). Ces différentes modifications post-traductionnelles dirigent l'action de PGC-1 α vers des gènes cibles différents.

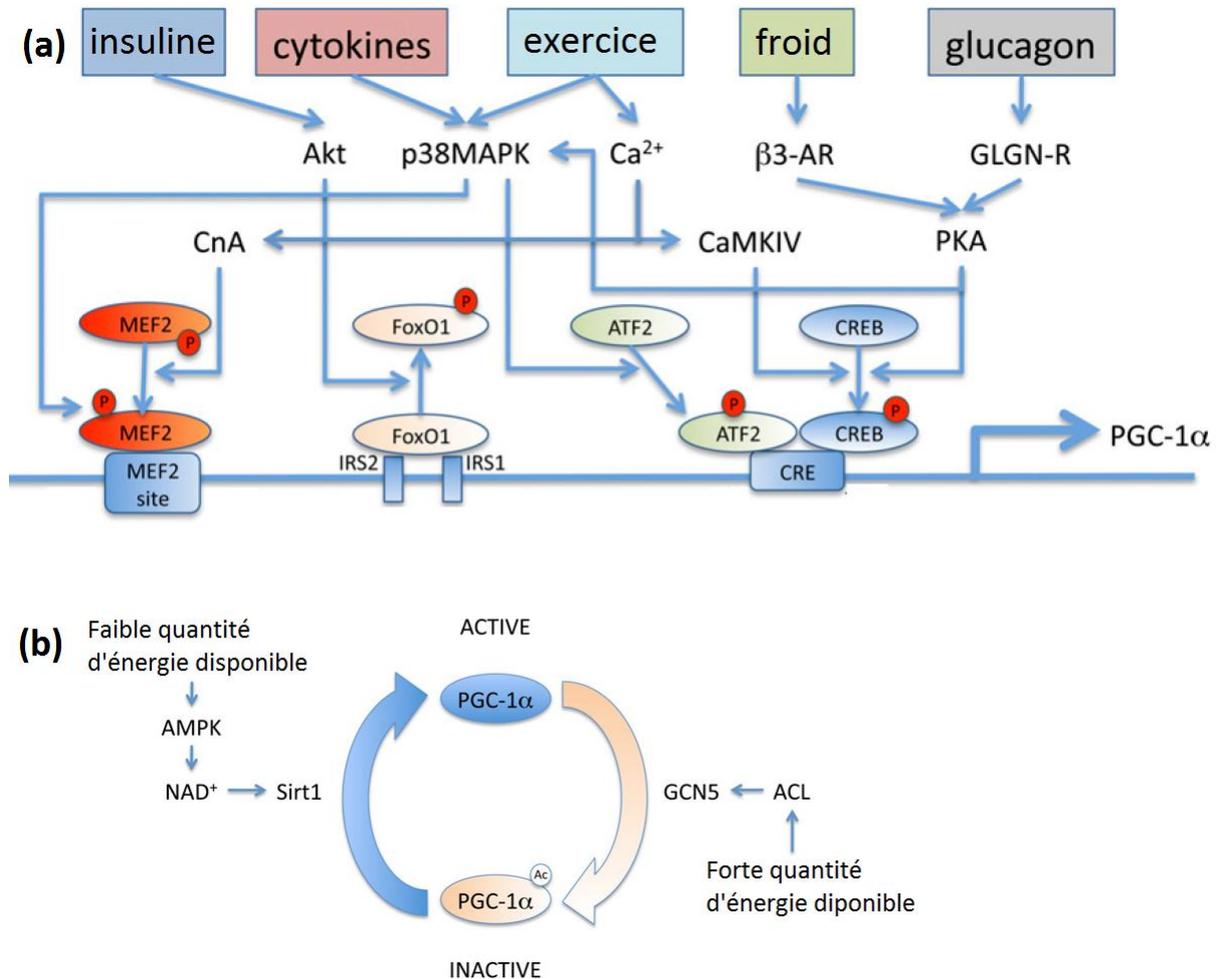


Figure 39 : Mécanismes de régulation de l'expression (a) et de l'activité (b) de PGC-1 α (Adapté de (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011))

3. Rôles de PGC-1 α dans le métabolisme cellulaire

PGC-1 α est donc un co-activateur transcriptionnel très polyvalent capable de co-activer de nombreux facteurs de transcription. Etant donné que PGC-1 α se lie avec différents partenaires, il est capable de réguler des programmes biologiques variés et distincts tels que la thermogenèse adaptative dans le tissu adipeux, la conversion des fibres musculaires dans le muscle squelettique ou encore le développement du cœur. PGC-1 α joue également un rôle central dans le métabolisme cellulaire, en particulier dans le métabolisme oxydatif mitochondrial, le métabolisme du glucose et également le métabolisme des lipides. Ce n'est donc pas surprenant qu'une altération des niveaux d'expression de

PGC-1 α soit associée avec de nombreux états pathologiques dans différents tissus. En effet, alors que son implication est bien établie dans le diabète, le neurodégénérescence et les maladies cardiovasculaires, il devient évident que PGC-1 α joue un rôle majeur dans le cancer.

3.1. PGC-1 α dans la régulation du métabolisme oxydatif mitochondrial

Une des principales fonctions de PGC-1 α est le contrôle du métabolisme énergétique en augmentant le métabolisme oxydatif par l'augmentation d'une part de la biogénèse mitochondriale et d'autre part par l'augmentation de la phosphorylation oxydative (Figure 21 et 40).

3.1.1. PGC-1 α et biogénèse mitochondriale

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence l'implication de PGC-1 α dans la biogénèse mitochondriale. En effet, la surexpression de PGC-1 α dans plusieurs lignées cellulaires différentes, tels que des adipocytes, des cellules musculaires, des myocytes cardiaques et des ostéoblastes, entraîne une augmentation de la quantité d'ADN mitochondriale (Lehman et al., 2000; Puigserver et al., 1998b; Russell et al., 2004; Schreiber et al., 2004b; Wu et al., 1999). La surexpression de PGC-1 α *in vivo* dans des myocytes cardiaques murins provoque une prolifération mitochondriale massive entraînant la mort (Lehman et al., 2000).

D'un point de vue moléculaire, PGC-1 α initie la biogénèse mitochondriale en activant des facteurs de transcription qui régulent l'expression de protéines mitochondriales encodées par l'ADN nucléaire (Anderson and Prolla, 2009). L'ADN mitochondrial code pour les sous unités protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale et des gènes nécessaires à la synthèse protéique mitochondriale. Toutes les autres protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire. Par conséquent, le processus de biogénèse mitochondriale nécessite une coordination entre ces deux génomes. Cette coordination est régulée principalement par PGC-1 α qui active des facteurs de transcriptions. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de certains gènes mitochondriaux codés par le noyau (Kelly and Scarpulla, 2004; Puigserver and Spiegelman, 2003). PGC-1 α interagit physiquement avec ces facteurs de transcription dont NRF1 et NRF2 (Scarpulla, 2006, 2008a; Schreiber et al., 2003) et coactive leur activité transcriptionnelle (Wu et al., 1999). Ces derniers, une fois activés par PGC-1 α , se lient à la région promotrice d'un large panel de gènes mitochondriaux codés dans le noyau tel que la β -ATP synthase, le cytochrome c, les sous unités du cytochrome c oxidase, TFAM (Rebelo et al., 2011; Wu et al., 1999), TFB1M, TFB2M et stimulent leur expression (Scarpulla, 2008b). Il est intéressant de noter que NRFs induit TFAM, un activateur transcriptionnel, qui transloque dans la mitochondrie et joue un rôle essentiel dans la réplication, la transcription et le maintien de l'ADN mitochondrial (Clayton, 1992; Parisi and Clayton, 1991; Virbasius and Scarpulla, 1994) (Figure 21 et 40). En régulant le niveau d'expression de TFAM, PGC-1 α est donc capable de jouer sur l'expression de protéines codées par

l'ADN mitochondrial. Il a également été montré que l'interaction de PGC-1 α avec ERR α est impliquée dans la biogénèse mitochondriale (Figure 21 et 40). Les autres protéines mitochondriales codées par l'ADN nucléaire sont importantes dans la mitochondrie car elles sont capables de s'associer avec les protéines codées par l'ADN mitochondrial, et ainsi former les complexes nécessaires à la phosphorylation oxydative mitochondriale. De ce fait, PGC-1 α , en stimulant simultanément des gènes mitochondriaux codés par les deux génomes, contribue à la biogénèse mitochondriale.

3.1.2. PGC-1 α et phosphorylation oxydative

Plusieurs études ont également montré que la liaison et l'activation de NRF1, NRF2 (Huss and Kelly, 2004; Wu et al., 1999) et ERR α (Huss and Kelly, 2004; Huss et al., 2004; Mootha et al., 2004; Villena et al., 2007) par PGC-1 α , augmente l'OXPLOS. En effet, il a été montré que la surexpression de PGC-1 α augmente les niveaux d'expressions des protéines de la chaîne respiratoire tels que l'ATP synthase, le cytochrome c, le complexe IV et le complexe II 56 et 57 ; wang 2004 (Lehman et al., 2000; Lin et al., 2002b; Puigserver et al., 1998b; Schreiber et al., 2004b; Wu et al., 1999) (Figure 21 et 40).

3.1.3. PGC-1 α et β -oxydation

L'induction de PGC-1 α est corrélée à des situations physiologiques tels que le froid, l'exercice physique prolongé ou le jeûne dans respectivement, le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie (Figure 39). Dans ces situations, les acides gras deviennent le substrat énergétique préférentiel des cellules. De façon logique, plusieurs études ont mis en évidence que PGC-1 α contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras (Leone et al., 2005) via PPAR α (Dobrzyn et al., 2010). PGC-1 α induit l'expression des transporteurs des acides gras que sont CD36 et CPT1 qui permettent de faire rentrer, respectivement, les acides gras à l'intérieur de la cellule puis à l'intérieur de la mitochondrie où ils seront oxydés (cf. « La β -oxydation »). De plus, PGC-1 α induit également l'expression de plusieurs enzymes de la FAS ce qui augmente le catabolisme des acides gras (Calvo et al., 2008; Vega et al., 2000).

Deux facteurs de transcription ont été identifiés comme des partenaires de PGC-1 α , au niveau de la régulation de la β -oxydation, il s'agit de PPAR α (Lehman et al., 2000; Napal et al., 2005; Vega et al., 2000) et ERR α (Huss et al., 2002, 2004; Schreiber et al., 2003) (Figure 21 et 40).

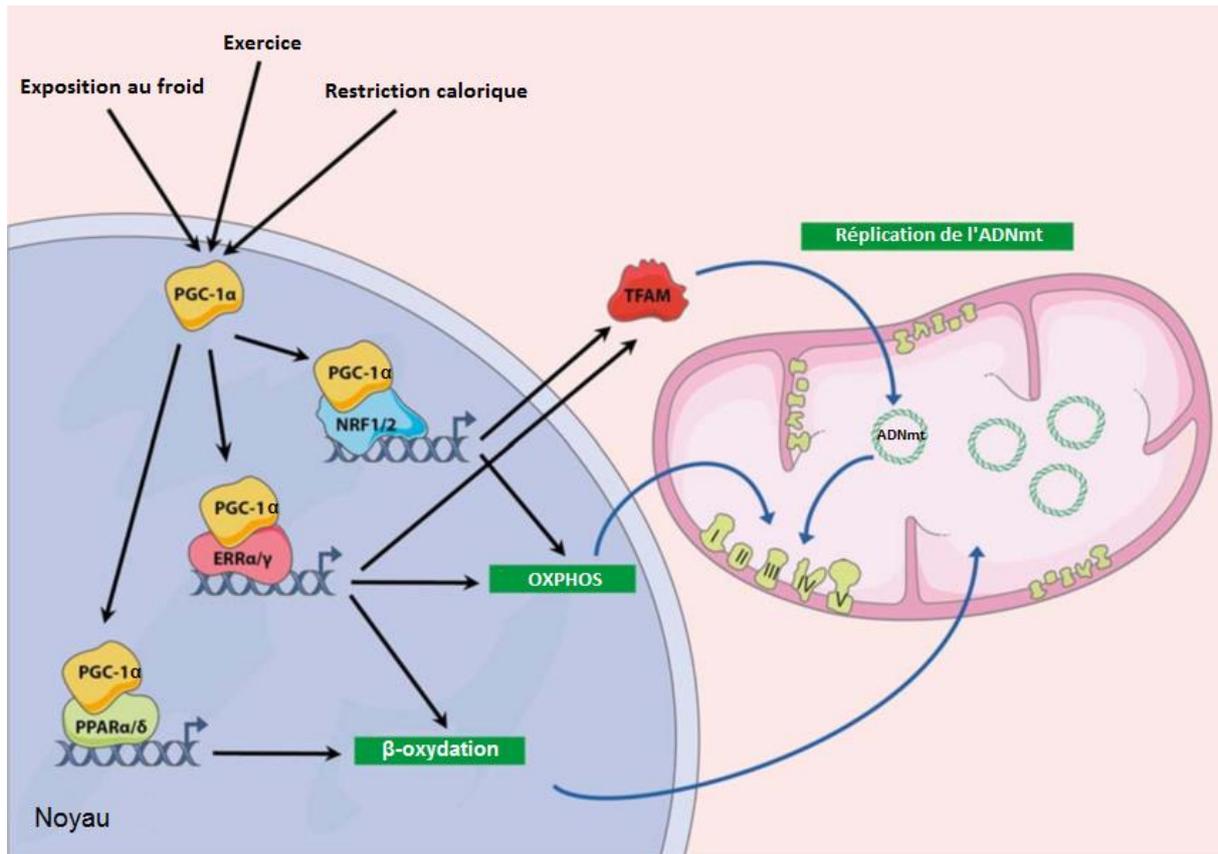


Figure 40 : Implication de PGC-1 α dans la biogénèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et la β -oxydation. (Adapté de (Zamora and Villena, 2014))

3.1.4. PGC-1 α et métabolisme du glucose

PGC-1 α est également impliqué dans la régulation du métabolisme du glucose. En effet, dans le muscle squelettique l'induction de PGC-1 α active l'expression du transporteur de glucose GLUT4, via l'activation du facteur de transcription MEF2C, ce qui augmente l'absorption de glucose dans ces cellules (Michael et al., 2001).

Cette augmentation de la concentration intracellulaire de glucose est couplée à une diminution de la glycolyse, et une augmentation du stockage sous forme de glycogène (Wende et al., 2007). En effet, l'induction de PGC-1 α entraîne l'expression de la PDK4, via ERR α . Cette enzyme inhibe l'oxydation du glucose via l'inhibition de la PDH et favorise donc la synthèse de glycogène (Safdar et al., 2011; Wende et al., 2005).

3.1.5. PGC-1 α et ROS

En plus des voies métaboliques, PGC-1 α est impliqué dans la régulation des ROS produits en majorité par la chaîne respiratoire mitochondriale. L'excès de stress oxydatif peut conduire à un stress génotoxique et à la mort cellulaire. De ce fait, les cellules ont développé des mécanismes de défenses contre ces espèces qui peuvent être toxiques. PGC-1 α est impliqué dans plusieurs mécanismes visant

à réduire le stress oxydatif. En effet, PGC-1 α induit l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la détoxification des ROS, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathione peroxydase (GPx) (Chen et al., 2011; St-Pierre et al., 2006; Valle et al., 2005). La capacité de PGC-1 α à induire ces enzymes antioxydantes est indispensable pour la protection contre les dommages et la mort cellulaire induits par les ROS (St-Pierre et al., 2006).

4. Rôle de PGC-1 α dans le cancer

PGC-1 α est un coactivateur de transcription qui influence plusieurs voies métaboliques majeures. De ce fait, l'expression anormale de PGC-1 α est associée avec plusieurs maladies chroniques. Récemment PGC-1 α a été impliqué dans le développement, la survie et l'agressivité de plusieurs cancers (Bhalla et al., 2011; LeBleu et al., 2014; McGuirk et al., 2013; Shiota et al., 2010; Taguchi et al., 2014; Torrano et al., 2016; Vazquez et al., 2013). PGC-1 α agit comme un senseur de stress dans les cellules cancéreuses et son expression peut être modulée par une déprivation en nutriments, des dommages oxydatifs et des traitements chimiothérapeutiques. De façon similaire à ses fonctions biologiques normales, PGC-1 α influence donc, dans les cellules tumorales, le métabolisme oxydatif mitochondrial, le métabolisme des acides gras, le métabolisme du glucose et les systèmes de défense contre les ROS en interagissant avec des facteurs de transcription spécifiques (Bhalla et al., 2011; McGuirk et al., 2013; Sancho et al., 2015; Torrano et al., 2016; Vazquez et al., 2013), ce qui explique son implication dans le développement et la survie des cellules cancéreuses et la formation de métastases. De plus, il a été observé, dans plusieurs types de cancers, que PGC-1 α est régulé par différents oncogènes et voies de signalisation oncogéniques (Aquilano et al., 2013; Deblois et al., 2013; Haq et al., 2013; LaGory et al., 2015; Peters et al., 2012; Sancho et al., 2015).

4.1. PGC-1 α dans le mélanome

Des études récentes ont montré que la plupart des mélanomes contiennent deux sous populations de cellules exprimant différents niveaux de PGC-1 α : une sous population avec une forte expression de PGC-1 α et une sous population avec une très faible expression de PGC-1 α (Figure 41a) (Bogunovic et al., 2009; Riker et al., 2008; Vazquez et al., 2013). De ce fait, ces deux populations présentent des métabolismes et des phénotypes très différents. En effet, les cellules tumorales de mélanomes surexprimant PGC-1 α ont, de façon logique, un métabolisme oxydatif mitochondrial très élevé et une grande capacité à détoxifier les ROS, ce qui les rendent dépendantes de l'O₂PHOS et résistantes au stress oxydatif (Luo et al., 2016a; Vazquez et al., 2013). D'un point de vue phénotypique, la surexpression de PGC-1 α confère à ces cellules un important pouvoir prolifératif et de survie mais, à travers la régulation en parallèle d'autres programmes transcriptionnels, PGC-1 α supprime le pouvoir d'invasion de ces cellules de mélanome (Figure 41a). Luo et al. ont montré que le mécanisme par lequel

PGC-1 α supprime ce programme pro-métastatique met en jeu la protéine inhibitrice ID2 (Inhibitor of DNA binding) et le facteur de transcription TCF4 (Luo et al., 2016a). PGC-1 α induit de façon directe la transcription de ID2 qui va lier et inactiver TCF4 empêchant sa fixation sur les promoteurs de ses gènes cibles. L'inactivation de TCF4 entraîne la baisse de l'expression des gènes liés à la formation de métastases, dont les intégrines, connues pour influencer l'invasion et la dissémination métastatique (Figure 41b). A contrario, les cellules de mélanome exprimant très peu PGC-1 α contiennent peu de mitochondries, sont très dépendantes de la glycolyse pour survivre et plus sensibles à l'apoptose induite par les ROS (Luo et al., 2016a; Piskounova et al., 2015; Vazquez et al., 2013). Cependant, cette sous population de mélanocytes tumoraux exprimant peu PGC-1 α a une plus forte expression du programme pro-métastatique incluant les intégrines, le TGF β (transforming growth factor β) et Wnt (Figure 41b). Au niveau phénotypique, la faible expression de PGC-1 α se traduit par une faible prolifération des cellules de mélanome et par une forte capacité à former des métastases (Figure 41a). Une fois installées au niveau du site métastatique, ces cellules sont capables d'augmenter leur expression de PGC-1 α pour faciliter leur croissance (Figure 41a) (Luo et al., 2016a; Vazquez et al., 2013).

L'expression de PGC-1 α , dans ces deux sous populations de mélanomes est régulée par le facteur de transcription oncogénique MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) (Figure 41b) (Haq et al., 2013; Ronai, 2013; Vazquez et al., 2013).

Etant donné les fonctions cytoprotectrices de PGC-1 α , ce n'est pas étonnant qu'il soit impliqué dans la réponse aux traitements anticancéreux. Dans le mélanome, l'induction de PGC-1 α contribue à la chimiorésistance des cellules de mélanomes aux traitements anti-mélanomes via l'augmentation du métabolisme mitochondrial oxydatif (Haq et al., 2013). La déplétion de PGC-1 α ou l'inhibition de la chaîne respiratoire, dans les cellules de mélanome qui exprime fortement PGC-1 α , augmentent l'efficacité des chimiothérapies anti-mélanomes via l'augmentation du niveau de ROS et de l'apoptose (Cao et al., 2015; Haq et al., 2013; Luo et al., 2016b; Roesch et al., 2013; Vazquez et al., 2013; Yu et al., 2015b; Zhang et al., 2016).

En conclusion, PGC-1 α joue un double rôle dans le mélanome en agissant à la jonction entre la survie et la dissémination métastatique (Hoek et al., 2008).

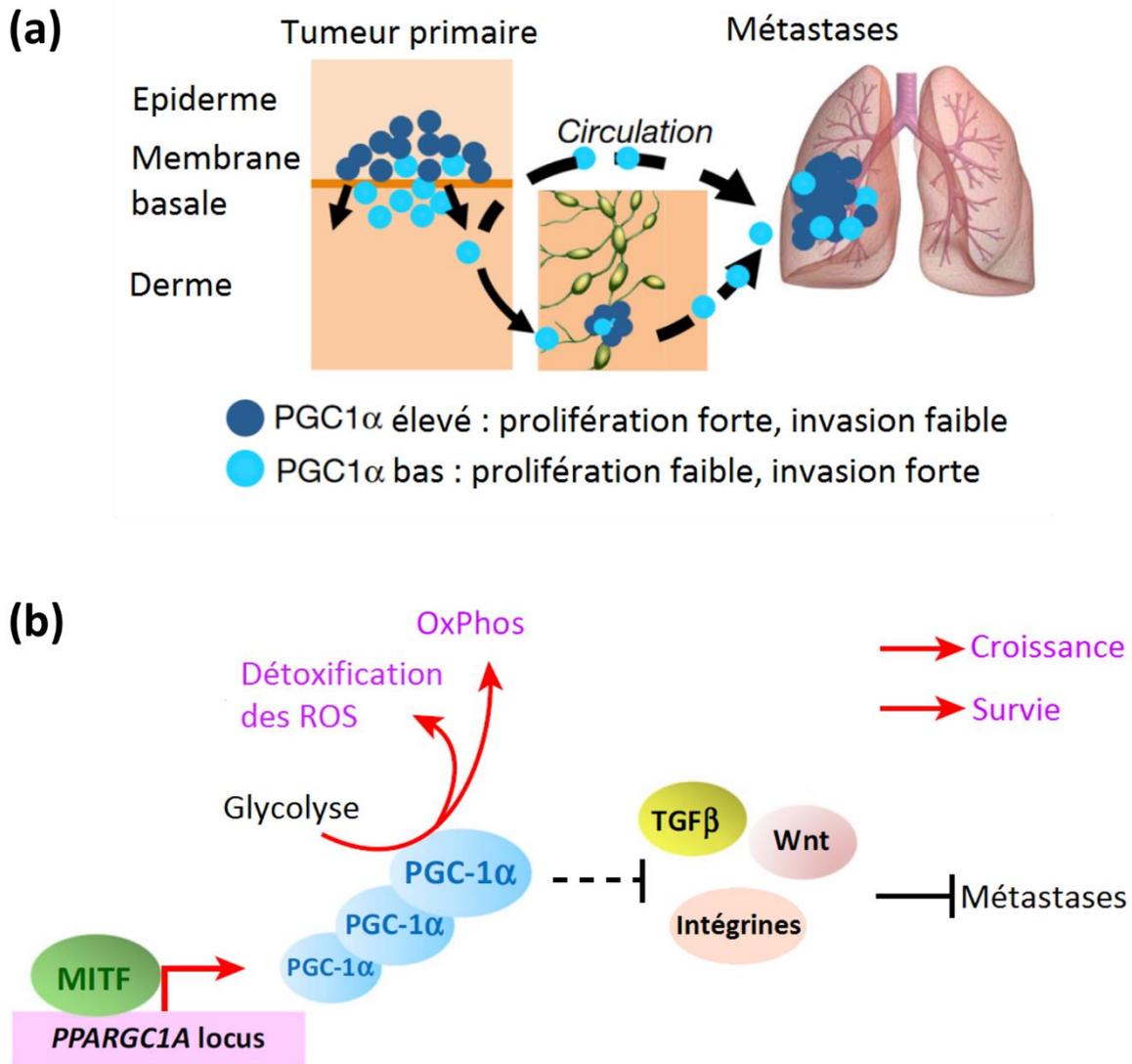


Figure 41 : Implications de PGC-1 α dans le mélanome.

(a) Effets du niveau d'expression de PGC-1 α sur le phénotype des cellules tumorales de mélanome
(b) Mécanisme de régulation de PGC-1 α et ses conséquences (Adapté de (Luo et al., 2016c))

4.2. PGC-1 α dans le cancer du sein

Dans le cancer du sein, il a été montré que PGC-1 α stimule certains récepteurs nucléaires et facteurs de transcription, tels que PPAR α , ERR α , NRF1 et NRF2, conduisant à l'augmentation de la biogénèse mitochondriale et de l'OxPhos pour générer de grandes quantités d'ATP nécessaire à la croissance tumorale (Figure 42).

Cependant, même si la respiration mitochondriale est considérée comme la fonction biologique principale de PGC-1 α , le rôle crucial de PGC-1 α dans d'autres voies métaboliques, notamment, la glycolyse, la glutaminolyse, la régulation de l'oxydation des acides gras et la détoxification, a été mis en évidence récemment dans le sein (Chen et al., 2007a; Peters et al., 2012; Vega et al., 2000).

Dans des cellules cancéreuses mammaires, le complexe PGC-1 α /ERR α module, de façon directe, l'expression d'enzymes du métabolisme de la glutamine, qui permettent d'augmenter l'absorption de glutamine et donc d'augmenter le flux du cycle de Krebs, par les cellules cancéreuses mammaires (McGuirk et al., 2013). Cet axe PGC-1 α /ERR α coactive l'expression de gènes de la lipogenèse (McGuirk et al., 2013) (Figure 42). Donc, les métabolites intermédiaires, issus du catabolisme de la glutamine, vont principalement s'engager dans la biosynthèse *de novo* des acides gras. La surexpression de PGC-1 α , et donc l'activation de ERR α , confère aux cellules cancéreuses mammaires des avantages de croissance et de prolifération, même quand les nutriments sont limités et/ou en condition d'hypoxie (Figure 42). Ces observations sont corrélées par des données cliniques qui montrent que la surexpression de PGC-1 α et de ses gènes cibles de la glutaminolyse sont associés avec un mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du sein.

En plus de ses effets tumoraux intrinsèques sur le métabolisme, PGC-1 α est également impliqué dans la mise en place du microenvironnement tumoral, principalement par la régulation de l'angiogenèse, au sein des tumeurs mammaires (Klimcakova et al., 2012). PGC-1 α permet la néo-vascularisation et donc l'augmentation de nutriments disponibles pour les cellules tumorales mammaires entraînant par conséquent la croissance tumorale. Le mécanisme par lequel PGC-1 α induit l'angiogenèse tumorale n'est pas encore totalement élucidé mais semblerait passer par la régulation de VEGF (vascular endothelial growth factor) indépendamment de HIF-1 (Arany et al., 2008; Klimcakova et al., 2012).

Dans les cancers, les métastases représentent le caractère ultime et fatal des tumeurs et impliquent différents mécanismes telles que l'évasion de la matrice, l'intra et l'extravasation des vaisseaux et la capacité de s'implanter et croître dans un microenvironnement distant du site tumoral primaire. Pour pouvoir métastaser tout en survivant, les cellules tumorales doivent réorganiser leur fonctionnement et doivent passer d'un état de prolifération rapide à celui de croissance lente mais très invasive (Hoek et al., 2008). Les voies et les besoins métaboliques permettant aux cellules tumorales de switcher entre prolifération et migration/invasion dans le but de disséminer sont encore largement inconnus. De façon intéressante, une étude récente suggère que PGC-1 α pourrait être impliqué dans ce switch métastatique (LeBleu et al., 2014). Cette étude a montré que les cellules tumorales mammaires circulantes présentent une augmentation de l'expression de PGC-1 α et de la biogénèse mitochondriale, se traduisant par la formation de métastases. De plus, les auteurs ont montré que l'inhibition de PGC-1 α , dans ces cellules, compromet la production d'ATP, réduit le remodelage du cytosquelette d'actine, baisse l'intravasation et l'extravasation et diminue la survie, donc inhibent toutes les étapes nécessaires à la formation de métastases (LeBleu et al., 2014). Les cellules cancéreuses circulantes dépendent donc de PGC-1 α pour maintenir leur activité mitochondriale durant leur cheminement vers leurs organes cibles. Les analyses cliniques de cette étude mettent également

en évidence que PGC-1 α est enrichi dans les tumeurs mammaires de patients avec des métastases osseuses, et illustrent également la corrélation négative entre l'expression de PGC-1 α et la survie des patients (LeBleu et al., 2014; McGuirk et al., 2013). Même si cette étude n'identifie pas le facteur de transcription cible de PGC-1 α dans les cellules cancéreuses circulantes, ces résultats montrent que PGC-1 α est essentiel pour la formation de métastases. Le rôle de PGC-1 α dans la flexibilité bioénergétique permettant aux cellules tumorales mammaires de métastaser a été confirmé par l'étude d'Andrzejewski et al. et soulève également l'importance du rôle de PGC-1 α dans la résistance aux traitements pour ce type de cancer (Andrzejewski et al., 2017).

En effet, l'augmentation de plusieurs voies métaboliques et de la détoxification des ROS par PGC-1 α dans le cancer du sein ne confère pas que des avantages prolifératifs mais permet également une adaptation métabolique à certaines thérapies du cancer du sein (Deblois et al., 2016). Et l'utilisation d'antagonistes de ERR α , entrants en compétition avec ce dernier dans le but d'empêcher la reprogrammation métabolique médiée par PGC-1 α , resensibilise les cellules tumorales mammaires à ces molécules thérapeutiques (Deblois et al., 2016). Une autre étude montre que les capacités bioénergétiques médiées par PGC-1 α aident les cellules tumorales mammaires à faire face aux molécules perturbants l'énergie cellulaire, telle que la metformine, une classe émergente de molécules anticancéreuses (Andrzejewski et al., 2017). Au contraire, il a été montré que les cellules tumorales mammaires surexprimant PGC-1 α deviennent dépendantes au cycle des folates, indispensable à la synthèse des nucléotides et donc à la prolifération tumorale, par conséquent ces cellules sont plus vulnérables aux antifolates, comme le méthotrexate (Audet-Walsh et al., 2016) (Figure 42).

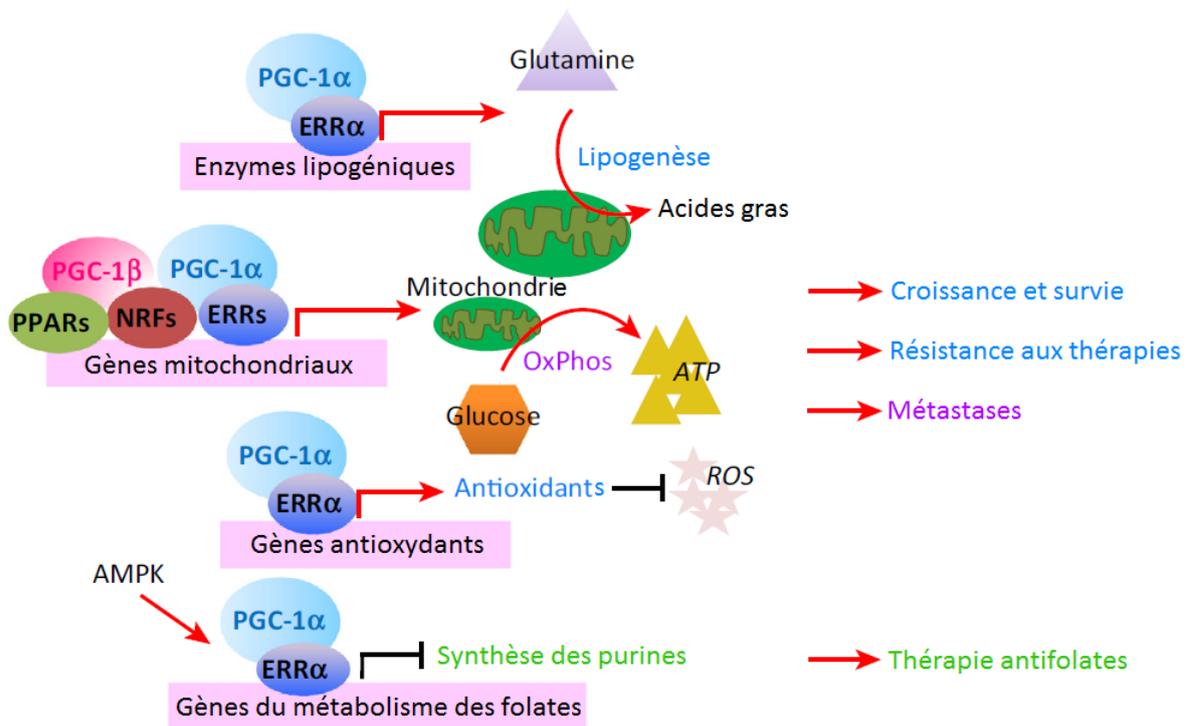


Figure 42 : Rôles de PGC-1 α dans le cancer du sein (Adapté de (Luo et al., 2016c))

4.3. PGC-1 α dans le cancer du pancréas

L'oncogène c-MYC entraîne une reprogrammation métabolique qui est critique pour la prolifération et la survie des cellules tumorales. Récemment, il a été montré dans l'adénocarcinome pancréatique que c-MYC est un régulateur direct de PGC-1 α (Sancho et al., 2015) (Figure 43). En effet, c-MYC se lie sur le promoteur de PGC-1 α et inhibe la transcription de ce dernier. De ce fait, cette étude a montré que le ratio c-MYC/PGC-1 α est un régulateur majeur du phénotype métabolique des cellules d'adénocarcinome pancréatique (Sancho et al., 2015). En effet, une expression élevée de PGC-1 α est retrouvée dans les cellules souches cancéreuses (CSC) pancréatiques, car c-MYC n'y est pas exprimé. De plus, dans ces CSC pancréatiques, la forte expression de PGC-1 α est indispensable pour maintenir la respiration mitochondriale, les caractéristiques de cellules souches et la tumorigénicité de ces CSC pancréatiques. Cependant, cette surexpression de PGC-1 α les rend, d'une part, plus vulnérables à la metformine que les cellules tumorales pancréatiques différenciées et d'autre part, incapables d'activer la glycolyse en cas de stress métabolique à cause de leur très faible expression de c-MYC (Sancho et al., 2015) (Figure 43). A contrario, les cellules tumorales pancréatiques différenciées expriment fortement c-MYC et peu PGC-1 α . Durant le traitement à la metformine, une résistance se met en place et un phénotype intermédiaire émerge dans les CSC, présentant une OXPHOS réduite mais une glycolyse augmentée, qui est la conséquence de l'augmentation du ratio c-MYC/PGC-1 α . L'inhibition de C-MYC dans ces CSC intermédiaires augmente leur sensibilité à la metformine. Ces résultats

indiquent donc que la balance entre c-MYC et PGC-1 α détermine la plasticité métabolique et la sensibilité à la metformine des CSC pancréatiques (Sancho et al., 2015).

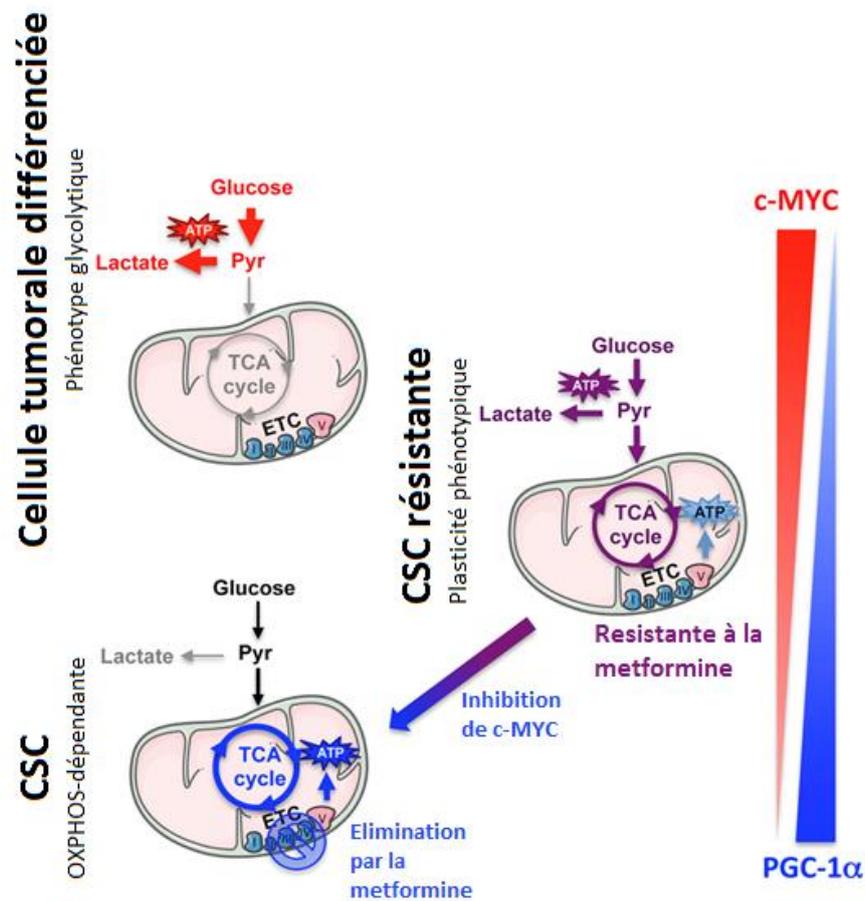


Figure 43 : Rôles de PGC-1 α dans le cancer du pancéas
 ETC : chaîne respiratoire ; TCA cycle : cycle de Krebs (Adapté de (Sancho et al., 2015))

4.4. PGC-1 α dans le cancer de la prostate

L'implication de PGC-1 α dans le cancer de la prostate est très récente et très peu d'études traitent de ce rôle et doivent donc être étoffées (Shiota et al., 2010; Tennakoon et al., 2014; Torrano et al., 2016). De ce fait, le rôle de PGC-1 α dans le CaP semble être similaire à celui du mélanome, c'est-à-dire des sous populations avec une expression différente de PGC-1 α : une sous population surexprimant PGC-1 α étant proliférative mais peu invasive et une sous population sous exprimant PGC-1 α étant très agressive.

En effet, Shiota et al. montrent que PGC-1 α favorise la croissance tumorale d'une sous population de cellules cancéreuses prostatiques dépendantes des androgènes, via l'activation du récepteur aux androgènes et donc de ses gènes cibles (Shiota et al., 2010). Il est bien connu que la dépendance aux androgènes est retrouvée dans les tumeurs prostatiques primaires naïves de tous traitements

anticancéreux (cf. « L'hormonothérapie »). De ce fait, dans la tumeur prostatique primaire, PGC-1 α interagit et active AR pour remodeler le métabolisme, en augmentant la biogénèse mitochondriale et l'oxydation du glucose et des acides gras, ce qui permet la croissance et la survie des cellules de CaP (Shiota et al., 2010) (Figure 44a). Dans les cellules de CaP dépendantes des androgènes, l'inhibition *in vitro* de PGC-1 α entraîne un arrêt du cycle cellulaire de ces cellules en phase G1 et supprime donc leur croissance (Shiota et al., 2010). De plus, dans ces cellules, l'expression de PGC-1 α est induite par la voie de signalisation en réponse aux androgènes via l'AMPK (cf. « Régulation de l'activité de PGC-1 α » et Figure 44a) (Tennakoon et al., 2014). Cette régulation positive permet de maintenir l'expression de PGC-1 α et d'augmenter son influence sur le métabolisme tumoral (Tennakoon et al., 2014).

Récemment, Torrano et al., en se basant sur une analyse bio-informatique de plusieurs banques de données du CaP, ont identifié PGC-1 α comme un suppresseur de la progression tumorale et des métastases prostatiques (Torrano et al., 2016). Cette observation a été confirmée *in vivo* grâce à une lignée tumorale prostatique indépendante des androgènes et surexprimant de façon ectopique PGC-1 α . En effet, l'injection de ces cellules dans un modèle murin diminue la progression et la formation de métastases du CaP (Torrano et al., 2016). Cet effet suppresseur de tumeurs de PGC-1 α est dû à son interaction avec ERR α et la mise en place du programme transcriptionnel catabolique découlant de cette interaction (Figure 44b) (Torrano et al., 2016). En effet, dans ces cellules l'axe PGC-1 α /ERR α induit un métabolisme catabolique, via l'augmentation de la β -oxydation et du cycle de Krebs, ce qui affaiblit l'effet Warburg et entraîne donc une agressivité tumorale plus faible (Figure 44b). De plus, cette étude montre que, chez les patients, l'expression de PGC-1 α diminue progressivement en fonction de l'augmentation du grade de la tumeur prostatique primaire et des métastases, mettant en évidence la valeur pronostique de PGC-1 α (Torrano et al., 2016).

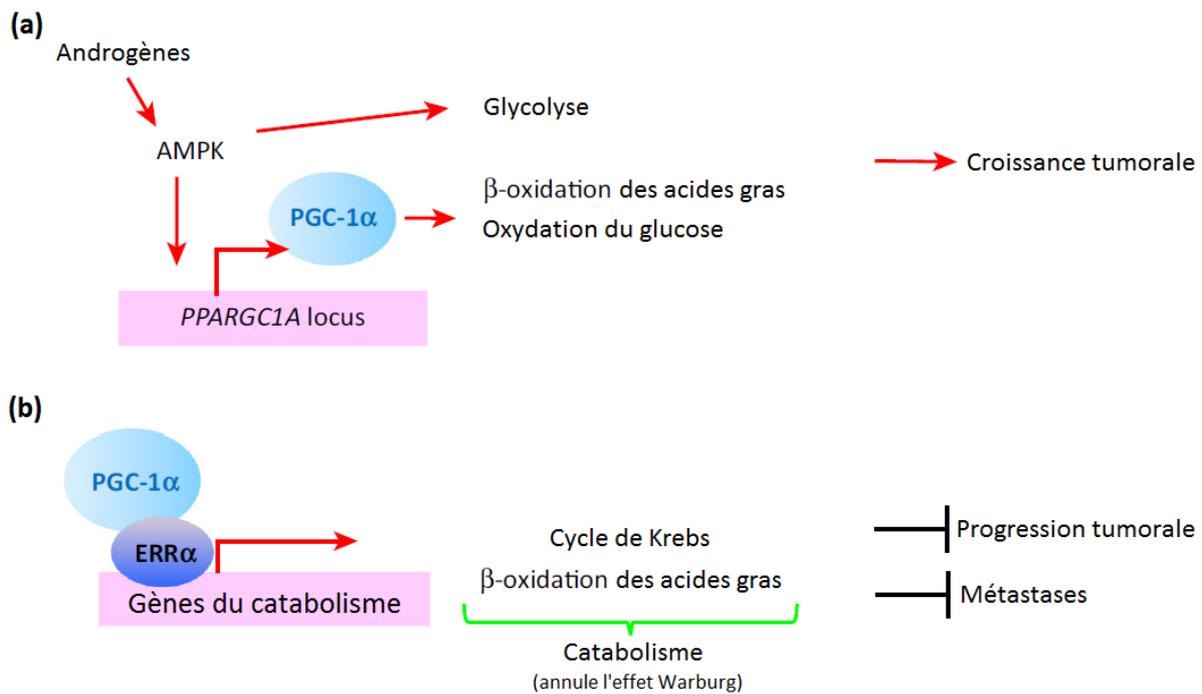


Figure 44 : Rôles de PGC-1 α dans le cancer de la prostate (Adapté de (Luo et al., 2016c))

4.5. PGC-1 α dans les autres types de cancers

Le rôle de PGC-1 α commence à émerger dans d'autres types de cancers comme le cancer du côlon (De Souza-Teixeira et al., 2018; D'Errico et al., 2011; Feilchenfeldt et al., 2004; Vellinga et al., 2015), du foie (Kumar et al., 2018; Lee et al., 2009), du rein (LaGory et al., 2015; Shin et al., 2015), et de l'ovaire (Zhang et al., 2007). Cependant, ces études manquent de preuves et/ou montrent des résultats inverses pour un même cancer.

En conclusion, même si ces récents travaux prouvent l'implication de PGC-1 α dans l'initiation et la progression tumorale, la formation des métastases et la réponse aux traitements, ils ne permettent pas d'établir un profil cohérent et clair de PGC-1 α dans la tumorigénèse. En effet, on constate que, en fonction du tissu d'origine, du stade tumoral, du microenvironnement et probablement des conditions expérimentales, les différentes cellules tumorales présentent d'importantes différences d'expression et d'activité de PGC-1 α , faisant que PGC-1 α peut se comporter soit comme un gène suppresseur de tumeur soit comme un oncogène. Cependant, contrairement aux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, des mutations, amplifications ou délétions sont très rarement détectées pour PGC-1 α dans les tumeurs. Malgré le fait que PGC-1 α soit capable d'interagir, en conditions physiologiques, avec une grande variété de facteurs de transcription, les études ayant identifié les facteurs de transcription cibles de PGC-1 α dans les cellules cancéreuses sont rares. De plus, le contrôle de l'expression de PGC-

1 α dans les cellules cancéreuses nécessite également d'être plus étudié. En effet, élucider ces points pourrait aider à mieux comprendre les fonctions de PGC-1 α dans le cancer.

Certaines des études présentées dans cette partie montrent que les cellules tumorales résistantes aux chimiothérapies sont très dépendantes des voies métaboliques induites par PGC-1 α . De ce fait, cibler ces voies pourrait resensibiliser ces cellules aux thérapies. Cependant, à l'heure actuelle, rien n'indique que PGC-1 α représente une cible efficace et tangible pour les thérapies anticancéreuses. En effet, l'expression de PGC-1 α est ubiquitaire et varie entre les différents tissus, donc l'approche classique qui est d'inhiber ou augmenter la fonction de PGC-1 α pourrait être inefficace voire délétère. Donc mieux caractériser les protéines interagissant avec PGC-1 α , les voies de signalisations qu'il induit dans le cancer ainsi que les mécanismes régulant son expression, pourraient fournir des cibles thérapeutiques efficaces dans le futur pour freiner la croissance tumorale, la propagation métastatique et la résistance aux traitements.

Contexte scientifique et objectifs

Au début de ma thèse, peu de données étaient publiées concernant le rôle de PGC1- α dans le cancer.

Par conséquent le premier objectif de mes recherches était de déterminer si PGC-1 α avait ou non un rôle dans l'acquisition du phénotype métastatique des cellules tumorales prostatiques.

Malheureusement, peu de temps après avoir obtenu des résultats prometteurs sur cet objectif, Torrano et al. ont montré que PGC-1 α est bien impliqué dans la formation des métastases, ce qui allait dans le sens de mes résultats.

Je me suis donc concentrée sur l'objectif suivant qui était d'analyser les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les changements métaboliques dus à la modulation de l'expression de PGC-1 α dans les cellules tumorales prostatiques. En effet, comme vu en détail dans l'introduction, les cellules tumorales reprogramment leur métabolisme pour leur permettre de croître et proliférer. Cependant si le métabolisme des tumeurs primaires est à l'heure actuelle plutôt bien étudié, celui participant à la formation des métastases l'est beaucoup moins. De ce fait, cet objectif avait pour but de mettre en évidence les voies métaboliques dérégulées entre des cellules tumorales prostatiques peu agressives et d'autres plus agressives par une approche de métabolomique. Puis de valider les résultats obtenus *in vitro*, *in vivo* et dans des collections de tumeurs prostatiques humaines.

Le dernier objectif était de mettre en évidence d'un point de vue moléculaire comment PGC-1 α met en place les changements métaboliques identifiés durant l'objectif précédent. Dans le but, de mieux comprendre et d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

Les résultats de ces travaux de thèse ont été soumis à Cancer Research et sont actuellement en cours de révisions.

RESULTATS

Résumé et publication

Le cancer de la prostate est la troisième cause de décès par cancer chez l'homme, principalement à cause des formes avancées de la maladie qui forment des métastases. La reprogrammation et la plasticité du métabolisme cellulaire sont considérées comme des caractéristiques des cellules tumorales et une conséquence de leur adaptation à un microenvironnement hostile. Ces adaptations métaboliques sont également impliquées dans l'agressivité des cancers. Cependant, dans le cancer de la prostate, les voies métaboliques impliquées dans la formation des métastases sont, à l'heure actuelle, peu connues. Nous avons étudié le rôle d'un des principaux régulateurs du métabolisme cellulaire : le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α . PGC-1 α contrôle, entre autres, la biogénèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. De plus, il a été montré que la diminution de l'expression de PGC-1 α est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'adénocarcinomes prostatiques. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle de PGC-1 α sur le métabolisme et l'agressivité des cellules cancéreuses de prostate.

Pour cela, nous avons établi des lignées cellulaires cancéreuses de prostate (LNCaP et DU145) exprimant de façon stable un shRNA PGC-1 α . La diminution de l'expression de PGC-1 α augmente les trois caractéristiques fondamentales de l'agressivité : la prolifération, la migration et l'invasion. Afin de déterminer les modifications métaboliques impliquées dans ce phénotype, nous avons réalisé des expériences de métabolomiques en comparant les cellules contrôles (shCT) aux cellules shPGC-1 α . Nous avons montré que la diminution de PGC-1 α augmente significativement la biosynthèse des polyamines. Les polyamines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, en particulier la prolifération et la migration cellulaire. Ainsi, nous avons inhibé la synthèse des polyamines avec le DFMO, l'inhibiteur de l'enzyme limitante de la voie : l'ornithine décarboxylase (ODC), ou bien des siRNA dirigés contre ODC. Nous avons montré que les effets pro-migratoires et pro-invasifs dus à l'invalidation de PGC-1 α sont bloqués par le DFMO et les siRNA ODC. De façon intéressante, l'ajout de polyamines exogènes restaure partiellement l'agressivité des cellules. En accord avec ces résultats nous montrons que ODC est surexprimée quand PGC-1 α est diminué et que l'expression de ODC est régulée positivement par l'oncogène c-MYC. En s'intéressant plus à cet oncogène, nous avons observé que son niveau d'expression augmente dans les cellules invalidées pour PGC-1 α et que l'inhibition de c-MYC bloque les effets pro-migratoires et pro-invasifs dus à l'invalidation de PGC-1 α . Donc c-MYC participe au phénotype agressif lié à l'augmentation de la voie de biosynthèse des polyamines. Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par l'analyse des micro-métastases, ils démontrent que les cellules shPGC-1 α forment plus de métastases et le traitement par le DFMO inhibe la formation de

micro-métastases. Finalement, les données cliniques démontrent que l'expression de PGC-1 α est diminuée chez des patients atteints de cancer de la prostate, et cette diminution est corrélée avec une augmentation de c-MYC et ODC.

En conclusion nous démontrons que PGC-1 α régule un programme onco-métabolique impliquant le proto-oncogène c-MYC et la biosynthèse des polyamines ; ces modifications sont directement responsables de l'agressivité du cancer de la prostate.

PGC-1 α inhibits polyamine synthesis to suppress prostate cancer aggressiveness

Lisa KAMINSKI¹, Stéphanie TORRINO¹, Romain HAIDER^{1,2}, François-René ROUSTAN^{1,2}, Emilie JAUNE¹, Kathiane LAURENT¹, Nicolas NOTTET¹, Jean-François MICHIELS³, Maeva GESSON¹, Stéphane ROCCHI¹, Nathalie M MAZURE¹, Matthieu DURAND², Jean-François TANTI¹, Damien AMBROSETTI³, Stephan CLAVEL¹, Issam BEN-SAHRA⁴, Frédéric BOST^{1,2*}

¹ Université Nice Côte d'Azur, Inserm, C3M, France

² Department of Urology, Hôpital Pasteur 2, CHU Nice, University of Nice-Sophia-Antipolis, France

³ Department of Pathology, Hôpital Pasteur 2, CHU Nice, University of Nice-Sophia-Antipolis, France

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Northwestern University, Chicago, USA

* Corresponding author: bost@unice.fr

The authors declare no potential conflicts of interest.

ABSTRACT

Tumorigenesis is dependent on the reprogramming of cellular metabolism, however, the metabolic pathways engaged in the formation of metastasis remain largely unknown. The transcriptional co-activator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) plays a pleiotropic role in the control of cancer cell metabolism and has been associated with a good prognosis in prostate cancer (PCa). Here, we show that PGC-1 α represses the migrative and invasive properties of PCa cells through the modulation of the polyamine biosynthesis pathway. Mechanistically, PGC-1 α inhibits the expression of c-MYC and ornithine decarboxylase 1 (ODC1), the rate limiting enzyme for polyamine synthesis. Analysis of *in vivo* metastasis assays and clinical data from prostate cancer patients supports the proposition that the polyamine biosynthesis pathway and the PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis are major regulators of prostate cancer aggressiveness.

INTRODUCTION

Metabolic reprogramming is a hallmark of cancer cells and a consequence of adaptation to a hostile micro-environment with decreased oxygen concentration and nutrients (glucose and glutamine) (1). These metabolic changes are required for rapid proliferation and invasion and are well characterized for cancer cells from primary tumors but poorly described for metastatic cancer cells. Recent advances in the understanding of cancer cell metabolism has allowed for the emergence of new therapeutic approaches that specifically target these adaptations. For example, in cancer cells that rely on oxidative phosphorylation, we have shown that interfering with the mitochondrial respiration could exhibit repression of tumor growth, cancer cell proliferation and the formation of metastasis (2-4).

One of the main regulators of cellular metabolism is the transcriptional co-activator PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha). PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation (5). Recently, PGC-1 α has been shown to facilitate mitochondrial biogenesis in invasive breast cancer cells and to increase their metastatic potential (6). In contrast, overexpression of PGC-1 α decreased the formation of metastasis in melanoma and prostate, and was associated with poor prognosis and the formation of metastasis in melanoma and prostate cancer (PCa) (7, 8). However, the metabolic and molecular modifications driving the aggressiveness of PCa cells remain poorly understood.

Oncogenes and tumor suppressors regulate metabolic adaptations of cancer cells. Several studies have demonstrated that the *MYC* gene copy number is upregulated by 30% in human PCa (9, 10). Furthermore, transgenic mice overexpressing c-MYC in the prostate developed prostatic intraepithelial neoplasia followed by invasive adenocarcinoma, demonstrating that

c-MYC drives tumorigenesis in the prostate (11). Expression of the proto-oncogene c-MYC increases glycolysis and glutaminolysis (12, 13), by controlling the expression of genes involved in glucose and glutamine metabolism as well as other metabolic pathways, such as polyamine via the ornithine decarboxylase 1 (ODC1), the rate limiting enzyme of polyamine biosynthesis (14).

In this study, we demonstrate that PGC-1 α is the regulator of a c-MYC-driven onco-metabolic pathway that promotes PCa aggressiveness through the polyamine pathway. The unravelling of this metabolic circuit represents a new therapeutic target in PCa that may help to curb the advanced form of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

PC3, DU145 and LNCaP cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). All cells used in this study were within 20 passages after thawing. PC3 and DU145 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco). LNCaP cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco). Cell media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (respectively 100 U/mL and 100 µg/mL, Gibco) and incubated at 37°C and 5% CO₂. DU145 and LNCaP cells were infected with lentiviral constructs at different MOI (multiplicity of infection; 2, 5 and 10) in the presence of 8 µg/mL hexadimethrine bromide (Sigma). These cells were infected with a pLKO.1 non-target control (NTC) short hairpin RNA (Sigma Mission, shRNA) or individually with five different pLKO.1 Mission shRNA targeting PGC-1 α (Sigma) to generate cell lines with stable PGC-1 α knockdown. After 24 h of infection, the stably shRNA-expressing cells were selected with 1 µg/mL puromycin (Sigma) for 7 days and maintained in the culture medium with 0.5 µg/mL puromycin. Efficiency of PGC-1 α knockdown was determined by qRT-PCR and immunoblots and one stably shRNA-expressing cell with the best knockdown of PGC-1 α , was selected for each cell line and used for all the experiments.

Lipofectamine RNAiMAX was used for transfection of siRNAs according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Transfections of human prostate cell lines were performed using siRNA pools consisting of four siRNA oligos specifically targeting four different sites of the target mRNAs (On Target Plus; Dharmacon). The purpose of the siRNA pools is to use less of each oligo to minimize any off-target effects. The siRNA sequences are: SMARTpool: ON-TARGETplus PPARGC1A siRNA: L-005111, SMARTpool: ON-TARGETplus MYC siRNA: L-003282,

SMARTpool: ON-TARGETplus ESRRB siRNA: L-003403, siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #1: D-001206-13. Briefly, cells were seeded at 70%-80% confluence in six-well plates overnight before transfection, and then transfected with 15 nM siRNA sequences or with a nonspecific siRNA using Lipofectamine RNAiMAX. siRNA and Lipofectamine RNAiMAX reagent were diluted in Opti-MEM (Gibco), and the contents were mixed gently. The mixtures were incubated for 10–20 min at room temperature. The incubated mixtures of siRNA and RNAiMAX were added to cells and incubated for 48–72 h.

Lipofectamine 2000 reagent was used for transfections of plasmids according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). All the plasmids were purchased from Addgene: pAdTrack Flag-HA-PGC-1 alpha and an empty vector as control pAdTrack-CMV. For plasmid transfection, cells were seeded to be 70–90% confluent at the time of transfection. Plasmids and Lipofectamine 2000 reagent were diluted in Opti-MEM (Gibco). The diluted plasmids were mixed with Lipofectamine 2000 and incubated for 5 min at room temperature. For transient transfection, the transfected cells were collected after 24–48 h for experiments. For the stable PC3 cell line generation overexpressing PGC-1 α , cells were selected, after transfection, with 500 μ g/mL G418 for 30 days and maintained in the culture medium with 100 μ g/mL G418. Efficiency of PGC-1 α overexpression was determined by qRT-PCR and immunoblots.

Patient-derived prostate organoids

Patient-derived prostate organoids cultures were generated and maintained as described previously (Gao et al., 2014; Drost J 2016). Briefly, human prostate tumor tissue was dissected and enzymatically digested with collagenase type II and TrypLE (GIBCO). Cells were embedded in growth factor reduced Matrigel (Corning) to a 1:5 ratio and overlaid with ADMEM/F12 medium supplemented with B27 (Life Technologies), 10 mM HEPES (Life Technologies),

Glutamax (Life Technologies), Penicillin/Streptomycin (Life Technologies), Primocin (Invivogen) and the following growth factors: EGF (Peprotech), FGF2 (Peprotech), FGF10 (Peprotech), Prostaglandin E2 (Tocris), R-spondin1 and Noggin-conditioned medium and the TGF- β /Alk inhibitor A83-01 500 nM (Santa-Cruz), Rock Inhibitor (Selleck Chemical) 10 μ M, n-acetylcysteine (N-AC) (Sigma-Aldrich) 1.25 mM and Dihydrotestosterone (DHT; Sigma-Aldrich) was added at 1 nM. Organoids were isolated and transfected with siRNA. Next, organoids were included in a collagen I (Corning) matrix and images of invasion were obtained 48 h later.

Steady state metabolomics

To determine the relative levels of intracellular metabolites, extracts were prepared and analyzed by LC/MS/MS. Quadruplicate 10-cm plates (~80% confluent) were incubated in serum-free medium for 15 h. Metabolites were extracted on dry ice with 4 mL 80% methanol (-80°C), as described previously (15). Insoluble material was pelleted by centrifugation at 3000 g for 5 min, followed by two subsequent extractions of the insoluble pellet with 0.5 mL 80% methanol, with centrifugation at 16000 g for 5 min at 4°C. The 5 mL metabolite extract from the pooled supernatants was dried down under nitrogen gas using an N-EVAP (Organomation Associates, Inc). Dried pellets were resuspended using 20 μ L HPLC grade water for mass spectrometry. A 7 μ L sample was injected and analyzed using a 5500 QTRAP triple quadrupole mass spectrometer (AB/SCIEX) coupled to a Prominence UFLC HPLC system (Shimadzu) via selected reaction monitoring (SRM) of a total of 300 endogenous water soluble metabolites for steady-state analyses of samples (16). The normalized areas were used as variables for the univariate statistical data analysis. All univariate analyses and modeling on the normalized data were carried out using Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). Univariate

statistical differences of the metabolites between two groups were analyzed using two-tailed Student's t-test.

Immunoblot assays

Cell lines were lysed in RIPA buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Na Deoxycholate 0.5%, NaF 5 mM, NaPY 2.5 mM, NP40 1%, EDTA 10 mM) containing a protease-inhibitor cocktail (Mini-complete, EDTA-free, Roche). Samples were heat denatured with 1X Laemmli buffer. Twenty to fifty micrograms of protein were loaded per well for the 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore). Membranes were blocked for 1 h in 2% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween20 and were probed overnight at 4 °C with primary antibodies. After washing, blots were probed for 1 h at room temperature with secondary anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were visualized by exposing membranes to luminescent signals generated after incubating the membrane with ECL (Millipore) using Syngene PXi. ImageJ software was used to quantify band intensity and the ratios of proteins of interest were normalized to a loading control.

Reagents and antibodies

α -difluoromethylornithine (DFMO) was purchased from Toronto Research. Putrescine, spermine and BPTES were bought from Sigma. The c-Myc inhibitors: JQ1, 10058-F4, antibodies for PGC-1 α (sc-13067, 1:1000), c-Myc (sc-40, 1:1000), HSP90 (sc-13119, 1:10000) and ERK2 (sc-1647, 1:10000) were purchased from Santa Cruz. ERR α (C15410230, 1:1000) was purchased from Diagenode. ODC1 (O1136, 1:100) and anti- α -Tubulin (T6199, 1:10000) were purchased from Sigma. HRP-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L) (715-035-

150, 1:5000) and HRP-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L) (711-035-152, 1:5000) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA from cells was extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The quantity and the quality of the isolated RNA were determined using a NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Scientific). One microgram of total RNA was reverse transcribed into first strand cDNA using the reverse transcription system (Promega). Real-time quantitative PCR was performed using Fast SYBR Green master mix (Applied Biosystems) on a StepOnePlus System (Applied Biosystems). The gene-specific primer sets were used at a final concentration of 1 μ M in a 10 μ L final volume. RPLP0 mRNA level was used as an endogenous control to normalize relative expression values of each target gene. The relative expression was calculated by the comparative Ct method. All real-time RT-PCR assays were performed in triplicate with three independent experiments. For RNA isolation and RT-PCR from paraffin-embedded prostate tumor tissues, total RNA was extracted with PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For each RNA purification, 6 pieces of 10 μ m thick sections of paraffin-embedded prostate tissues, with a tissue surface area of 0.5-1 cm², were used. For each patient a sample of both normal prostate and tumor tissue were collected. Briefly, the main steps were: first, deparaffinization in melting buffer at 72°C for 10 min. Then, the tissue was separated from the melted paraffin by centrifugation and digested at 60°C with Proteinase K for 3h. The tissue lysate was further processed by selective binding of RNA to a silica-based membrane in the spin cartridge. Impurities were removed by thorough washing with wash buffer. Total RNA was eluted in RNase-Free Water and the quality and quantity of the purified RNA were

determined with a NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo Scientific). One microgram of total RNA was reverse transcribed into first strand cDNA using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (K1671) according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). Real-time quantitative PCR was performed with TaqMan Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems) using the ABI PRISM 7500/Step-One Fast Real Time PCR System following the manufacturer's protocols (Applied Biosystems). TaqMan gene expression assays purchased from Applied Biosystems: PPARGC1 (Hs01016719_m1), MYC (Hs00153408_m1), ODC1 (Hs00159739_m1) and AMACR (Hs00204885_m1). Gene expression values were normalized to the value of the housekeeping gene 18S (Hs99999901_s1) and calculated on the basis of the comparative cycle threshold Ct method ($\Delta\Delta Ct$).

Migration and invasion assays in Boyden chambers.

Migration and invasion assays were performed using cell culture inserts with 8.0 μm pore transparent PET membrane coated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronectin. For invasion experiments, the inserts were coated with 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of Matrigel and incubated for 3h at 37°C in a CO₂ incubator, while for the migration assay, transwells were left uncoated. Briefly, overnight serum-starved cells (12×10^4 cells) were seeded into the top chamber in medium without FBS, while medium with 10% FBS was present in the bottom chamber. The cells were incubated for 3-6 h or 24 h for migration and invasion, respectively. The media and remaining cells were removed from the top chamber with a cotton swab and washed 2 times with PBS. The bottom chamber was aspirated and washed 2 times with PBS. The inserts were fixed with 4% PFA and incubated with a DAPI solution (2 mg/mL) to label cell nuclei. Cell migration and invasion were determined by counting all cells on the total areas at the lower surface of the membrane with

a Nikon A1/ A1R Confocal Laser Microscope System. Nuclei were counted and analyzed using Image J software and normalized to area.

Animal experiments

To conduct pulmonary extravasation assays, 1×10^6 DU145, LNCaP or PC3 cells were labeled for 1h with 15 μ M CellTracker Green and injected via the tail vein of 6 week-old nude mice. After 24h, mice were sacrificed, and the lungs were harvested, fixed with 4% PFA, stained with DAPI and analyzed with a Nikon A1 / A1R Confocal Laser Microscope System. Two mice per group were sacrificed after 30 min to confirm that an equal number of cells reached the lung. Quantification of the lung micrometastasis were performed as follows with Image J. First, the user sets a large threshold based on the DAPI labeling, and the macro measures the tissue area. This value is used at the end of the analysis to normalize cell numbers relative to the imaged tissue area. Secondly, the number of positive cells is counted using the *Find Maxima* function. This function searches for the local maximum of intensity in a defined area. We adapted this area size depending on the noise in the image, which was different depending on the phenotype.

Bioinformatic analysis

The Cancer Genome Atlas (TCGA) data for Prostate Adenocarcinoma (PRAD) were downloaded from the TCGA data portal (<https://portal.gdc.cancer.gov>). RNA-seq data were normalized using the Bioconductor package DESeq2. Expression levels of the following genes were evaluated in these patient datasets: PPARGC1A (PGC1 α), MYC (c-MYC), AMACR and ODC1. We compared the expression levels of each individual gene in primary tumors and in a reference population (patients without prostate tumors or metastasis). For TCGA data, we

compared the PPARGC1A gene expression levels in tumor samples, distinguished by the Gleason grade. P-values were calculated by the Wilcoxon rank sum test.

RESULTS

PGC-1 α inhibits polyamine synthesis and aggressiveness in PCa cells.

To investigate the impact of PGC-1 α on prostate cancer cell metabolism, we used unbiased metabolomic profiling in the human PCa cell line, DU145, stably transfected with control or PGC-1 α shRNAs (Supplementary Fig. S1A). Of the 262 small metabolites identified by liquid-chromatography (LC) tandem mass spectrometry (MS/MS), the steady state levels of 32 metabolites were significantly altered in the PGC-1 α knock-down cells relative to cells transfected with control shRNA ($p < 0.02$). Eventually, we found 12 metabolites that were significantly upregulated upon PGC-1 α silencing, among them, spermine and putrescine, two metabolites that are representative of the polyamine pathway (Fig. 1A,B,C), were among the most up-regulated with a VIP (Variable Importance in Projection) score above 1.85 (Supplementary Fig. S1B). This result demonstrates that the increase in polyamine synthesis is one of the major metabolic alterations induced by the downregulation of PGC-1 α .

To determine if this metabolic change is associated with an aggressive phenotype, we performed migration and invasion assays with two less aggressive PCa cell lines, DU145 and LNCaP, which were stably expressing PGC-1 α shRNA (Supplementary Fig. S1A). The same assays were also performed in PC3, the most aggressive PCa cells, overexpressing the PGC-1 α metabolic regulator (Supplementary Fig. S1C). The decrease of PGC-1 α expression significantly increased the migration and the invasion of the LNCaP and DU145 shPGC-1 α cell lines (Fig. 1D,E) while the overexpression of PGC-1 α inhibited the aggressive phenotype of the PC3 cells (Supplementary Fig. S1D).

To exclude any potential off-target effects of the shRNA, we transfected parental LNCaP and DU145 cells with a pool of siRNA targeting PGC-1 α (Supplementary Fig. S1E). As with the

shPGC-1 α cells, the siRNA knockdown of PGC-1 α increased the migration of the cells (Supplementary Fig. S1F). To further validate the role of PGC-1 α , we restored its expression in LNCaP and DU145 shPGC-1 α cells using a cDNA encoding for a HA-tagged mouse PGC-1 α (HA-mPGC-1 α) (Supplementary Fig. S1G). The over-expression of PGC-1 α hampered the migration and the invasion of the shPGC-1 α cell lines, but it also significantly decreased the aggressive phenotype of the control shRNA cells (Fig. 1F,G). Finally, we took advantage of a patient-derived prostate cancer organoid model to monitor the effects of PGC-1 α on cell aggressiveness. The siRNA-induced decrease of PGC-1 α increased the migration of cells outside the organoids (Fig. 1H,I; Supplementary Fig. S1H). Thus, our results demonstrate that PGC-1 α inhibits PCa cell migration and invasion in a 2D and 3D cell model. Interestingly, this phenotype is associated with a clear metabolic signature: the inhibition of polyamine synthesis.

PGC-1 α inhibits ODC1 expression via the downregulation of c-MYC.

The rate-limiting enzyme of polyamine synthesis is the ornithine decarboxylase 1 (ODC1). We found, in accordance with the upregulation of polyamine synthesis, that the expression of ODC1 mRNA and protein was significantly increased in shPGC-1 α cells (Fig. 2A; Supplementary Fig. S2A). To validate that PGC-1 α inhibits the expression of ODC1, we over-expressed PGC-1 α in shPGC-1 α cells and found that it hampered the expression of ODC1 (Fig. 2A).

ODC1 is one of the first metabolic genes shown to be transcriptionally regulated by the proto-oncogene c-MYC (17), and c-MYC increases polyamine synthesis (18). Thus, we monitored the expression of c-MYC in shPGC-1 α cells. We showed that c-MYC mRNA and protein are significantly increased in shPGC-1 α cells (Fig. 2B; Supplementary Fig. S2B) suggesting, that like ODC1, PGC-1 α represses c-MYC expression. In accordance with this result we found a

decrease in the expression of c-MYC mRNA and protein in PC3 cells overexpressing PGC-1 α (Supplementary Fig. S2C). To validate that c-MYC upregulates ODC1 expression, we silenced c-MYC with siRNA in shPGC-1 α cells and found that the downregulation of c-MYC abrogates the expression of ODC1 (Fig. 2C).

We subsequently studied how PGC-1 α regulates c-MYC expression. We took advantage of transcriptomic analyses showing that PGC-1 α regulates the Estrogen-Related Receptor Alpha (ERR α) transcriptional program in PCa cells (8). To determine if ERR α is involved in the regulation of c-MYC expression by PGC-1 α , we undertook a silencing approach with a pool of ERR α -targeting siRNA. The silencing of ERR α had no effect on c-MYC expression in shCT cells but it inhibited the expression of c-MYC induced by the knock-down of PGC-1 α in LNCaP and DU145 (Fig. 2D). This result shows that PGC-1 α inhibits c-MYC expression through an ERR α -dependent mechanism. Altogether, our data provide a molecular mechanism by which PGC-1 α represses a c-MYC/ODC1 axis.

The PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis controls the aggressive phenotype of PCa cells via polyamine synthesis.

To determine the contributing role of c-MYC in the aggressive phenotype of the shPGC-1 α cells, we inhibited c-MYC with siRNA or the 10058-F4 compound (a specific chemical inhibitor of c-MYC) and performed a migration and invasion assay. Under both conditions, the inhibition of c-MYC abolished the pro-migrative and pro-invasive effects of the shPGC-1 α PCa cells (Fig. 3A,B,C,D; SupplementaryFig. S3A). This result demonstrates that c-MYC mediates the effects of PGC-1 α on PCa cell aggressiveness.

To establish if polyamine synthesis is the metabolic pathway implicated in the aggressive phenotype of shPGC-1 α cells, we treated cells with α -difluoromethylornithine (DFMO) a specific and well-characterized inhibitor of ODC1 (19). DFMO did not inhibit the migration and the invasion of the control cells but it hampered the aggressive phenotype of the shPGC-1 α cells (Fig. 3E,F). The contribution of polyamine synthesis to the aggressiveness of shPGC-1 α cells was validated by the addition of exogenous putrescine for 24h in the culture media after the DFMO treatment. The addition of putrescine did not affect the migration and the invasion of control cells, but partially restored the aggressiveness of the shPGC-1 α cell lines (Fig. 3E,F). Similarly, we demonstrated that the siRNA silencing of ODC1 inhibited cell migration and invasion in LNCaP and DU145 shPGC-1 α , but that the addition of putrescine partially restored the aggressiveness of cancer cells (Supplementary Fig. S3B,C,D). All together, these results support the conclusion that the downregulation of PGC-1 α reprograms cancer cell metabolism toward polyamine synthesis to promote an aggressive phenotype.

PGC-1 α suppresses the formation of metastasis through the downregulation of polyamine synthesis.

To establish the role of PGC-1 α in the formation of metastasis *in vivo*, we performed an extravasation experiment in mice. DU145 and LNCaP shPGC-1 α cells and their respective shCt control cells, treated or not treated with DFMO, were injected into the caudal vein of 6-week-old male athymic nude mice. After twenty-four hours, to allow for the formation of micrometastasis, we analyzed the ability of cells to extravasate through the pulmonary parenchyma and quantified the micrometastasis formation. The downregulation of PGC-1 α significantly increased the metastatic potential of DU145 and LNCaP cells (Fig. 4A,B; Supplementary Fig. S4). The treatment with DFMO did not affect the aggressiveness of the

shCT cells, but it significantly hampered the invasive properties of the shPGC-1 α cells. To validate the anti-metastatic activity of PGC-1 α and the implication of polyamine synthesis, we tested the aggressiveness of PC3 cells overexpressing PGC-1 α that were treated or not treated with putrescine. The expression of PGC-1 α strongly inhibited the formation of metastasis in the lungs and the treatment with exogenous putrescine restored the ability to form metastases (Fig. 4C).

Taken together, our data demonstrate that polyamine biosynthesis drives the pro-metastatic activity of PCa cells with reduced PGC-1 α levels.

The downregulation of PGC-1 α is associated with increased c-MYC and ODC1 in human tumor biopsies

To determine if the PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis has a clinical relevance, we analyzed mRNA expression of these genes in normal and tumor matched tissues from 73 patients with advanced PCa (Table 1). We extracted mRNA from paraffin embedded tissues and performed a RT-qPCR analysis on paired tumor and normal adjacent tissue. The expression of AMACR (a well characterized biomarker of PCa), PGC-1 α , c-MYC and ODC1 are presented in Fig. 5A. As expected, the expression of AMACR was significantly higher in tumors compared to the healthy gland. Importantly, we found that the expression of PGC-1 α mRNA was significantly lower in tumors compared to the adjacent normal tissue and in the same tumor tissue, the expression of c-MYC and ODC1 was increased.

Based on the TCGA-PRAD database, we constructed a heatmap to visualize the coexpression pattern of the PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis genes in normal and tumoral tissues with increasing Gleason grades. PGC-1 α expression is high in normal tissues and gradually decreases with elevated Gleason scores. In contrast, the expression of ODC1 and c-MYC is low in normal tissue

and increased with Gleason grade (Fig. 5B). To confirm this observation, we performed a correlative analysis using the same database. We observed a weak but significant correlation between PGC-1 α and ODC1 expression as well as PGC-1 α and c-MYC in PCa tumors and normal tissue with $r=0.30$ ($p=2.9\times 10^{-13}$) and $r= 0.24$ ($p= 6.48\times 10^{-9}$), respectively (Fig. 5C,D). Taken together, our data demonstrate that the low expression of PGC-1 α is associated with high expression of c-MYC and ODC1 in patients. It provides evidence that the PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis defines a gene signature that may have a prognostic value and may also be the target of future PCa therapies.

DISCUSSION

We demonstrate here that the transcriptional co-activator, PGC-1 α , is the master regulator of an onco-metabolic program regulating prostate cancer cell aggressiveness. The downregulation of PGC-1 α makes PCa cells dependent on the polyamine pathway to promote metastasis. Indeed, the decrease of PGC-1 α induces the upregulation of c-MYC and ODC1, the rate-limiting enzyme of polyamine synthesis. Both the bioinformatic analysis of a PCa dataset and our results on human biopsies demonstrate that low expression of PGC-1 α correlates with higher levels of c-MYC and ODC1 in tumors. Thus, our results highlight the importance of the PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis as a potential diagnostic marker of PCa aggressiveness.

In accordance with our results, recent studies have demonstrated that the downregulation of PGC-1 α promotes cancer cell aggressiveness and metastasis in PCa, melanoma and hepatocarcinoma (7, 8, 20). However, the role of PGC-1 α is different in breast cancer, where the expression of PGC-1 α promotes breast cancer metastasis (21) and circulating (metastatic) breast cancer cells express high levels of PGC-1 α (6). The elevated expression of PGC-1 α correlates with increased mitochondrial respiration and glucose consumption as well as greater fuel flexibility in breast cancer cells. In PCa cells, we demonstrate that the knockdown of PGC-1 α increases glutamine and glucose metabolism (data not shown) as well as polyamine synthesis.

The importance of polyamines in PCa proliferation is well established (22, 23). It was recently demonstrated that this pathway drives PCa aggressiveness through the activation of the pro-oncogenic complex mTORC1. mTORC1 controls the stability of *S*-adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD1), the enzyme that regulates the production of decarboxylated *S*-adenosylmethionine (dcSAM), a substrate for polyamine synthesis (24). In our study, the

silencing of PGC-1 α did not affect mTORC1 activity nor AMD1 expression (data not shown), thus, we have characterized a new regulatory pathway orchestrated by PGC-1 α , which drives PCa cancer aggressiveness through polyamine synthesis.

Targeting polyamine synthesis may be interesting for cancer therapy. Many studies have shown that DFMO (the inhibitor of ODC1) inhibits the proliferation and the aggressiveness of gastric, prostate, nonmelanoma skin cancer and neuroblastoma cell lines. DFMO is also an inhibitor of tumor growth in animal models, where it reduced pancreatic intraepithelial neoplasm by 40% (25). Similarly, addition of DFMO in drinking water decreased significantly tumor growth in TRAMP mice, a transgenic model of PCa (23). Preclinical evidence strongly supports the use of DFMO in cancer therapy and many clinical trials have already been performed, while others are ongoing for the treatment of different cancers such as gliomas, prostate and gastric cancer (26). So far, the results of these clinical trials have shown moderate effects (27-29). Even though DFMO very efficiently inhibits polyamine synthesis in patients (30), dietary sources of polyamines compensate for the inhibitory effects of DFMO on endogenous polyamine synthesis. Thus, strategies combining a low polyamine diet and DFMO may be potentially interesting.

We found that PGC-1 α knockdown led to the increase of c-MYC expression in PCa cells and, conversely, that the over-expression of PGC-1 α decreases c-MYC protein levels. The c-MYC/PGC-1 α balance has been shown to control not only the metabolic phenotype of pancreatic cancer stem cells (CSC), but also their sensitivity to metabolic drugs targeting the mitochondria, such as metformin. Low expression of c-MYC allows high expression of PGC-1 α resulting in higher bioenergetic capacities in CSC (31). Here, we found that low expression of PGC-1 α allows for high expression of c-MYC in PCa cells, thus triggering the increase of

polyamine synthesis and making PCa more aggressive. The link between c-MYC and polyamine synthesis is not new since ODC1 expression is known to be regulated by c-MYC, and glutaminolysis has been shown to be directly linked to polyamine synthesis in a c-MYC-dependent manner during T lymphocyte activation (32). Our findings demonstrate that PGC-1 α regulates a pathway integrating c-MYC and ODC1. Mechanistically, we also show that PGC-1 α and ERR α act together to regulate c-MYC expression. When PGC-1 α is downregulated, ERR α is required for the increase of c-MYC. These results are in agreement with recent studies demonstrating that ERR α is involved in PCa progression and the formation of bone metastasis (33, 34).

In summary, our study reinforces the central role of the polyamine pathway in PCa progression, but it also reveals a link between PGC-1 α and an onco-metabolic pathway. Our findings not only describe new signatures of cancer progression but also provide tools to identify new therapeutic options.

Acknowledgements: Metabolomics services were performed by the Beth Israel Deaconess Medical Center Mass spectrometry Facility of Harvard Medical School. We thank Charlotte Hinault for carefully reading the manuscript. This work was supported by a grant from the Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer, l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP), ITMO-Cancer. This work has been supported by the French government, through the UCAJEDI Investments in the Future project managed by the National Research Agency (ANR) with the reference number ANR-15-IDEX-01. L.K. is supported by the French Ministry of Research. S.T. has a grant from the Fondation de France, R.H. and E.J. were supported by the foundation ARC and FRR by the CHU of Nice. I.B.S is supported by the NIH R00-CA194192 and LAM foundation grants. F.B. and JF.T are CNRS investigators.

REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
2. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*. 2008;27:3576-86.
3. Bost F, Decoux-Poullot AG, Tanti JF, Clavel S. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis*. 2016;5:e188.
4. Dirat B, Ader I, Golzio M, Massa F, Mettouchi A, Laurent K, et al. Inhibition of the GTPase Rac1 mediates the antimigratory effects of metformin in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2015;14:586-96.
5. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J*. 2015;282:647-72.
6. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16:992-1003, 1-15.
7. Luo C, Lim JH, Lee Y, Granter SR, Thomas A, Vazquez F, et al. A PGC1alpha-mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis. *Nature*. 2016;537:422-6.
8. Torrano V, Valcarcel-Jimenez L, Cortazar AR, Liu X, Urosevic J, Castillo-Martin M, et al. The metabolic co-regulator PGC1alpha suppresses prostate cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2016;18:645-56.
9. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*. 1997;57:524-31.
10. Qian J, Jenkins RB, Bostwick DG. Detection of chromosomal anomalies and c-myc gene amplification in the cribriform pattern of prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol*. 1997;10:1113-9.
11. Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J, Iruela-Arispe ML, Zhang J, Matusik R, et al. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*. 2003;4:223-38.
12. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab*. 2012;15:110-21.
13. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, et al. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:6658-63.
14. Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7804-8.
15. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*. 2013;339:1323-8.
16. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc*. 2012;7:872-81.
17. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1-11.
18. Hogarty MD, Norris MD, Davis K, Liu X, Evageliou NF, Hayes CS, et al. ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2008;68:9735-45.
19. Bey P, Danzin C, Van Dorsselaer V, Mamont P, Jung M, Tardif C. Analogues of ornithine as inhibitors of ornithine decarboxylase. New deductions concerning the topography of the enzyme's active site. *J Med Chem*. 1978;21:50-5.

20. Liu R, Zhang H, Zhang Y, Li S, Wang X, Wang C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2017;39:1010428317695031.
21. Andrzejewski S, Klimcakova E, Johnson RM, Tabaries S, Annis MG, McGuirk S, et al. PGC-1alpha Promotes Breast Cancer Metastasis and Confers Bioenergetic Flexibility against Metabolic Drugs. *Cell Metab.* 2017;26:778-87 e5.
22. Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Carani C, Madeo B, Tampieri A, et al. Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 2000;60:28-34.
23. Gupta S, Ahmad N, Marengo SR, MacLennan GT, Greenberg NM, Mukhtar H. Chemoprevention of prostate carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in TRAMP mice. *Cancer Res.* 2000;60:5125-33.
24. Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristorena A, Martin-Martin N, Fernandez-Ruiz S, Sutherland JD, Clasquin M, et al. mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. *Nature.* 2017;547:109-13.
25. Mohammed A, Janakiram NB, Madka V, Ritchie RL, Brewer M, Biddick L, et al. Eflornithine (DFMO) prevents progression of pancreatic cancer by modulating ornithine decarboxylase signaling. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014;7:1198-209.
26. Alexiou GA, Lianos GD, Ragos V, Galani V, Kyritsis AP. Difluoromethylornithine in cancer: new advances. *Future Oncol.* 2017;13:809-19.
27. Horn Y, Schechter PJ, Marton LJ. Phase I-II clinical trial with alpha-difluoromethylornithine--an inhibitor of polyamine biosynthesis. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987;23:1103-7.
28. Levin VA, Hess KR, Choucair A, Flynn PJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, et al. Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination alpha-difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res.* 2003;9:981-90.
29. Lynch PM, Burke CA, Phillips R, Morris JS, Slack R, Wang X, et al. An international randomised trial of celecoxib versus celecoxib plus difluoromethylornithine in patients with familial adenomatous polyposis. *Gut.* 2016;65:286-95.
30. Simoneau AR, Gerner EW, Nagle R, Ziogas A, Fujikawa-Brooks S, Yerushalmi H, et al. The effect of difluoromethylornithine on decreasing prostate size and polyamines in men: results of a year-long phase IIb randomized placebo-controlled chemoprevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:292-9.
31. Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, et al. MYC/PGC-1alpha Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* 2015.
32. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity.* 2011;35:871-82.
33. Fradet A, Bouchet M, Delliaux C, Gervais M, Kan C, Benetollo C, et al. Estrogen related receptor alpha in castration-resistant prostate cancer cells promotes tumor progression in bone. *Oncotarget.* 2016;7:77071-86.
34. Misawa A, Inoue S. Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:83.

Table 1: Characteristics of the 73 patients with advanced PCa

	n (%)
Patients	73
Age (yo)	
median	67 [51-81]
mean	66.3
PSA (ng/ml)	
median	8 [3.2-39]
mean	11.5
Tumor stage	
pT2a	4(5.4)
pT2b	1(1.4)
pT2c	33(44.6)
pT3a	28(37.8)
pT3b	8(10.8)
Final Gleason	
Gleason 6	4 (5.5)
Gleason 7	53 (72.6)
Gleason \geq 8	16 (21.9)

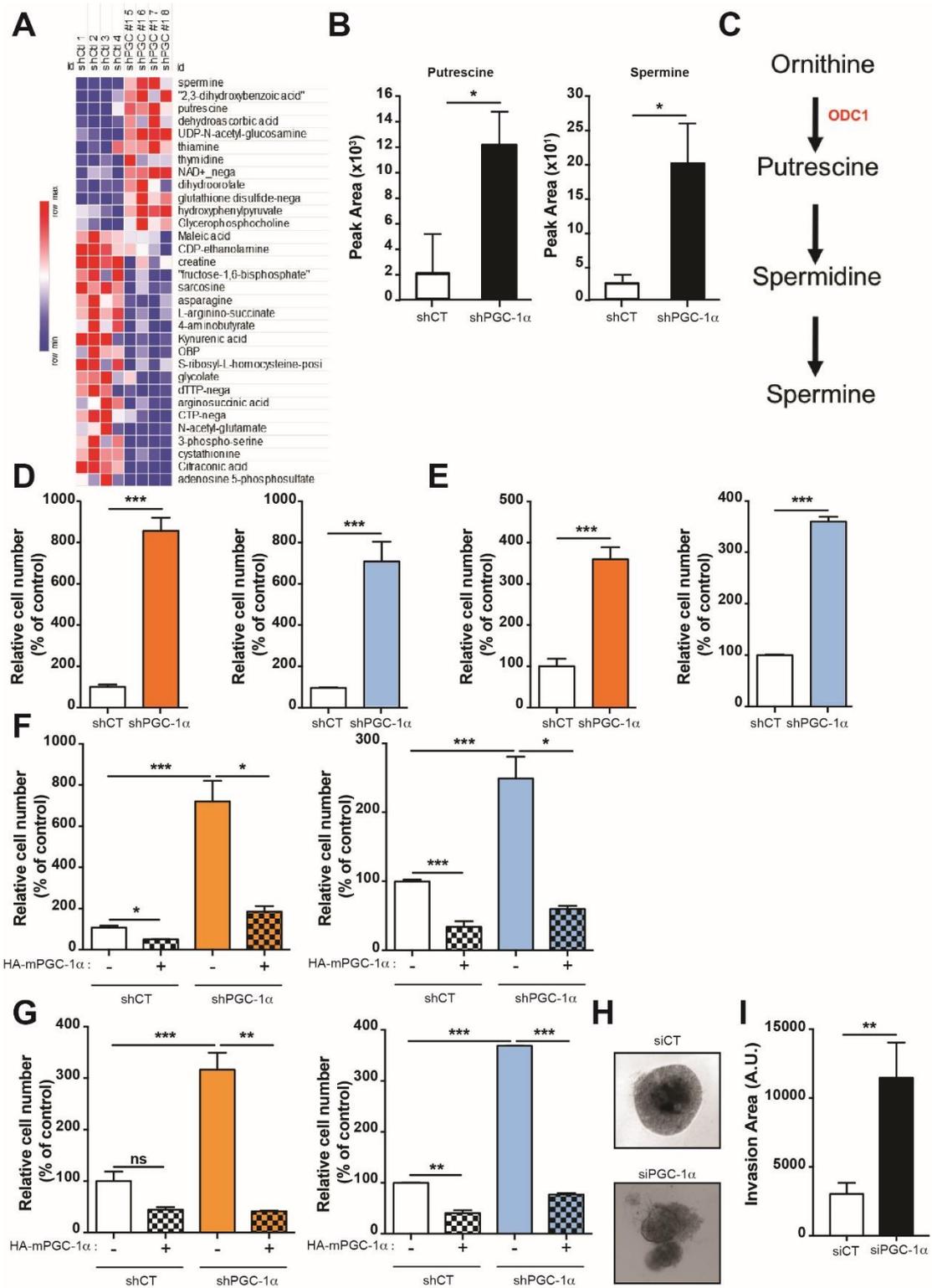


Figure 1: PGC1- α silencing results in cellular polyamine build-up and increased cell migration and invasion. **A**, Steady-state metabolite profile from DU145 cells transfected with PGC1- α -targeting (shPGC1- α) or control shRNA (shCT). Intracellular metabolites from four

independent samples per condition were profiled by LC/MS/MS, and those significantly altered in PGC1- α knockdown cells, relative to control cells, are shown as row-normalized heat maps ranked according to fold change $\text{Log}_2(\text{shPGC1-}\alpha/\text{shCT})$. **B**, Normalized peak area of putrescine and spermine in DU145 shCT and shPGC-1 cancer cell line, $p < 0.02$. **C**, Schematic representation of the polyamine biosynthesis pathway (ODC1: Ornithine Decarboxylase 1). **D**, Migration assay of LNCaP (orange) and DU145 (blue) shCT and shPGC-1 α cell lines. **E**, Invasion assays of LNCaP (orange) and DU145 (blue) in shCT and shPGC-1 α cell lines after the restoration of PGC-1 α expression. **F**, Migration assay of LNCaP (orange) and DU145 (blue) in shCT and shPGC-1 α cell lines after the restoration of PGC-1 α expression. **G**, Invasion assay of LNCaP (orange) and DU145 (blue) in shCT and shPGC-1 α cell lines after the restoration of PGC-1 α expression. **H**, Representative image of patient-derived prostate cancer organoid transfected with siCT or siPGC-1 α . **I**, Quantification of the invasion area of the patient-derived prostate cancer organoid in the matrigel. Experiments were performed independently at least three times. Data are shown as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. P values are calculated by Student's t-test.

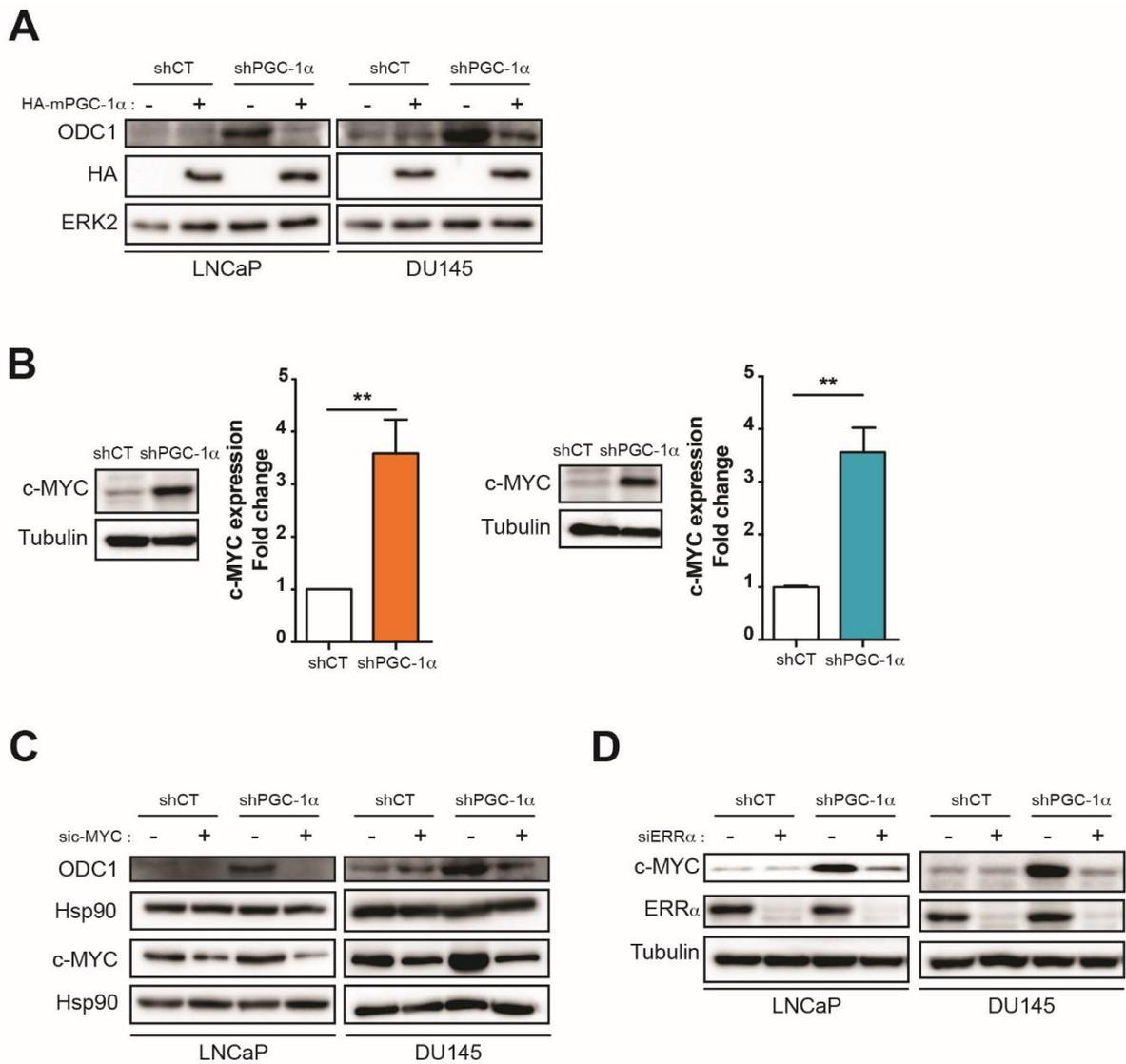


Figure 2: PGC-1 α represses c-MYC and ODC1 expression. **A**, Expression of ODC1 in LNCaP and DU145 shPGC-1 α cell lines overexpressing or not HA-mPGC-1 α . **B**, Expression of c-MYC in the shPGC-1 α cell lines, LNCaP cells are in orange and DU145 in blue. The graph represents the quantification of three independent experiments. **C**, Expression of ODC1 in LNCaP and DU145 shPGC-1 α cell lines transfected with si-c-MYC. **D**, Expression of c-MYC in LNCaP and DU145 shPGC-1 α cell lines transfected with siERR α . Data are shown as mean \pm S.E.M. **P<0.01. P values are calculated by Student's t-test.

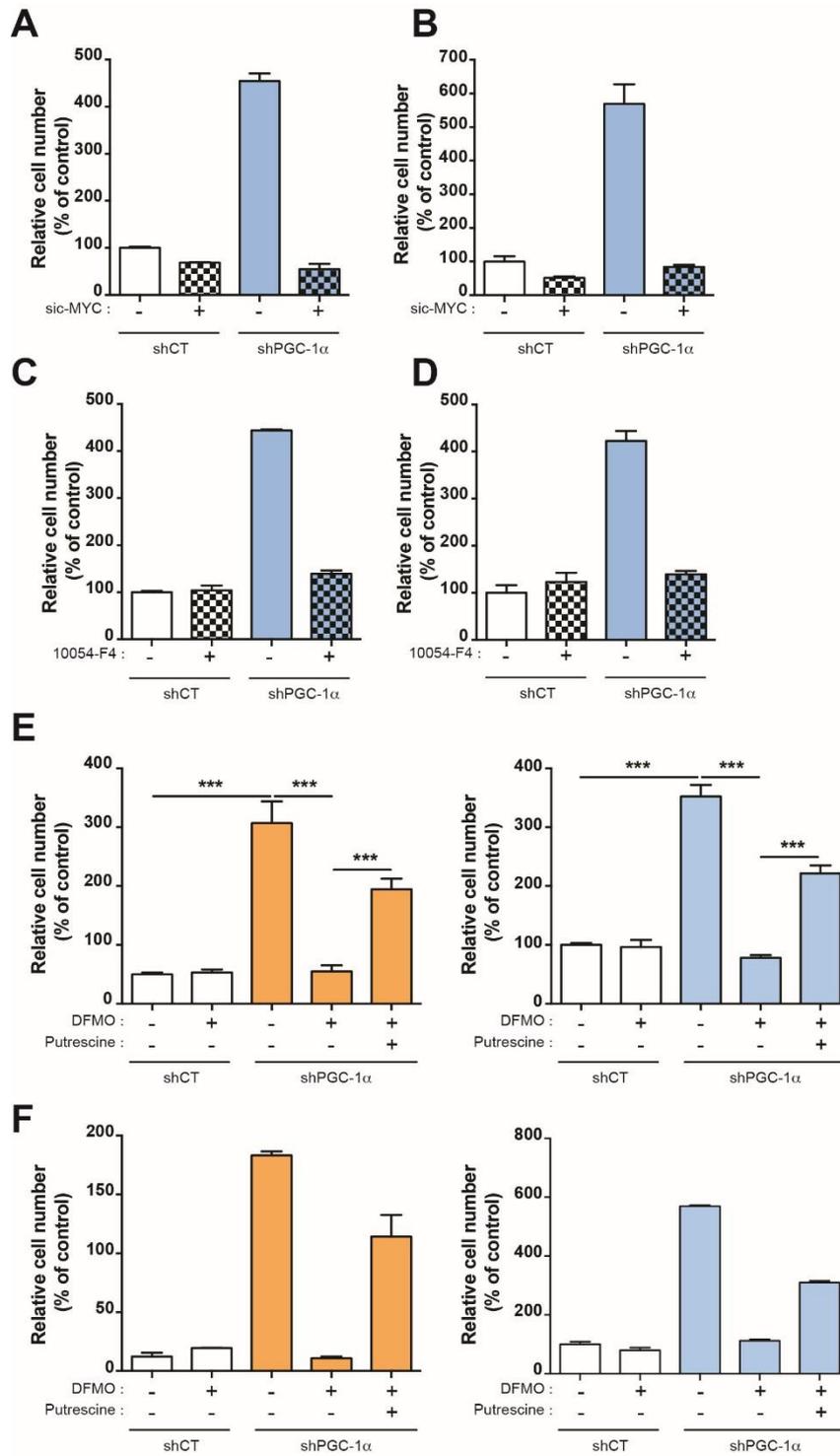


Figure 3: The PGC-1 α /c-MYC/ODC1 axis controls the aggressive phenotype in PCa cells via polyamine synthesis. A, Migration assay in DU145 shPGC-1 α cells transfected with sic-MYC. B, Invasion assay in DU145 shPGC-1 α cells transfected with sic-MYC. C, Migration assay in DU145 shPGC-1 α cells treated with the c-MYC inhibitor, 10054-F4. D, Invasion assay in DU145

shPGC-1 α cells treated with the c-MYC inhibitor, 10054-F4. **E**, Migration assay in LNCaP (orange) and DU145 (blue) shPGC-1 α cells treated with DFMO and Putrescine. **F**, Invasion assay in LNCaP (orange) and DU145 (blue) shPGC-1 α cells treated with DFMO and Putrescine. Data are shown as mean \pm S.E.M. ***P<0.001. P values are calculated by Student's t-test. The graphs in panels **A,B,C,D** and **F** are the mean of two independent experiments.

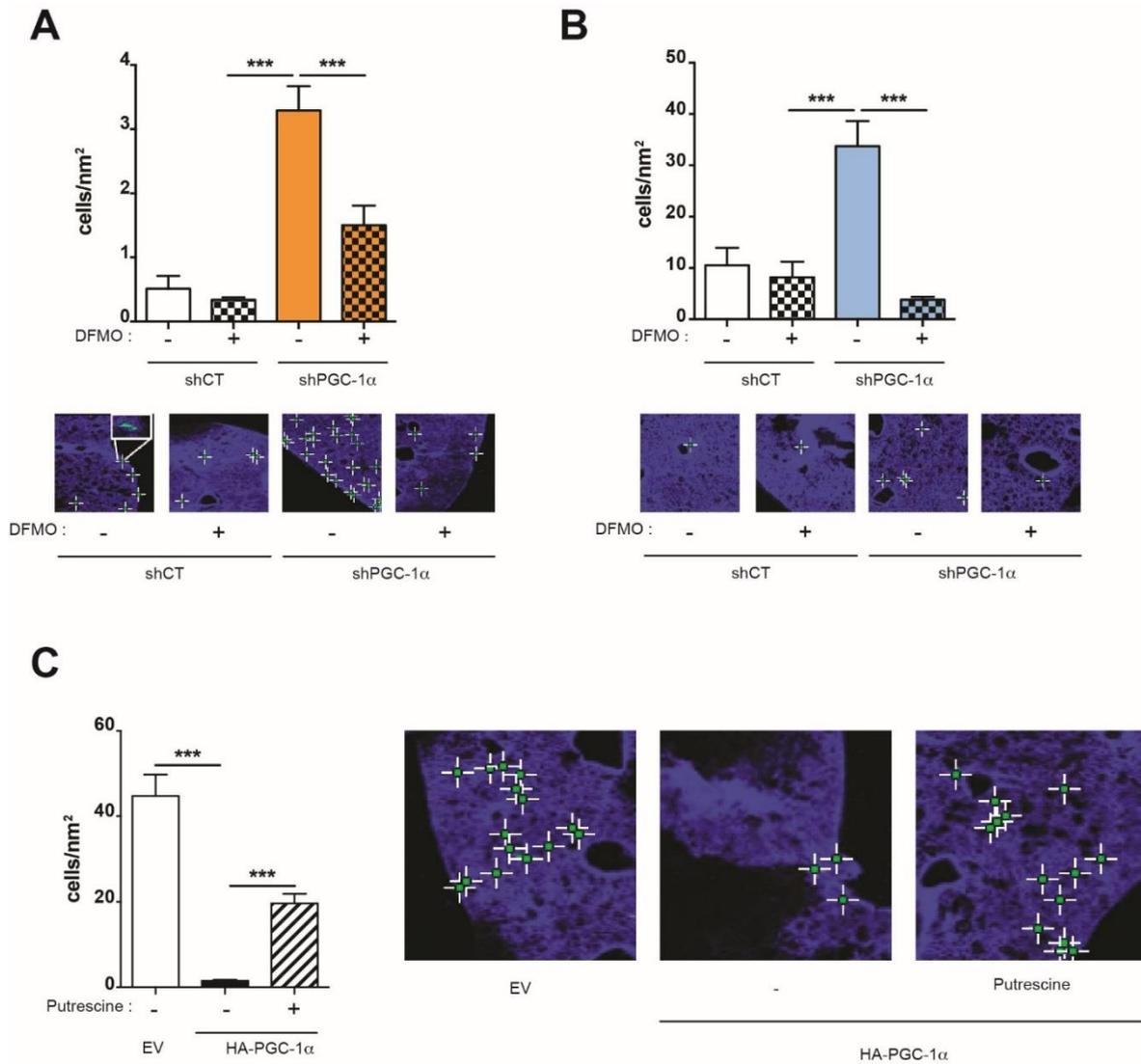


Figure 4: PGC-1 α inhibits the formation of micrometastasis and putrescine restores the aggressive phenotype. **A**, Quantification and representative images of lung micrometastasis in mice injected with LNCaP shPGC-1 α cells and treated with DFMO. **B**, Quantification and representative images of lung micrometastasis in mice injected with DU145 shPGC-1 α cells and treated with DFMO. **C**, Quantification and representative images of lung micrometastasis in mice injected with PC3 cells expressing PGC-1 α and treated with Putrescine. N=5 mice per group. Data are shown as mean \pm S.E.M. ***P<0.001. P values are calculated by Student's t-test.

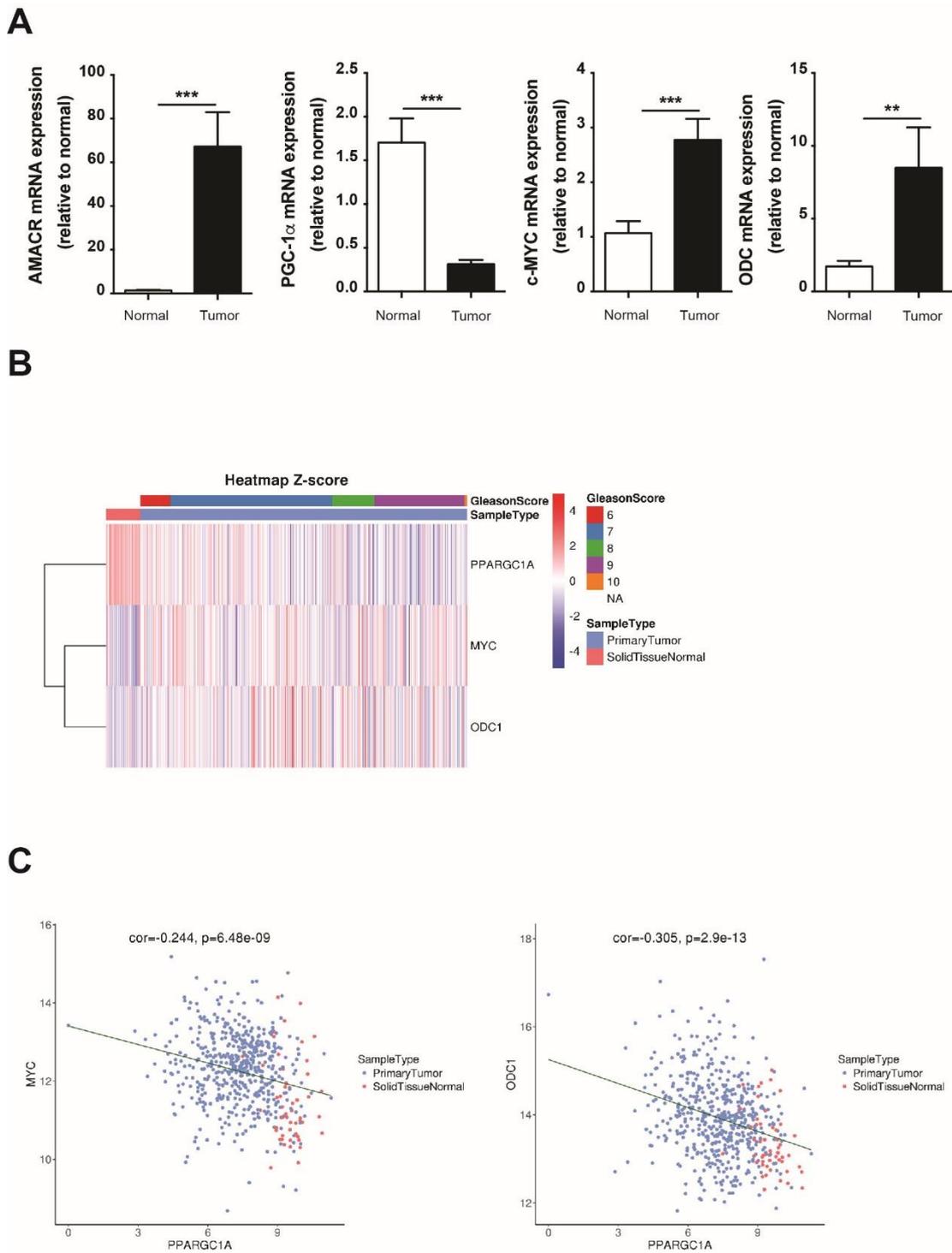
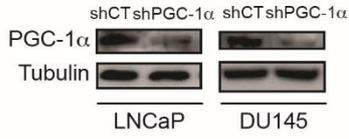


Figure 5: The downregulation of PGC-1 α is associated with increased c-MYC and ODC1 in tumor biopsies. A, Expression of AMACR, PGC-1 α , MYC and ODC1 mRNA in prostate tumor and adjacent normal tissue. **B**, Heatmap representation of the expression of PGC-1 α , MYC and ODC1 from the TCGA database. **C**, Correlation analysis of the TCGA database for the

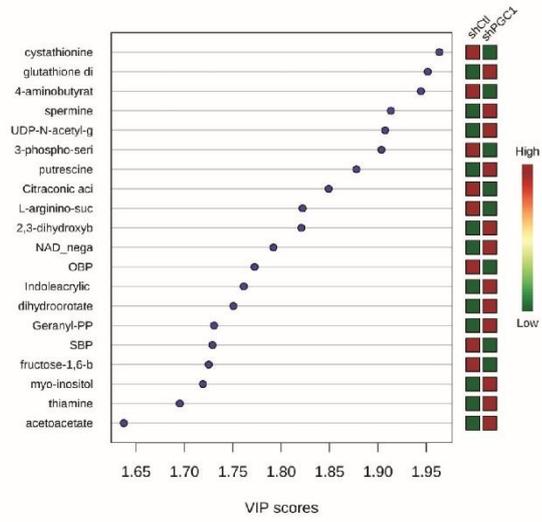
expression of c-MYC and PPARGC1A (PGC-1 α). **D**, Correlation analysis of the TCGA database for the expression of ODC1 and PPARGC1A (PGC-1 α). Data are shown as mean \pm S.E.M., **P<0.01, ***P<0.001. P values are calculated by Student's t-test.

SUPPLEMENTARY FIGURES

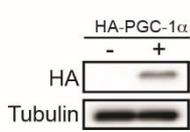
A



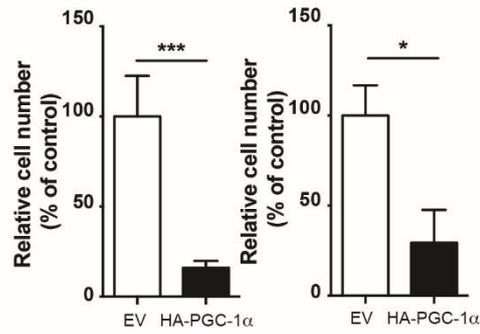
B



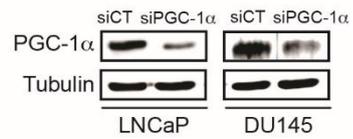
C



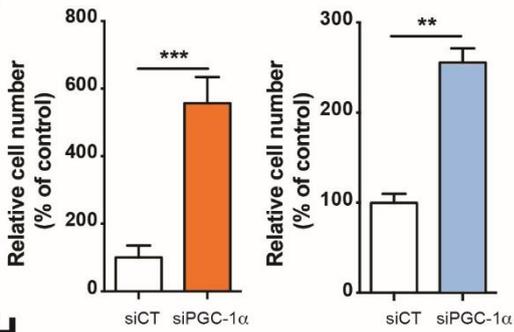
D



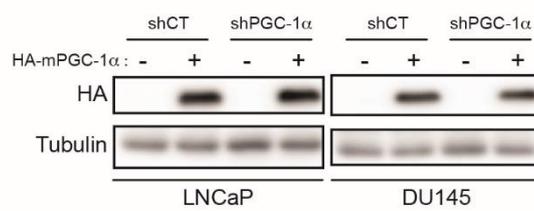
E



F



G



H

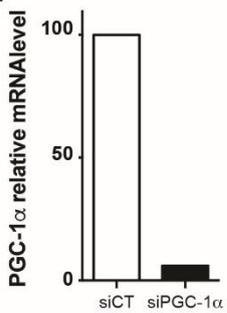


Figure S1: **A**, Expression of PGC-1 α in LNCaP and DU145 shPGC-1 α cell lines. **B**, Metabolites differentiating between control (shCtl) and PGC1- α silenced (shPGC1) DU145 cells (VIP>1.0, metabolites with VIP>1.5 are shown). Relative metabolite abundance is indicated in the bar, with red representing metabolite accumulation. **C**, Expression of HA-mPGC-1 α in PC3 cell lines overexpressing PGC-1 α . **D**, Migration assay (left) and invasion assay (right) in PC3 cells overexpressing PGC-1 α . **E**, Expression of PGC-1 α in LNCaP and DU145 transfected with siPGC-1 α . **F**, Migration assay in LNCaP (orange) and DU145 (blue) transfected with siPGC1 α . **G**, Expression of HA-mPGC-1 α in LNCaP and DU145 ShPGC-1 α cell lines. **H**, mRNA expression of PGC-1 α in human organoids transfected with siPGC-1 α . Data are shown as mean +/- S.E.M., *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. P values are calculated by Student's t-test.

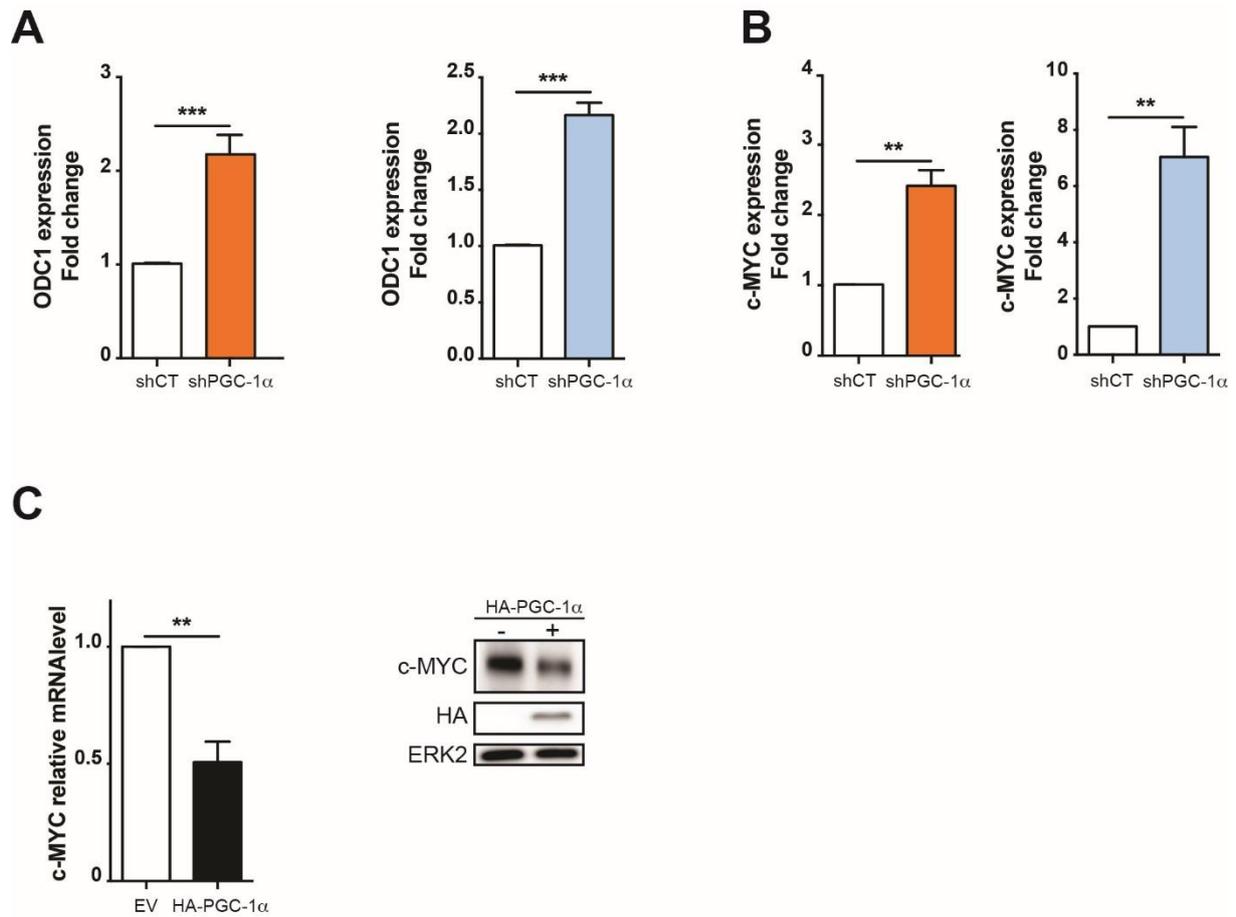


Figure S2: A, Expression of ODC1 mRNA in LNCaP (orange) and DU145 (blue) shPGC1 α cell lines. **B**, Expression of c-MYC mRNA in LNCaP (orange) and DU145 (blue) shPGC1 α cell lines. **C**, Expression of c-MYC mRNA (left) and a representative immunoblot of c-MYC expression in PC3 cells overexpressing PGC-1 α . Data are shown as mean \pm S.E.M., **P<0.01, ***P<0.001. P values are calculated by Student's t-test.

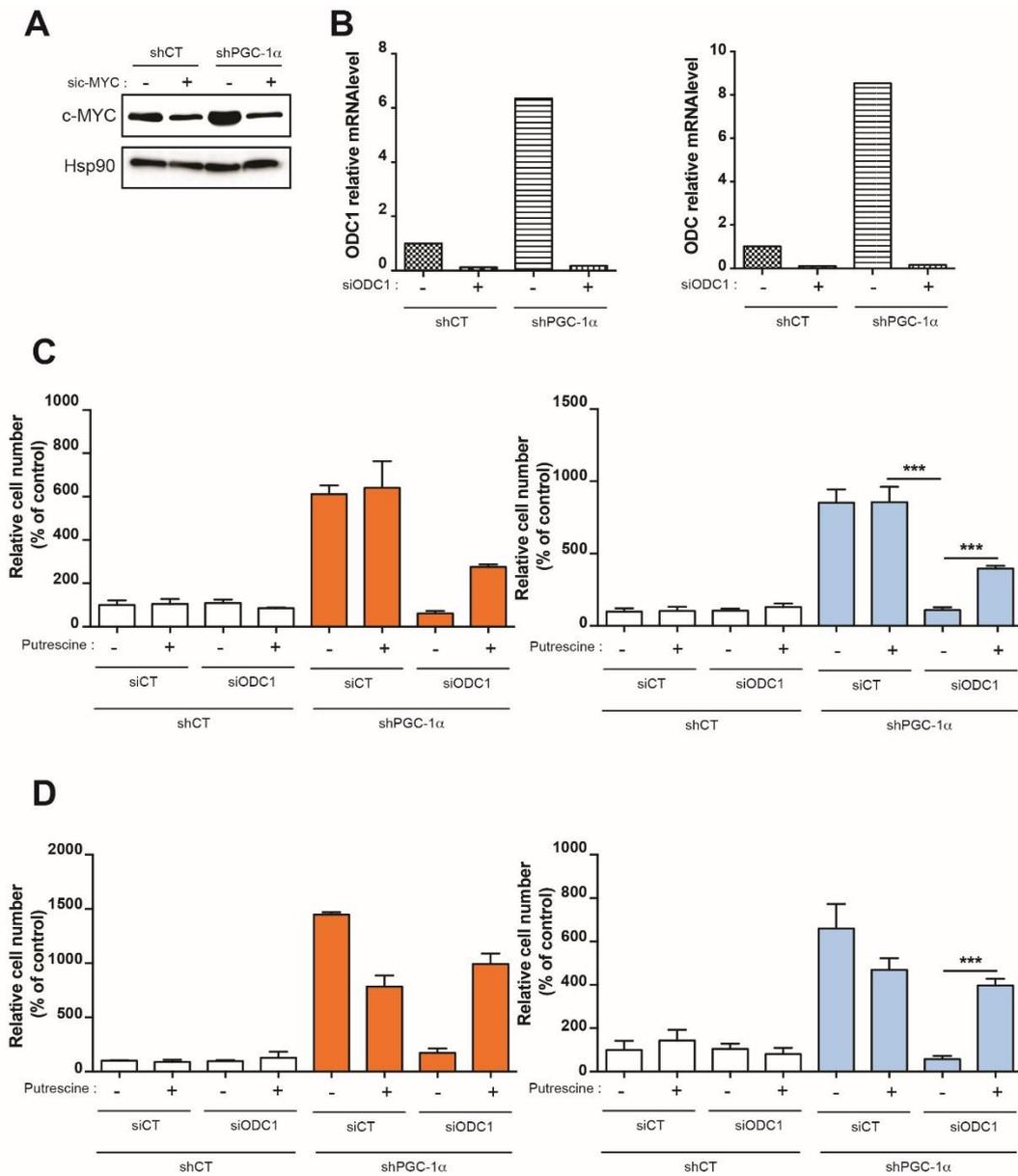


Figure S3: A, Expression of c-MYC in DU145 shPGC-1 α cells transfected with sic-MYC. **B**, Expression of ODC1 mRNA in LNCaP and DUA45 shPGC-1 α cells transfected with siODC1. **C**, Migration assay in LNCaP (orange) and DU145 (blue) shPGC-1 α cell lines transfected with siODC1. **D**, Invasion assay in LNCaP (orange) and DU145 (blue) shPGC-1 α cell lines transfected with siODC1. Data are shown as mean +/- S.E.M., ***P<0.001. P values are calculated by Student's t-test.

A

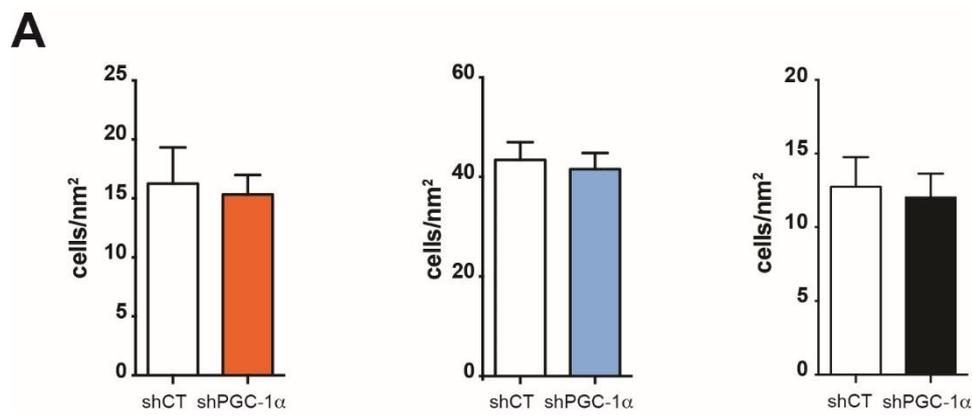


Figure S4: A, Quantification of the number of cells reaching the lung 30 minutes after tail vein injection of LNCaP (orange), DU145 (blue) and PC3 (black) cells.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats démontrent l'importance de PGC-1 α dans l'acquisition du phénotype métastatique des cellules tumorales de prostate et apporte une preuve de plus de l'existence de différences métaboliques entre les cellules peu agressives et celles avec un fort potentiel métastatique.

Nous démontrons que PGC-1 α est le régulateur d'une voie métabolique, la voie de synthèse des polyamines, contrôlée par l'oncogène c-MYC et capable de réguler l'agressivité du cancer de la prostate. En effet, les résultats obtenus montrent que la baisse de l'expression de PGC-1 α , dans deux lignées tumorales prostatiques peu agressives, rend ces cellules dépendantes de la voie de biosynthèse des polyamines. D'un point de vue moléculaire, l'activation de cette voie est due à l'augmentation de l'enzyme ODC via la surexpression de c-MYC. Une analyse bio-informatique de plusieurs bases de données et nos résultats sur des biopsies humaines démontrent qu'une faible expression de PGC-1 α est corrélée à des niveaux d'expressions élevés de c-MYC et ODC dans les tumeurs comparées aux tissus sains. Nos données mettent en évidence l'importance de l'axe PGC-1 α /c-MYC/ODC comme un marqueur potentiel pour le diagnostic des formes agressives et donc fatales du cancer de la prostate. Le CaP est le deuxième cancer en termes d'incidence et le troisième en termes de mortalité chez l'homme en France, principalement à cause des métastases. C'est donc un problème de santé public majeur. Si le dépistage de ce cancer à grande échelle permet de dépister les stades précoces, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de marqueur prédictif permettant de déterminer les tumeurs qui formeront des métastases. Un tel marqueur aurait l'avantage d'adapter au mieux les traitements actuels en fonction de l'agressivité du cancer.

En accord avec nos résultats et comme vu dans la partie « Rôles de PGC-1 α dans le cancer », des études récentes ont également montré que la diminution de l'expression de PGC-1 α induit l'agressivité des cellules tumorales et la formation de métastases (Liu et al., 2017; Luo et al., 2016a; Vazquez et al., 2013). Dans ces cancers PGC-1 α agit comme un suppresseur de tumeurs. Cependant, le rôle de PGC-1 α est différent dans le cancer du sein, où son expression favorise la formation de métastases (Andrzejewski et al., 2017; Audet-Walsh et al., 2016; LeBleu et al., 2014) et où les cellules tumorales mammaires expriment fortement PGC-1 α (LeBleu et al., 2014). Dans le sein, l'expression élevée de PGC-1 α apporte une flexibilité métabolique aux cellules cancéreuses mammaires via l'augmentation du métabolisme mitochondrial et de la consommation de glucose. Dans les cellules tumorales prostatiques, nous avons observé que la baisse de l'expression de PGC-1 α augmente le métabolisme de la glutamine et du glucose en plus de celui des polyamines (Figure 45). En effet, nous montrons que les cellules chez lesquelles nous diminuons l'expression de PGC-1 α consomment plus de glutamine et de glucose et produisent plus de glutamate et lactate. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression de c-MYC qui contrôle la glycolyse et la glutaminolyse.

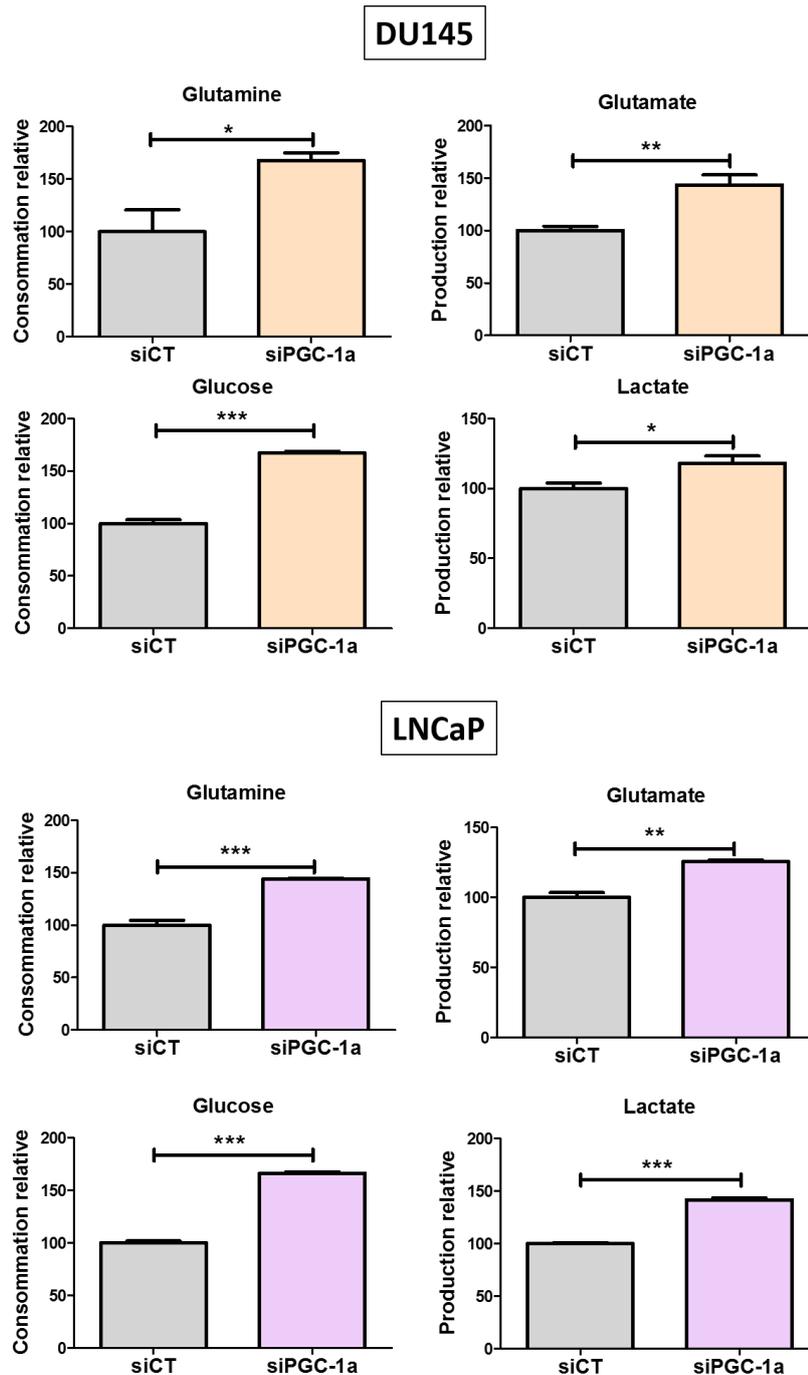


Figure 1 : Dosages de la consommation de glutamine et glucose et de la production de glutamate et lactate dans les DU145 et les LNCaP grâce à l'analyseur biochimique YSI2700. Ces deux lignées ont été traitées 48h avec des siARN contrôles ou des siARN contre PGC-1 α

L'importance des polyamines dans la prolifération du cancer de la prostate est bien établie (Bettuzzi et al., 2000; Gupta et al., 2000). De plus, il a récemment été montré que cette voie induit l'agressivité du CaP via l'activation du complexe mTORC1, qui est capable de stabiliser AMD1 (Zabala-Letona et al., 2017), l'enzyme régulant la production de AdoMetDC, le substrat indispensable à la biosynthèse des polyamines (cf. « Synthèse des polyamines »). Dans notre étude, l'inhibition de PGC-1 α n'affecte ni

l'activité de mTORC1 ni l'expression de AMD1 (Figure 46). Nous avons donc caractérisé une nouvelle voie métabolique régulée par PGC-1 α , la voie des polyamines, qui est en plus capable d'induire l'agressivité du CaP.

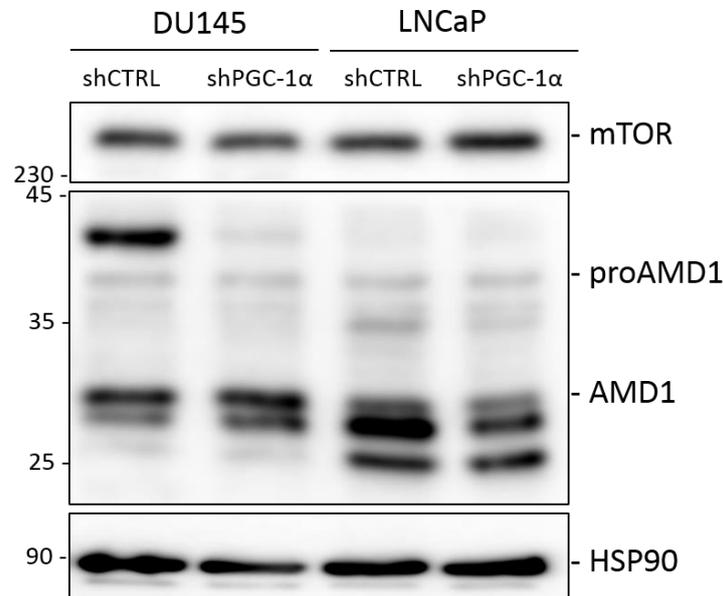


Figure 2 : Niveaux d'expressions de mTOR et AMD1 dans les cellules tumorales prostatiques sous exprimant PGC-1 α

Cette découverte ouvre le champ de la thérapie anticancéreuse. En effet, si aucune étude n'a envisagé PGC-1 α comme cible thérapeutique, de nombreuses études ont quant à elles montré le potentiel thérapeutique du ciblage des polyamines (cf. « ODC et cancers »), et en particulier de l'inhibition de ODC. Ces études démontrent que l'utilisation du DFMO, l'inhibiteur d'ODC, inhibe *in vitro*, la prolifération et l'agressivité de plusieurs lignées cellulaires différentes, entres autres, de leucémies (Luk et al., 1982), de poumons (Luk et al., 1981), de neuroblastomes (Saulnier Sholler et al., 2015), de seins (Meyskens and Gerner, 1999), de cancers cutanés (Meyskens and Gerner, 1999), de pancréas (Mohammed et al., 2014) et de prostate (Gerner and Meyskens, 2004). Ces résultats ont aussi été observés *in vivo*, où il a été montré que le DFMO est capable d'inhiber la croissance tumorale dans des modèles animaux. En particulier dans le cancer du pancréas, le DFMO inhibe de 40% la néoplasie intra-épithéliale pancréatique (Mohammed et al., 2014). De façon similaire, l'addition de DFMO dans l'eau de boisson entraîne une baisse significative de la croissance tumorale chez des souris TRAMP, un modèle animal transgénique de cancer de la prostate (Gupta et al., 2000). Même si des essais cliniques ont montré des effets modérés de l'effet thérapeutique du DFMO seul (Horn et al., 1987), de nouvelles preuves cliniques pertinentes soutiennent le bienfondé de l'utilisation du DFMO dans les thérapies anticancers et plusieurs essais cliniques sont en cours pour le traitement de plusieurs cancers (Alexiou et al., 2017). Ces essais combinent le DFMO soit avec des agents cytotoxiques soit avec des agents bloquant le transport des polyamines. La combinaison du DFMO avec des agents cytotoxiques ont

montré des résultats intéressants (Alexiou et al., 2015; Levin et al., 2000), en particulier dans le traitement du neuroblastome en combinaison avec l'étoposide (Saulnier Sholler et al., 2015). Cependant, les effets restent modérés comparés aux observations faites *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Ceci peut s'expliquer par le fait que même si le DFMO est un inhibiteur très efficace de la synthèse des polyamines endogènes chez les patients, les cellules sont capables de compenser la déplétion en polyamines endogènes, due au DFMO, en se servant des polyamines exogènes apportés en majorité par l'alimentation. De ce fait, des stratégies combinant régime faible en polyamine et/ou blocage de l'entrée des polyamines exogènes dans les cellules au DFMO peuvent être potentiellement intéressantes. En effet, il a été montré que l'utilisation d'un inhibiteur efficace du transport des polyamines, le AMXT 1501, présente une efficacité antitumorale synergique significative avec le DFMO dans des lignées cellulaires de sein, de mélanome, de carcinomes cutanés à cellules squameuses et dans les neuroblastomes (Burns et al., 2009; Grossi et al., 2016; Hayes et al., 2014; Muth et al., 2014; Samal et al., 2013). D'autres études ont évalué l'efficacité antitumorale de la combinaison du DFMO avec la déprivation en polyamines, constituée de l'association d'un régime sans polyamines et d'une décontamination partielle du tractus gastro-intestinal pour empêcher la formation de polyamines par les bactéries du microbiote. Ces traitements inhibent la croissance tumorale dans la prostate de plusieurs modèles animaux (Moulinoux et al., 1991). De plus, la déprivation en polyamines seule augmente l'efficacité des chimiothérapies antitumorales prostatiques et stimule l'activité des natural killer dans des souris (Chamaillard et al., 1993). L'efficacité de la déprivation en polyamines a aussi été testée chez l'homme. En effet, dans les cancers prostatiques hormono-résistants, cette déprivation en polyamines améliore la qualité de vie des patients via une baisse de la douleur et une augmentation de leur survie (Cipolla et al., 2010; Oredsson, 2003). Ces résultats semblent très prometteurs mais nécessitent plus d'investigations.

Nos travaux ont également permis de montrer que la baisse de l'expression de PGC-1 α conduit à l'augmentation de l'expression de l'oncogène c-MYC dans les cellules tumorales prostatiques, et de façon logique, la surexpression de PGC-1 α dans ces lignées diminue l'expression protéique de c-MYC. L'importance de cette balance entre PGC-1 α et c-MYC a récemment été montrée, dans le cancer du pancréas, comme contrôlant le phénotype métabolique des cellules souches cancéreuses pancréatiques et également leur sensibilité aux agents métaboliques ciblant la mitochondrie, comme la metformine (Sancho et al., 2015). Dans ces CSC pancréatiques, la faible expression de c-MYC permet une expression forte de PGC-1 α ce qui se traduit par de fortes capacités bioénergétiques des CSC pancréatiques (Sancho et al., 2015). Dans notre étude, nous montrons que la faible expression de PGC-1 α est corrélée à augmentation de l'expression de c-MYC dans les cellules tumorales prostatiques et que cela déclenche l'augmentation de la biosynthèse des polyamines et par conséquent rend le cancer

de la prostate plus agressif. Le lien entre c-MYC et biosynthèse des polyamines n'est pas nouveau car il a été montré que c-MYC régule de façon directe l'expression de ODC mais également que la glutaminolyse, dépendante de c-MYC, est directement liée à la régulation de la synthèse des polyamines durant l'activation des lymphocytes T (Wang et al., 2011). Nos résultats démontrent que PGC-1 α régule une voie intracellulaire intégrant c-MYC et ODC. Quand on sait que PGC-1 α est un coactivateur de transcription, la question suivante est de savoir par quel intermédiaire et mécanisme moléculaire PGC-1 α agit. Pour cela nous avons testé plusieurs facteurs de transcription connus pour interagir avec PGC-1 α , comme PPAR α , PPAR γ , ERR α , FOXO1, SIRT1. Ces résultats montrent que quand l'expression de PGC-1 α est diminuée, ERR α est requis pour augmenter l'expression de c-MYC. Donc, PGC-1 α inhibe l'expression de c-MYC par un mécanisme dépendant de son interaction avec ERR α . Ces résultats sont en accord avec ceux de récentes études, dans le cancer du sein et de la prostate, démontrant que ERR α est impliqué dans le développement tumoral et la formation de métastases (Andrzejewski et al., 2017; Fradet et al., 2016; Misawa and Inoue, 2015; Torrano et al., 2016).

En résumé, nos résultats renforcent le rôle central de l'implication des polyamines dans la progression du cancer de la prostate, mais révèlent également le lien entre PGC-1 α et cette voie métabolique. De ce fait, nos résultats ne décrivent pas seulement de nouvelles signatures pour la progression tumorale mais apportent également des outils pour identifier de nouvelles options thérapeutiques.

Ces résultats ouvrent également le voie vers d'autres interrogations et perspectives de recherche.

- Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de c-MYC par PGC-1 α . En effet, même si nos résultats indiquent que ERR α est impliqué dans cette régulation et que le promoteur de c-MYC possède un élément de réponse pour ERR α , son rôle doit être plus finement étudié afin de comprendre si l'inhibition de PGC-1 α entraîne le recrutement de ERR α sur le promoteur de c-MYC, et si oui, par quel intermédiaire.
- Dans un second temps, il serait intéressant de mettre en place des expériences *in vivo* reflétant de façon plus physiologique le développement du cancer de la prostate et surtout de la formation des métastases. Ces expériences permettront d'étudier l'implication de l'axe PGC-1 α /c-MYC/ODC dans la formation des métastases à partir de la tumeur primaire. Une expérience *in vivo* possible serait la greffe orthotopique de cellules tumorales marquées de prostate exprimant ou non PGC-1 α et de récupérer les cellules tumorales de la tumeur primaire, circulantes et des métastases. L'analyse du transcriptome et du métabolome dans ces trois catégories cellulaires permettrait de confirmer nos résultats obtenus *in vivo*. Une autre condition expérimentale possible serait de traiter les souris, injectées avec des cellules

tumorales exprimant ou non PGC-1 α , avec du DFMO dans l'eau de boisson et/ou un régime faible en polyamines, dans le but d'observer la croissance tumorale primaire et l'apparition des métastases.

- Comme PGC-1 α est un régulateur majeur du métabolisme mitochondrial, il serait également intéressant de faire des analyses fonctionnelles métaboliques plus précises, grâce au Seahorse, qui permettraient de comprendre si et comment les cellules s'adaptent et compensent la perte de PGC-1 α .
- Aux vues de l'implication de PGC-1 α dans la résistance aux traitements pour d'autres types de cancers (cf. « Rôles de PGC-1 α dans le cancer »), il serait intéressant de déterminer si pour le cancer de la prostate, PGC-1 α pourrait également être impliqué dans ces résistances qui apparaissent principalement après les hormonothérapies et conduisent à des CaP résistants incurables et fatales (cf. « Traitement du cancer de la prostate »).

ANNEXES

Sirtuin 7: a new marker of aggressiveness in prostate cancer

Romain Haider^{1,2,*}, Fabienne Massa^{1,*}, Lisa Kaminski¹, Stephan Clavel¹, Zied Djabari¹, Guillaume Robert¹, Kathiane Laurent¹, Jean-François Michiels³, Matthieu Durand², Jean-Ehrland Ricci¹, Jean-François Tanti¹, Frédéric Bost^{1,**} and Damien Ambrosetti^{3,**}

¹Université Côte d'Azur, C3M-Inserm U1065, Nice, France

²Urology Department, CHU Nice, Nice, France

³Pathology Department, CHU Nice, Nice, France

* Co-first authors

** Co-last authors

Correspondence to: Frédéric Bost, **email:** bost@unice.fr

Keywords: prostate cancer, sirtuins, metastasis, metabolism, cell migration

Received: March 22, 2017

Accepted: July 25, 2017

Published: August 24, 2017

Copyright: Haider et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Predictive biomarkers for advanced prostate cancer (PCa) are still missing. The sirtuin 7 (SIRT7) has been linked to tumorigenesis but its role in prostate cancer is poorly documented. To determine if SIRT7 can be a biomarker for aggressive prostate cancer and plays a role in PCa aggressiveness. We analyzed the expression of SIRT7 by immunohistochemistry in 57 patients comparing healthy with adjacent cancer tissue. SIRT7 levels were significantly elevated in tumors and its expression was positively associated with the grade. We also demonstrated that the knock down of SIRT7 decreased the migration of DU145 and PC3 cells (two androgen-independent prostate cancer cell lines) whereas the overexpression of the native protein but not the mutated form increased the cell migration and the invasion of the poorly aggressive prostate cancer cell line LNCaP. Finally, we also showed that SIRT7 overexpression induced the resistance to docetaxel. Our results demonstrate that SIRT7 promotes prostate cancer cell aggressiveness and chemoresistance and suggest that SIRT7 is a good predictive biomarker of PCa aggressiveness.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the leading cause of death by cancer in men. Although effective surgical and radiation treatments exist for localized PCa, metastatic PCa remains mostly incurable. A major issue is to predict whether localized PCa will become metastatic, thus, markers of aggressiveness in PCa are needed. The process of metastasis is complex, it involves multiple biological processes, including angiogenesis, local migration and invasion, of tumor cells [1]. PCa cell migration and invasion are regulated by numerous proteins including the transcription factor Slug/snail, the glycoprotein fibronectin (FN) and the intermediate filament Vimentin

[2]. For instance, fibronectin has been shown to induce the expression of the matrix metalloproteinases expression 2 [3] and blocking FN with anti-FN antibodies resulted in a significant decrease in adhesion of LNCaP prostate cancer cells [4].

Sirtuin 7 (SIRT7) belongs to the sirtuin family. It is a highly conserved protein family with seven members in mammals (SIRT 1-7). Sirtuins are NAD⁺ dependent histone deacetylase and also, for some of them, NAD⁺-dependent ADP ribosyltransferases. SIRT7 is the latest discovered sirtuin and its function remains poorly understood. SIRT7 deficiency in mice leads to a lifespan decrease, cardiac hypertrophy [5], hepatic steatosis [6, 7], and deafness [8]. Among the known substrates of SIRT7

are PAF53, NPM1, GABP- β 1, but more importantly, SIRT7 catalyzes the deacetylation of lysine 18 on histone H3 (H3K18), a marker of cancer aggressiveness and poor prognosis [9]. It has been shown that the deacetylation of H3K18 by repressing a tumor suppressive program maintains the transformed state of cancer [10]. Consequently, the downregulation of SIRT7 noticeably reduces tumor growth in mice models and inhibits the properties of cancer cells such as anchorage-independent growth [10].

In this article, we studied whether SIRT7 has a clinical relevance in PCa progression. We analyzed SIRT7 expression in PCa and we studied the role of the protein in PCa aggressiveness.

RESULTS

SIRT7 protein expression is higher in PCa

A total of 57 surgical specimens of patients were included. Immunohistochemistry analysis on paraffin was achievable in 100% of cases. Clinico-pathological data are detailed in Table 1. Mean age of patients were 66.4 (+/-5.1) years old and mean PSA were 10.6 (+/-8.2) ng/ml. We reported 23, 21 and 13 patients with index

lesions of Gleason Score 6, 7 and ≥ 8 , respectively. SIRT7 immunohistochemical analysis evaluation is detailed in the Figure 1 and Supplementary Figure 1. There is no SIRT7 expression in healthy prostate tissue (Figure 1A, panel A) while the expression of SIRT7 was detected in tumor cells as illustrated by a nuclear staining of tumor cells in the prostate adenocarcinoma area (Figure 1A panel B). On the edge of the tumor, healthy glands are not stained and the nucleolus of tumor cells are stained (Figure 1A panel C). Of note, there is a clear nucleolar reinforcement of SIRT7 in some tumor regions independently of the grade (black arrow in Figure 1A panel D). The correlation between Allred Score and Gleason Score of index lesion in each surgical specimen was analyzed. An association was found between SIRT7 expression and tumor grade with a higher mean Allred Score in the Gleason Score 7 tumors ($p = 0.035$) and Gleason Score ≥ 8 ($p = 0.015$) compared with Gleason Score 6 tumors (Figure 1B). No statistically significant differences in Allred Score was found between Gleason Score 7 and > 8 . The analysis of the index lesion Allred Score distribution according to the absence (0) or the presence (1) of prostatic capsular invasion in each surgical specimen revealed that the mean Allred Score was higher when there was a prostatic capsular invasion ($p = 0.02$) (Figure 1C).

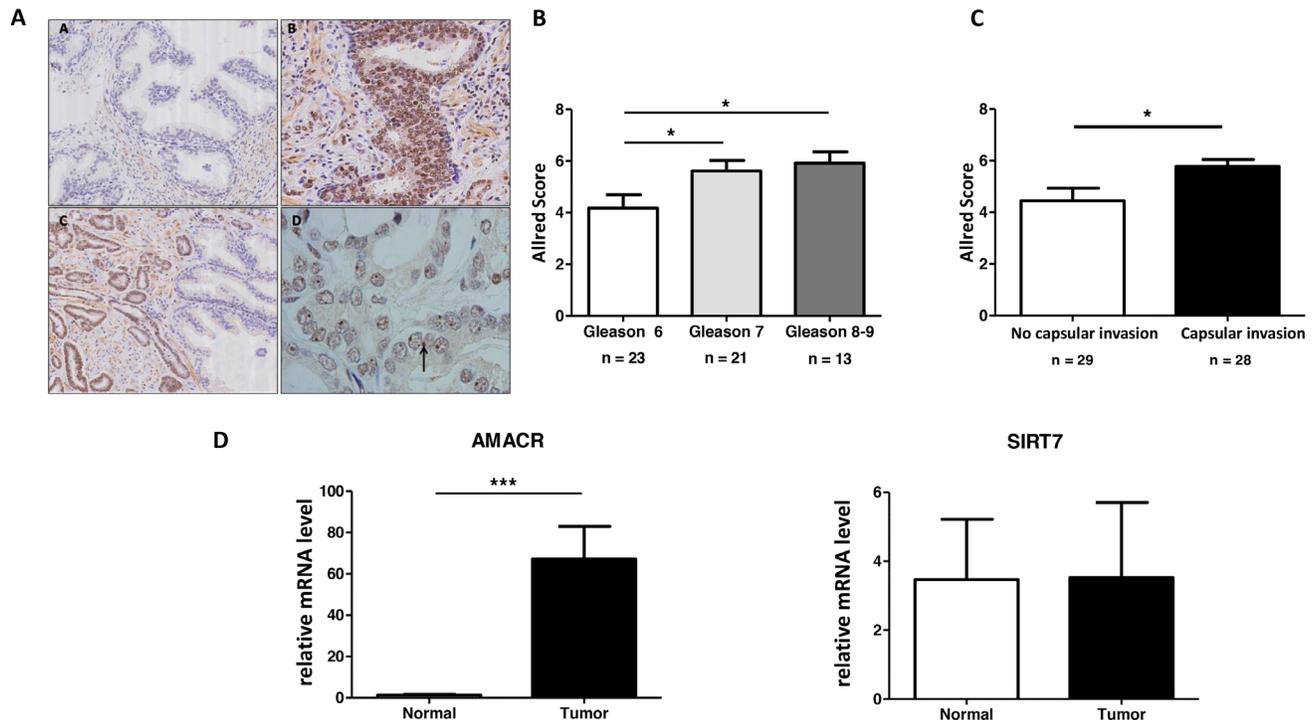


Figure 1: SIRT7 is overexpressed in PCa. (A) Sirtuin 7 immunohistochemical staining on human prostate tissue. (A.a) Healthy prostate, absence of staining. (A.b) Prostate adenocarcinoma, nuclear staining of tumor cells. (A.c) On the edge of the tumor, no staining of healthy glands, nuclear staining of tumor cells. (A.d) Nucleolar staining of anti-SIRT7 antibody within a tumor area (arrow). (B) Association between All red Score and Gleason Score of index lesion in each surgical specimen. (C) Analysis of index lesion All red Score distribution according to the absence or the presence of prostatic capsular invasion in each surgical specimen. (D) Analysis of SIRT7 and AMACR mRNA expression in prostatic tumor cells.

Table 1: Patients characteristics of the 57 patients with advanced PCa

	n (%)
Patients	57
Age (yo)	
median	68 [51–74]
mean	66.4 (+/-5.1)
PSA (ng/ml)	
median	7.9 [3.2-39]
mean	10.6 (+/-8.2)
D’Amico Score	
Lowrisk	19 (33.3)
Intermediaterisk	18 (31.6)
High risk	20 (35.1)
Tumor stage	
pT2a	3 (5.3)
pT2b	1 (1.7)
pT2c	26 (45.6)
pT3a	22 (38.6)
pT3b	5 (8.8)
Gleason Score of Index Lesion	
Gleason 6	23 (40.3)
Gleason 7	21 (36.9)
Gleason ≥ 8	13 (22.8)

We extracted total mRNA from paraffin embedded tissues and performed a RT-qPCR analysis. The mRNA expression of SIRT7 and AMACR (an enzyme strongly expressed in PCa) are presented in Figure 1D. As expected, we found an up-regulation of AMACR expression in the tumor compared to the healthy gland whereas the expression of SIRT7 mRNA did not vary. This result suggests that the increase in SIRT7 expression in prostate cancer detected by immunohistochemical analysis could be due to a post transcriptional regulation.

Altogether, we demonstrated that the protein level of SIRT7 is significantly higher in PCa and it positively correlated with the grade of the lesion.

The knockdown of SIRT7 decreased prostate cancer cells migration

To determine the role of SIRT7 in PCa, we analyzed the expression of SIRT7 and the acetylation of H3K18

in PCa cell lines (two androgen-dependent cell lines: LNCaP and 22RV and two androgen-independent cells lines DU145 and PC3) and one normal prostate epithelial cell line P69. The five cell lines have the same level of expression of SIRT7 and H3K18 is lower in PC3, the more aggressive cell line (Figure 2A). To study the potential role of SIRT7 in prostate cancer cell viability and aggressiveness, we downregulated the expression of SIRT7 in DU145 and PC3 cells, using two siRNA targeting two different regions of SIRT7 (Figure 2B and Supplementary Figure 2A). The depletion of SIRT7 did not affect the viability of the cells (Figure 2C) but it significantly inhibited the migration of both cell lines (Figure 2D and Supplementary Figure 2B). Indeed, the knockdown of SIRT7 led to the inhibition of the migration by 48% and 68 % in DU145 and PC3 respectively, suggesting that SIRT7 was implicated in prostate cancer cell migration and may participate in PCa aggressive phenotype.

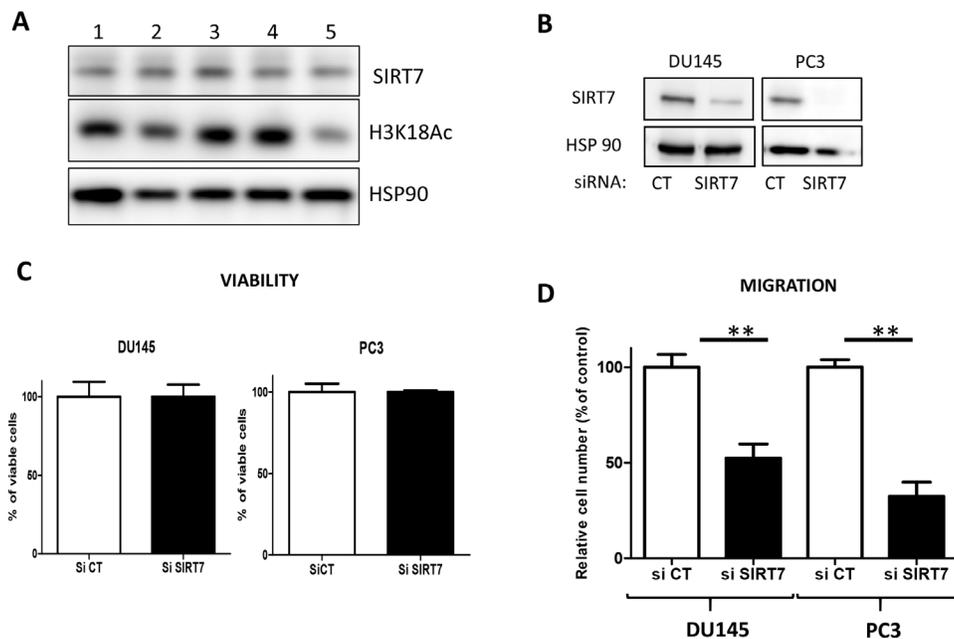


Figure 2: The knockdown of SIRT7 inhibits DU145 cell migration. (A) Western blot analysis of SIRT7 and acetylated H3K18 in LNCaP (1), P69 (2), 22RV (3), DU145 (4) and PC3 (5) cells. (B) Western blot was performed to analyze SIRT7 expression in DU145 and PC3 cells transfected with siRNA. (C) Cell viability of DU145 and PC3 cells transfected with control SiRNA (SiCT) and SIRT7 siRNA (siSIRT7). The data represents three independent experiments with sem (D) Migration assay: the graph represents the number of cells/mm² migrating across the boyden chamber in three independent experiments performed in triplicate as described in the materials and methods. (Student t-Test ** $p < 0.01$).

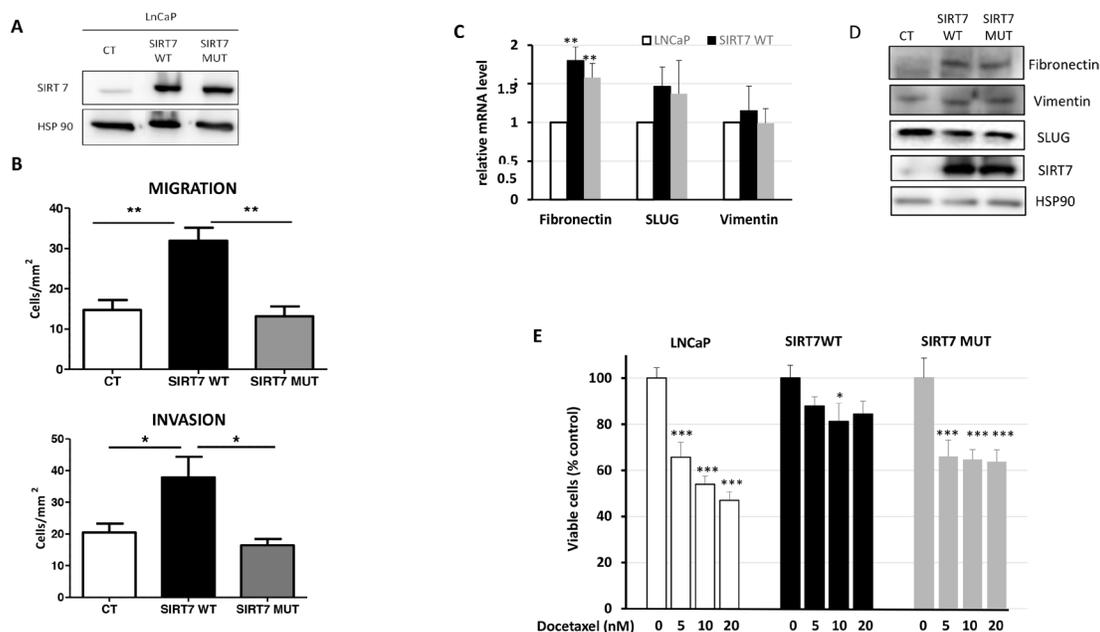


Figure 3: The overexpression of SIRT7 promotes LNCaP aggressiveness and chemoresistance. (A) Western blot representing the expression of SIRT7 in the different clones: Control cells (CT), cells expressing SIRT7wt and SIRT7mut. (B) The graphs represent the number of cell/mm² migrating across the boyden chamber in a migration and invasion assay. Three independent experiments were performed in triplicate as described in the materials and methods. (C) q-PCR of the expression of fibronectin, Slug and vimentin in the different populations of cells. The graph represents the results of five independent experiments. (D) Western blot showing the expression of fibronectin, vimentin, Slug, SIRT7 and HSP90 in SIRT7wt and SIRT7mut. (E) Viability assay in the different clones treated for 72h with the indicated concentrations of docetaxel. The graph represents the mean of four independent experiments performed in quadruplicate. (Student t-Test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Overexpression of SIRT7 increased prostate cancer cell aggressiveness

To determine if there is a direct relationship between the level of SIRT7 and PCa cell aggressiveness, we overexpressed SIRT7 in the poorly aggressive, androgen-dependent human prostate cancer cell line LNCaP. We generated stable cell lines expressing wild-type SIRT7 (SIRT7wt) or a mutated form of SIRT7 (SIRT7mut) lacking the deacetylase activity of the sirtuin (Figure 3A). The constitutive expression of SIRT7wt and SIRT7mut did not affect clonogenic growth in a colony formation assay nor cell viability (Supplementary Figure 3A, 3B). In contrast, overexpression of SIRT7wt led to a significant increase in cell migration and invasion by 54% and 45% respectively (Figure 3B). Interestingly, the expression of the mutated form restored the wild-type phenotype, suggesting that the deacetylase activity of SIRT7 is implicated in the aggressiveness of prostate cancer cells. We then analyzed the expression of markers of the Epithelial Mesenchymal Transition (EMT). We showed that the expression of slug/snail and vimentin do not change in cell lines expressing SIRT7wt and SIRT7mut. On the contrary, we observed an increase of fibronectin mRNA and protein levels (Figure 3C, 3D).

Aggressiveness is associated with resistance to chemotherapy, thus, we assessed the implication of SIRT7 in the sensitivity to Docetaxel, the major chemotherapeutic agent for the treatment of prostate cancer. Increasing concentration of Docetaxel (5, 10 and 20nM) significantly decreased cell viability of the control cells and of the cells expressing SIRT7mut after 72h of treatment (Figure 3E). In contrast, it had no significant impact on the viability of SIRT7wt cells, suggesting that SIRT7 may be implicated in the resistance to Docetaxel. In conclusion, our data demonstrated that SIRT7 overexpression through its deacetylase activity confers aggressiveness and resistance to chemotherapy in LNCaP cells.

DISCUSSION

We have demonstrated that SIRT7 plays an important role in the aggressiveness of prostate cancer. Our conclusion is based on clinical and experimental data. Firstly, the level of SIRT7 is significantly higher in PCa tumors and expression level is correlated with the grade of the tumor. Secondly, overexpression of SIRT7 in PCa cells promotes migration and invasion. To date few studies have investigated the expression and the role of SIRT7 in cancer, however, all sirtuins are involved in cancer development through different mechanisms. Generally, sirtuins are considered to be tumor suppressors, but they may also act as tumor promoters particularly in advanced cancers [11–13]. Elevated levels of Sirt7 have been previously observed in several cancers including breast, liver, pancreas and colon

[14–17]. SIRT7 is also associated with poor prognosis in gastric, lung, cervical and hepatocellular carcinoma [15, 18–20]. In prostate cancer, the only available data were obtained from the analysis of Cancer Genomics databases of epithelial cancers. In this study, SIRT7 was found elevated in the advanced stages of prostate cancer and Sirt7 amplification was associated with metastasis and poor prognosis [21]. Our immunohistochemical analysis of matched tumor and normal prostate tissue on 57 patients clearly demonstrated that the level of SIRT7 is increased in tumor. Moreover, we showed that high expression of SIRT7 is associated with capsular invasion an indicator of poor prognosis.

Metastasis is a process which requires cancer cell migration and invasion of the adjacent normal tissue. In accordance with a role of SIRT7 in prostate cancer progression, we showed that the knockdown of SIRT7 decreased cancer cell migration but did not alter cell viability. Like our findings, Malik et al. also demonstrated that SIRT7 depletion led to a reduction of PC3 cells migration while it did not interfere with cancer cell proliferation [21]. On contrary, inhibition of SIRT7 has been shown to stop proliferation and trigger apoptosis through the downregulation of the RNA polymerase 1 in NIH-3T3, HEK-293 and U-2 OS cells [22]. Here, we directly associated deacetylase activity of SIRT7 with the aggressiveness of cancer cells since the mutated form of SIRT7, a variant bearing a point mutation in the catalytic site of the protein, did not promote cancer cell migration and invasiveness, unlike the native protein. The upregulation of SIRT7 has been shown to induce ovarian cancer cell migration [23]. Similar observations were done in colorectal cancer cells where the overexpression of SIRT7 increased cell motility and invasiveness associated with an increase of mesenchymal markers [17]. The aggressiveness of the SIRT7 overexpressing cells is consistent with the increase of FN and slug/snail mRNA expression. The increase observed in the cells expressing the mutated protein demonstrates that FN and slug/snail are not sufficient to promote aggressiveness.

Our findings also suggest that the deacetylase activity of SIRT7 is implicated in the resistance to chemotherapy since overexpression of the SIRT7wt but not SIRT7mut induced the resistance of the cells to docetaxel. The role of sirtuins in the resistance to chemotherapy is poorly documented. However, Kiran et al. have demonstrated that the knockdown of SIRT7 renders osteosarcoma cells sensitive to doxorubicin and its overexpression attenuated doxorubicin mediated DNA damage in accordance with our results [24]. In contrast, the activation of SIRT1 has been shown to sensitize breast cancer cells to tamoxifen via FoxO1 and the upregulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 [25]. In prostate cancer cells SIRT1 inhibition sensitized DU145 to cisplatin. [26]. On the contrary,

SIRT1 facilitated chemoresistance in pancreatic cancer cells and the inhibition of SIRT1 sensitizes to gemcitabine [27].

In conclusion, our study demonstrates that SIRT7 is a new promising marker for aggressive prostate cancer. A study including a larger number of patients and a longer follow-up including patient's survival will help to understand the role of SIRT7 in PCa progression.

MATERIALS AND METHODS

Immunohistochemistry

We prospectively collected clinical and pathological data from consecutive consenting patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer between 2014 and 2015. Surgical specimens underwent conventional histological processing and examination according to the Stanford protocol. Additionally, in each tissue section, areas of adenocarcinoma were identified and graded according to Gleason Score. Then, the Index lesion corresponding to the highest Gleason Score was studied by immunohistochemistry, using anti-SIRT7 antibody (Prestige Antibodies®, SIGMA-ALDRICH®). SIRT7 expression was analyzed in a qualitative manner by evaluating positivity or negativity of expression, comparing healthy and tumor areas, and in a quantitative manner. To quantify the expression of SIRT7 we used the Allred Score (0 to 8) [10] obtained by adding proportion of staining tumor (0 to 5) and signal intensity (0 to 3). The quantification was done by determining the average intensity and proportion of nuclei labelled including the nucleolus.

In each index lesion, the Allred Score and Gleason Score were compared using the Student t test (significance with $p < 0.05$). The analysis was performed blindly by two independent investigators.

Cell lines and culture conditions

The cell lines were purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA). The LNCaP cells were cultured in RPMI 1640 medium, the DU145 and PC3 cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 25 mmol/L glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 units/mL penicillin at 37°C and 5% CO₂.

Stable clones expressing SIRT7 were established as follow: cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) with empty vectors, the plasmids expressing wt-SIRT7 or the mutated form of SIRT7 that displays no deacetylase activity (SIRT7 H187Y), a Kind gift of Pr K Chua (Stanford, USA) [9]. Once the clonal population was selected with puromycin (1 µg/ml), cells were characterized to validate the overexpression of SIRT7.

Cell counting

Cells were seeded in 96 well plates, after the indicated time cells were dissociated with trypsin and counted using Flow cytometry using Dapi to discriminate dead cells from live cells.

Cell viability assay

Cells were seeded in 96 well-plate and treated with different concentrations of Docetaxel. After 3 days, XTT (Promocell, Germany) was added to the cells and the optical density was measured.

Cell transfection with siRNA

Cells were transfected with two siRNA targeting different regions of SIRT7: siRNA SIRT7, ID 116146 (Applied biosystem, AMBION, Carlsbad, CA) or ON Target plus siRNA smart Pool (Dharmacon, GE HealthCare, Lafayette, CO) or a negative control siRNA (using Lipofectamine RNAi max (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 48 h of transfection, cells were counted and proteins were extracted.

Colony formation assay

LNCaP cells stably expressing control or various SIRT7 constructs (103 cells/ml) growing in semisolid methyl cellulose medium. MethoCult H4100 was used for cell lines (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada). Colonies were detected after 10 days of culture by adding 1 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent and were scored by Image J quantification software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Migration and invasion assays in boyden chambers

Boyden chambers with filter inserts coated with fibronectin (10 µg/ml) and 8-µm pores (BD Bioscience) were used to quantify cell migration. After an overnight serum starvation, 12 x 10⁴ cells were seeded in the upper chamber in serum free medium. The lower chamber contained complete 10% FBS medium. Cell migration was determined after 6h by counting all cells in five randomly selected counting areas at the lower surface of the filter. Cells on the upper surface were removed with a cotton swab; filters were fixed with PFA 4% and incubated with a DAPI solution (2mg/ml) to label cell nuclei. Nuclei were counted and analyzed using Image J software. For invasion experiments, the inserts were coated with 25 µg/µl of Matrigel (BD Bioscience) and cells were counted after 24h.

Western blotting analysis

Cell extracts were prepared using lysis buffer as described previously [11]. Immunoblotting was performed with antibodies against SIRT7 (Merck-Millipore, Molsheim, France), HSP90 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and Acetyl Histone H3K18 (Euromedex, France).

RNA extraction

Total RNA were prepared from the paraffin section with the FFPE RNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the procedure of the manufacturer.

Total RNA from the cells were extracted with Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as previously described [11].

Real time PCR

The qPCR was conducted using a Step-one Real Time PCR system with TaqMan Fast Universal Master mix or SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies SAS). For RNA from paraffin section we used the specific TaqMan gene expression assays for human SIRT7 (Hs01034735), AMACR (Hs00204885) and two housekeeping genes: RPLP0 (Hs99999902) and 18s (Hs99999901). For RNA extracted from cells, we used SYBER green based assay, with previously designed oligonucleotides specific for human Fibronectin, Slug/Snail and vimentin (sequence available upon request).

Author contributions

RH, FM, LK, ZD, GR and KL conducted the experiments. JFM,MD and DA provided the material. RH, FM, SC, ZD, FB and DA analyzed the results. RH, FM, LK, SC, JER and JFT corrected and read critically the manuscript. FB and DA directed the work.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

This research was supported by the Foundation ARC and the Agence Nationale de la Recherche (LABEX SIGNALIFEANR-11-LABX-0028-01). RH and ZD were supported by the foundation ARC, FM by the ITMO-Cancer, LK by the French ministry of research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mireille Cormont for carefully reading the manuscript. This research was supported by the Foundation ARC and the Agence Nationale de la Recherche (LABEX SIGNALIFEANR-11-LABX-0028-01). RH and ZD were supported by the foundation ARC, FM by the ITMO-Cancer, LK by the French ministry of research. FB and JFT are CNRS investigators.

REFERENCES

1. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:265-273.
2. Ware KE, Somarelli JA, Schaeffer D, Li J, Zhang T, Park S, Patierno SR, Freedman J, Foo WC, Garcia-Blanco MA, Armstrong AJ. Snail promotes resistance to enzalutamide through regulation of androgen receptor activity in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:50507-50521. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10476>.
3. Moroz A, Delella FK, Lacorte LM, Deffune E, Felisbino SL. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 430:1319-1321.
4. Albrecht M, Renneberg H, Wennemuth G, Moschler O, Janssen M, Aumuller G, Konrad L. Fibronectin in human prostatic cells *in vivo* and *in vitro*: expression, distribution, and pathological significance. *Histochem Cell Biol*. 1999; 112:51-61.
5. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*. 2008; 102:703-710.
6. Shin J, He M, Liu Y, Paredes S, Villanova L, Brown K, Qiu X, Nabavi N, Mohrin M, Wojnoonski K, Li P, Cheng HL, Murphy AJ, et al. SIRT7 represses Myc activity to suppress ER stress and prevent fatty liver disease. *Cell Rep*. 2013; 5:654-665.
7. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, et al. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab*. 2014; 19:712-721.
8. Ryu D, Jo YS, Lo Sasso G, Stein S, Zhang H, Perino A, Lee JU, Zeviani M, Romand R, Hottiger MO, Schoonjans K, Auwerx J. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABPbeta1 controls mitochondrial function. *Cell Metab*. 2014; 20:856-869.
9. Kiran S, Anwar T, Kiran M, Ramakrishna G. Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: rise of the Seventh Sirtuin! *Cell Signal*. 2015; 27:673-682.

10. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*. 2012; 487:114-118.
11. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Yu TK, Kim KM, Park HS, Lee JH, Moon WS, Lee H, Chung MJ, Jang KY. Expression of SIRT1 and DBC1 is associated with poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2013; 8:e74738.
12. Jiang K, Lyu L, Shen Z, Zhang J, Zhang H, Dong J, Yan Y, Liu F, Wang S. Overexpression of SIRT1 is a poor prognostic factor for advanced colorectal cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2014; 127:2021-2024.
13. Lu W, Zuo Y, Feng Y, Zhang M. SIRT5 facilitates cancer cell growth and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2014; 35:10699-10705.
14. Aljada A, Saleh AM, Alkathiri M, Shamsa HB, Al-Bawab A, Nasr A. Altered sirtuin 7 expression is associated with early stage breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015; 9:3-8.
15. Lee HS, Jung W, Lee E, Chang H, Choi JH, Kim HG, Kim A, Kim BH. SIRT7, H3K18ac, and ELK4 immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *J Pathol Transl Med*. 2016; 50:337-344.
16. McGlynn LM, McCluney S, Jamieson NB, Thomson J, MacDonald AI, Oien K, Dickson EJ, Carter CR, McKay CJ, Shiels PG. SIRT3 & SIRT7: Potential novel biomarkers for determining outcome in pancreatic cancer patients. *PLoS One*. 2015; 10:e0131344.
17. Yu H, Ye W, Wu J, Meng X, Liu RY, Ying X, Zhou Y, Wang H, Pan C, Huang W. Overexpression of sirt7 exhibits oncogenic property and serves as a prognostic factor in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2014; 20:3434-3445.
18. Shi H, Ji Y, Zhang D, Liu Y, Fang P. MicroRNA-3666-induced suppression of SIRT7 inhibits the growth of non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2016; 36:3051-3057.
19. Singh S, Kumar PU, Thakur S, Kiran S, Sen B, Sharma S, Rao VV, Poongothai AR, Ramakrishna G. Expression/localization patterns of sirtuins (SIRT1, SIRT2, and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. *Tumour Biol*. 2015; 36:6159-6171.
20. Zhang S, Chen P, Huang Z, Hu X, Chen M, Hu S, Hu Y, Cai T. Sirt7 promotes gastric cancer growth and inhibits apoptosis by epigenetically inhibiting miR-34a. *Sci Rep*. 2015; 5:9787.
21. Malik S, Villanova L, Tanaka S, Aonuma M, Roy N, Berber E, Pollack JR, Michishita-Kioi E, Chua KF. SIRT7 inactivation reverses metastatic phenotypes in epithelial and mesenchymal tumors. *Sci Rep*. 2015; 5:9841.
22. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 2006; 20:1075-1080.
23. Wang HL, Lu RQ, Xie SH, Zheng H, Wen XM, Gao X, Guo L. SIRT7 exhibits oncogenic potential in human ovarian cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16:3573-3577.
24. Kiran S, Oddi V, Ramakrishna G. Sirtuin 7 promotes cellular survival following genomic stress by attenuation of DNA damage, SAPK activation and p53 response. *Exp Cell Res*. 2015; 331:123-141.
25. Choi HK, Cho KB, Phuong NT, Han CY, Han HK, Hien TT, Choi HS, Kang KW. SIRT1-mediated FoxO1 deacetylation is essential for multidrug resistance-associated protein 2 expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Mol Pharm*. 2013; 10:2517-2527.
26. Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373:423-428.
27. Zhang JG, Hong DF, Zhang CW, Sun XD, Wang ZF, Shi Y, Liu JW, Shen GL, Zhang YB, Cheng J, Wang CY, Zhao G. Sirtuin 1 facilitates chemoresistance of pancreatic cancer cells by regulating adaptive response to chemotherapy-induced stress. *Cancer Sci*. 2014; 105:445-454.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

The energy disruptor metformin targets mitochondrial integrity via modification of calcium flux in cancer cells

Camille Loubiere^{1,2}, Stephan Clavel^{1,2}, Jerome Gilleron^{1,2}, Rania Harisseh³, Jeremy Fauconnier⁴, Issam Ben-Sahra⁵, Lisa Kaminski^{1,2}, Kathiane Laurent^{1,2}, Stephanie Herkenne^{6,7}, Sandra Lacas-Gervais⁸, Damien Ambrosetti⁹, Damien Alcor^{1,2}, Stephane Rocchi^{2,10}, Mireille Cormont^{1,2}, Jean-François Michiels⁹, Bernard Mari¹¹, Nathalie M. Mazure¹², Luca Scorrano^{6,7}, Alain Lacampagne⁴, Abdallah Gharib³, Jean-François Tanti^{1,2} & Frederic Bost^{1,2}

Mitochondrial integrity is critical for the regulation of cellular energy and apoptosis. Metformin is an energy disruptor targeting complex I of the respiratory chain. We demonstrate that metformin induces endoplasmic reticulum (ER) stress, calcium release from the ER and subsequent uptake of calcium into the mitochondria, thus leading to mitochondrial swelling. Metformin triggers the disorganization of the cristae and inner mitochondrial membrane in several cancer cells and tumors. Mechanistically, these alterations were found to be due to calcium entry into the mitochondria, because the swelling induced by metformin was reversed by the inhibition of mitochondrial calcium uniporter (MCU). We also demonstrated that metformin inhibits the opening of mPTP and induces mitochondrial biogenesis. Altogether, the inhibition of mPTP and the increase in mitochondrial biogenesis may account for the poor pro-apoptotic effect of metformin in cancer cells.

Maintaining mitochondrial structural integrity is essential for cells to produce energy, overcome environmental stresses such as nutrient deprivation and hypoxia and respond to genotoxic agents, including chemotherapy. Consequently, the disruption of mitochondrial metabolism sensitizes cells to apoptosis and opens new therapeutic avenues in cancer treatment. Metformin is a biguanide and a widely prescribed anti-diabetic agent, but it is also a metabolic disruptor that specifically targets the metabolism of cancer cells¹. Several reports have shown that this drug inhibits cancer cell growth and has antitumoral effects^{2,3}. Biguanides inhibit the activity of the mitochondrial respiratory chain complex I, thus leading to energetic stress due to the decrease in ATP synthesis⁴⁻⁶. Decreased intracellular ATP leads to the activation of the energy sensitive kinase AMP-activated protein kinase (AMPK) and the inhibition of mechanistic target of rapamycin (mTORC1), which regulates cell growth and cell proliferation and is frequently hyperactivated in tumors. Despite the well-characterized effects of biguanides on the respiratory chain, their effects on the mitochondrial ultrastructure are poorly understood.

¹Inserm U1065, C3M, Team Cellular and Molecular Physiopathology of Obesity and Diabetes, Nice, France. ²Université Nice Côte d'Azur, Inserm, Nice, France. ³Inserm U1060/ INRA 1235/ Université-Lyon1/ INSA, Lyon, France. ⁴Inserm U1046, UMR CNRS 9214, Université de Montpellier, Montpellier, France. ⁵Northwestern University, Chicago, IL, USA. ⁶Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy. ⁷Dulbecco-Telethon Institute, Venetian Institute of Molecular Medicine, Padua, Italy. ⁸Centre Commun de Microscopie Appliquée, Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France. ⁹Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice, Hôpital Pasteur, Laboratoire Central d'Anatomo Pathologie, 06002, Nice, France. ¹⁰Inserm U1065, C3M, Team Biology and pathology of melanocyte cells: From skin pigmentation to melanomas, Nice, France. ¹¹CNRS, Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, Sophia Antipolis, France. ¹²Institute for Research on Cancer and Aging of Nice, CNRS-UMR 7284-Inserm U1081, University of Nice Sophia-Antipolis, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France. Camille Loubiere and Stephan Clavel contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.B. (email: bost@unice.fr)

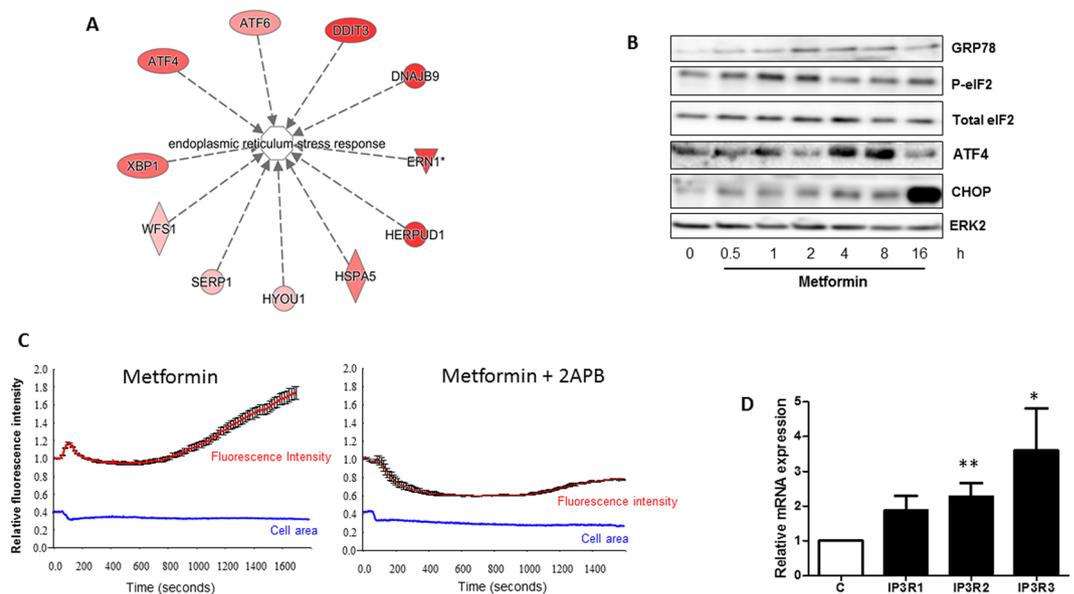


Figure 1. Metformin induces ER stress and calcium release from the ER. **(A)** List of genes related to the ER stress pathway and significantly upregulated in LNCaP cells treated with 5 mM metformin for 14 h. **(B)** Immunoblotting of LNCaP cells treated with 5 mM metformin for the indicated times by using antibodies directed against the indicated proteins implicated in ER stress response. The immunoblot is representative of three independent experiments. The blots represent **(C)** Relative fluorescence intensity of the Fluo-4AM probe, measured in LNCaP cells. 2-APB (40 μ M) was added 15 min before the addition of 5 mM metformin at time 0. The cellular area was monitored during the experiment (blue line). At least 30 single cells were monitored for each condition. The graph represents the mean fluorescence intensity \pm sem. **(D)** Quantification of IP3R mRNA in LNCaP cells treated with metformin for 24 h. $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

Calcium is a central regulator of mitochondrial metabolism; it regulates the activity of several enzymes in the tricarboxylic acid cycle and participates in the control of energy metabolism of cells⁷. Calcium concentration is tightly regulated to allow for precise biological processes such as muscle contraction, apoptosis or cell proliferation. The endoplasmic reticulum (ER) is the main intracellular organelle that stores calcium. IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) binds to its receptor IP₃ receptor (IP₃R) and is responsible for the release of calcium from the ER. The mitochondria act as cytosolic calcium buffers, and calcium uptake into mitochondria occurs *via* an electrogenic pathway involving Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU)⁸. The increase in intra-mitochondrial calcium concentration induces the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which plays an important role in the induction of apoptosis.

To date, knowledge of the action of metformin on mitochondria has been limited to its effect on energy stress, which sensitizes cancer cells to apoptosis⁶. Here, we studied the effects of biguanides on mitochondria. We found that metformin and phenformin induced mitochondrial swelling and disorganization of the cristae of the inner mitochondrial membrane (IMM) *in vitro* and *in vivo*. Metformin induced ER stress and triggered the release of calcium from the ER, thus leading to mitochondrial calcium uptake. We also demonstrated that metformin inhibited the opening of mPTP. Finally, in response to metformin, mitochondrial biogenesis was induced in cancer cells. These findings suggest a novel role for metformin in triggering pro-survival responses in cancer cells.

Results and Discussion

To better characterize the molecular targets of metformin in cancer cells, we performed microarray analysis in the prostate cancer cell line LNCaP, which was treated with metformin for 24 h. As expected, we observed an increase in the expression of genes encoding energy stress-related proteins such as the Regulated in Development and DNA Damage Responses 1 (REDD1) and Sestrin 2^{9,10} (data not shown). Notably, metformin significantly increased the expression of genes implicated in the unfolded protein response (UPR) induced by ER stress, such as *XBP1*, *ATF4*, *ATF6* and *DNAJB9* (Fig. 1A). To further characterize and validate the ER stress response induced by metformin, we studied the expression of key players of the UPR by western blotting. After only 1 h, we observed an increase in the levels of Bip/GRP78 and P-eIF2 followed by an increase in the levels of ATF4 and CHOP/DDIT3, a downstream pro-apoptotic factor of the UPR, at 4 h (Fig. 1B and Figure 1-figure supplement 1).

The ER is the major calcium reservoir in cells. Thus, ER stress is often associated with modifications of the calcium flux within cells. Therefore, we analyzed the calcium flux in cells treated with metformin by using a Fluo-4AM probe. After metformin treatment, we observed a burst of fluorescence corresponding to the release of calcium into the cytoplasm (Fig. 1C, Movie S1) even in calcium-free medium that excluded the entry of extracellular calcium (data not shown). To confirm that metformin triggers the release of calcium from the ER, we treated the cells with 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), an inhibitor and antagonist of IP₃R (a calcium releasing channel of the ER)¹¹. Treatment with 2-APB hampered the changes in calcium flux induced by metformin, thus

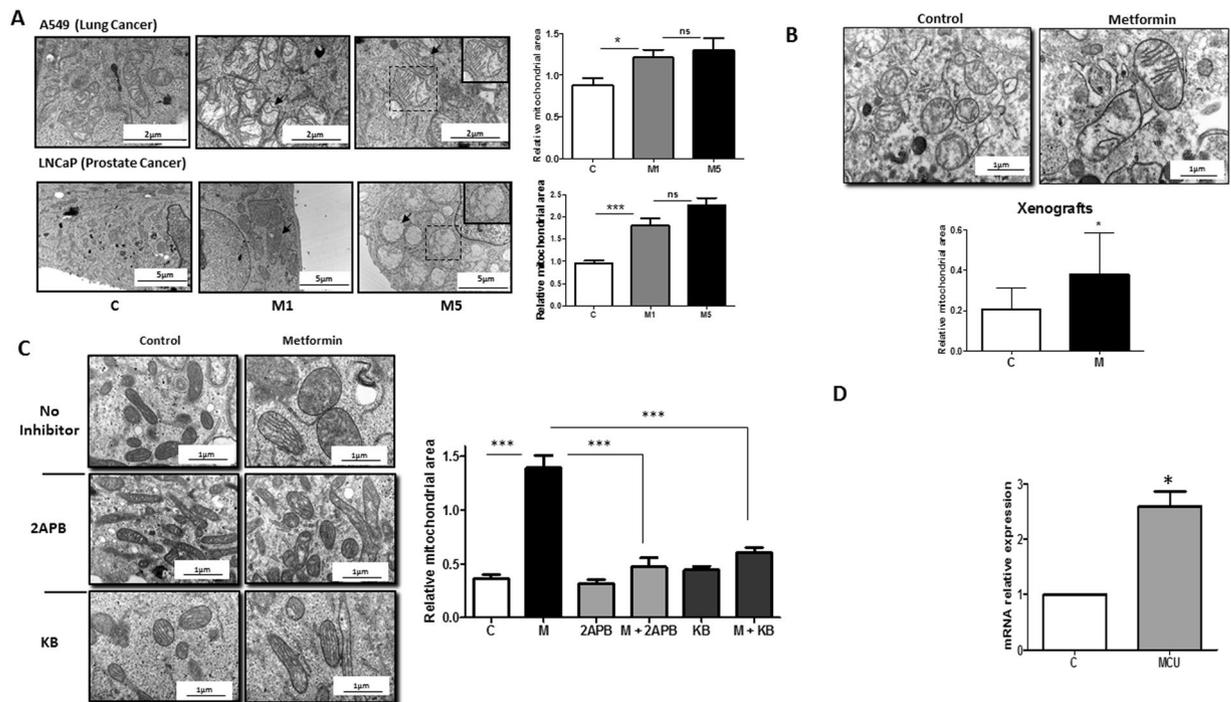


Figure 2. Metformin induces mitochondrial swelling in cancer cells *in vitro* and *in vivo*. (A) Electron microscopy (EM) of LNCaP (PCa) and A549 (lung cancer) cells treated with 1 and 5 mM metformin for 24 h. The graphs represent the mean of the relative mitochondrial area. An example of swollen mitochondria with modifications of the IMM is noted with an arrow. The inset shows a magnified view of a representative mitochondrion. (B) Electron microscopy images of representative mitochondria from tumor xenografts, and quantification of the relative mitochondrial area in the corresponding tumors. The error bars represent the standard error of the mean (sem). (C) Electron microscopy images of LNCaP cells treated with metformin and 40 μ M 2-ABP or 10 μ M KB-R7943 for 24 h. Quantification of the mitochondrial area is reported in the graph (left panel). For each condition, 60 to 100 mitochondria from several cells were analyzed by EM. (D) Quantification of MCU mRNA in LNCaP cells treated with metformin for 24 h. The differences are significant with $p < 0.05$ (*) and $p < 0.001$ (***)

demonstrating that the metformin-induced calcium flux originates in the ER (Fig. 1C). Accordingly, we also observed a significant increase in the expression of mRNA encoding for IP3R2 and IP3R3 after metformin treatment (Fig. 1D). The mitochondria display essential calcium buffering properties¹²; therefore, we hypothesized that calcium release from the ER might be buffered by the mitochondria. To determine the effects of metformin on the mitochondria, we performed electron microscopy analysis in several cancer cells lines (LNCaP, DU145, A375 and A549). We treated the cells with 1 or 5 mM metformin, commonly used concentrations that inhibit proliferation by 20% to 60%^{3,13,14}. Metformin and phenformin induced swelling of the mitochondria and a profound disorganization of the IMM and cristae without causing visible modifications of the outer mitochondrial membrane (OMM) (Fig. 2A and Figure 2-figure supplement 1). Twenty-four hours after metformin withdrawal, the size of the mitochondria had partially returned to normal, and the organization of the cristae was similar to that of the untreated cells (Figure 2-figure supplement 2). We also demonstrated that the effect on mitochondrial swelling occurred as early as 4 h after the addition of metformin (Figure 2-figure supplement 3). Of note, metformin did not alter the phenotype of the mitochondria in the normal epithelial prostate cell line P69 (Figure 2-figure supplement 4). Finally, we did not observe modifications of the mitochondrial ultrastructure in cancer cells treated with AICAR, another energy disruptor and activator of AMPK (data not shown).

We then asked whether these modifications occur *in vivo*. We studied the mitochondria in tumor xenografts of LNCaP cells implanted in SCID mice that were given 100 mg/kg of metformin in drinking water for 8 weeks. As shown previously¹³, metformin administration resulted in the expected antitumoral effects (Figure 2-figure supplement 5), and the mitochondria were significantly enlarged in the xenografts from the metformin-treated mice compared with the mitochondria in the control group (Fig. 2B). Similar results were obtained in TRAMP mice that were given 100 mg/kg of metformin for 6 months. In the treated mice, metformin efficiently reduced tumor growth and increased the mitochondrial area in the tumor cells (Figure 2-figure supplement 5,6).

Whether the release of calcium is a consequence of ER stress or the inducer remains an open question. Thapsigargin and tunicamycin can successfully induced ER stress and then the release of calcium, its accumulation in the mitochondria and finally mitochondrial swelling¹⁵. Previous studies have shown that metformin induces ER stress in the prostate cancer cell line C4-2B through the induction of miR-708-5p¹⁶, but a direct link between metformin and mitochondrial calcium homeostasis has never been demonstrated. A direct action of metformin on IP3R, which could trigger the release of calcium and consequently ER stress cannot be excluded,

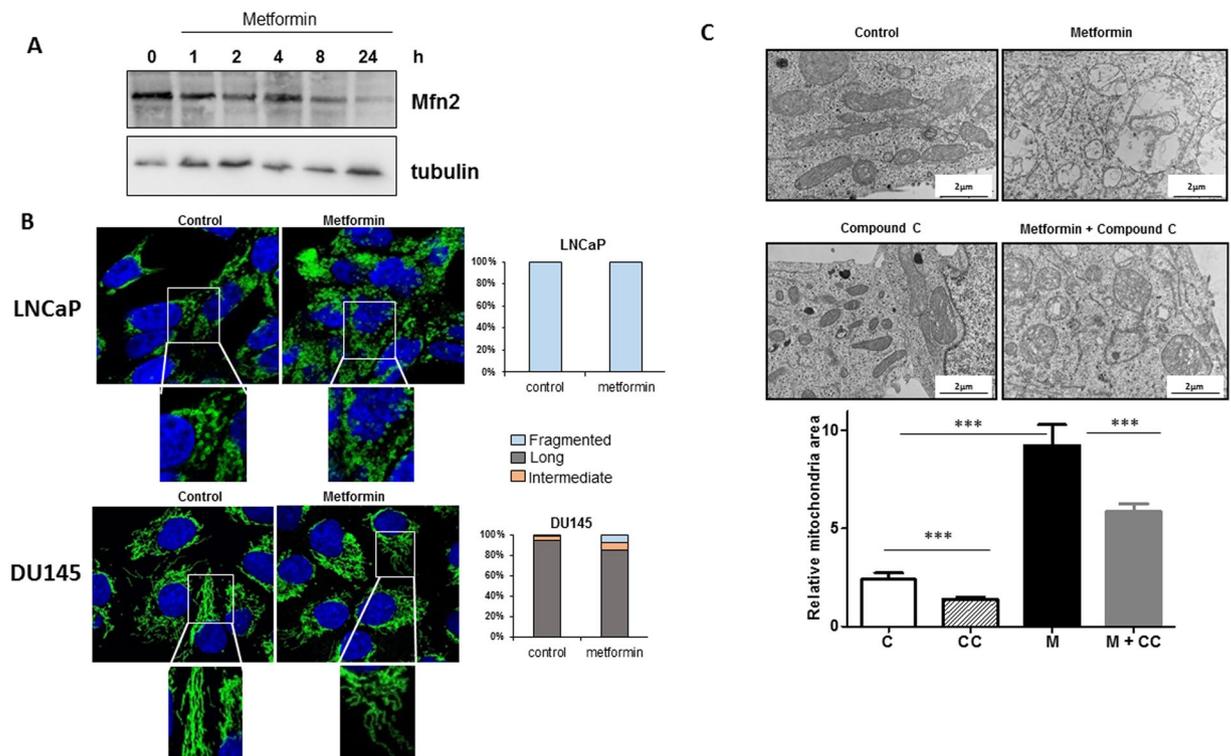


Figure 3. Metformin does not induce fission of the mitochondrial network, and mitochondrial swelling is partially dependent on AMPK. **(A)** LNCaP cells were treated with metformin for the indicated times, and Mfn2 expression was monitored at different time by immunoblotting. **(B)** LNCaP and DU145 cells were treated for 24 h with 5 mM metformin and stained with Tom20 for immunofluorescence analysis. Representative IF images are shown with the quantification of the morphology of the mitochondrial network. The data from the counting of at least 100 cells are shown. **(C)** LNCaP cells were treated with 5 mM metformin for 24 h in the presence or absence of 20 μ M of compound C (CC). Representative electronic microscopy images are shown, and the graph represents the mean of the relative mitochondrial area. For each condition, 60 to 100 mitochondria from several cells were analyzed by EM, $p < 0.001$ (***)

but there is no evidence in the literature of such a mechanism of action. The observation that metformin modulates intracellular calcium flux is novel, although a recent study based on transcriptomic and proteomic analyses in breast cancer cell lines demonstrated that metformin induced a significant upregulation of pathways involved in calcium signaling¹⁷.

To validate the direct relationship between the release of calcium from the ER and the swelling of mitochondria, we inhibited IP3R with 2-APB and treated LNCaP cells with metformin. While 2-APB alone did not affect the ultrastructure of mitochondria, it significantly blocked the swelling of mitochondria induced by metformin (Fig. 2C). To further confirm the implication of calcium, LNCaP cells were treated with two well-characterized chemical inhibitors of mitochondrial calcium uniporter (MCU), KB-R7943¹⁸ and RU-360¹⁹. Treatment with the inhibitors alone had no effect on the mitochondrial phenotype, whereas in the presence of metformin, KB-R7943 significantly inhibited mitochondrial swelling (Fig. 2C) and RU-360 preserved the organization of IMM and cristae (Figure 2-figure supplement 7). The transfer of calcium from the ER to the mitochondria involves IP3R (for the release from the ER), VDAC1 at the OMM and MCU at the IMM. We found that metformin increased the levels of IP3R1, IP3R2, IP3R3 and MCU mRNA as well as VDAC1 protein (Figs 1D, 2D and 4B). Altogether, these results demonstrate that there is a direct relationship between the release of calcium and mitochondrial swelling.

The ability of mitochondria to swell in response to different stresses is a biological process that has been known for decades²⁰. Hypoxia, through HIF-1 α , induces the enlargement of mitochondria, resulting from an atypical fusion of mitochondria due to an increase in the expression of mitofusin (Mfn)²¹. Our previous unpublished data showed that metformin did not alter the expression of HIF-1 α in LNCaP cells. In addition, we demonstrate here that metformin decreased the expression of Mfn2 (Fig. 3A), suggesting that the mechanism implicated in mitochondrial swelling upon metformin treatment and hypoxia are different. Interestingly, inactivation of Mfn2 in the cerebellum impaired mitochondrial fusion and lead to aberrant mitochondrial ultrastructure and enlargement of mitochondria in Purkinje cells²². Other well-known inducers of mitochondrial swelling are perturber of intracellular K⁺ homeostasis (valinomycin) and more importantly calcium¹⁷.

Energy disruptors and activators of AMPK such as rotenone and AICAR lead to the fragmentation of the mitochondrial network²³. Because metformin is an energy disruptor and activator of AMPK, we studied the mitochondrial network by confocal imaging by using the mitochondrial marker Tom20. LNCaP cells have a disconnected mitochondrial network under basal conditions, and metformin did not induce the fragmentation of

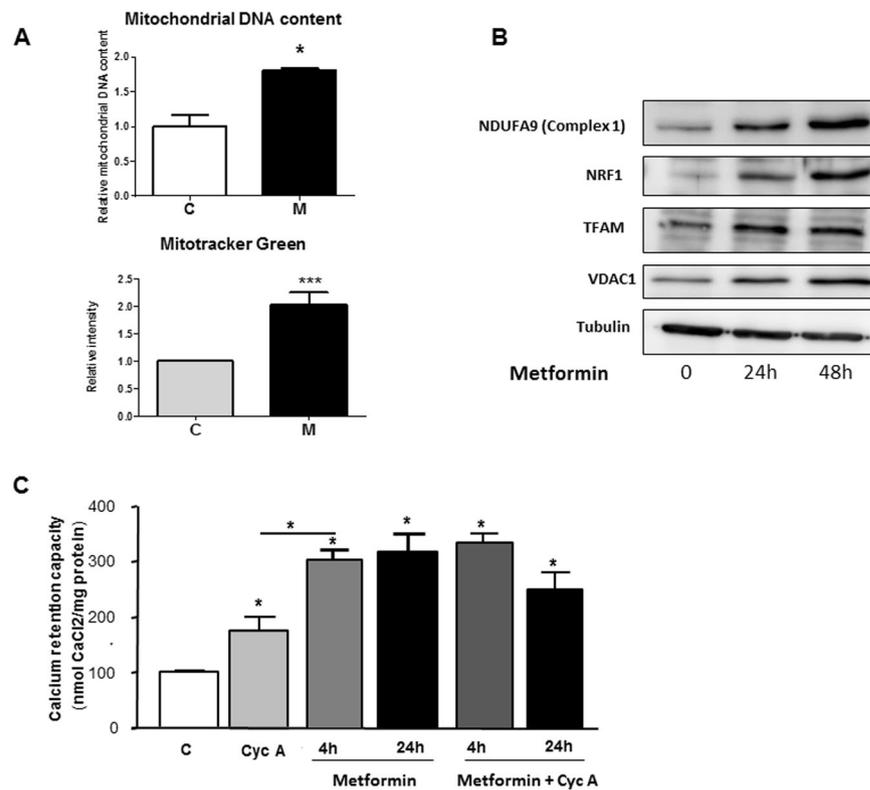


Figure 4. Metformin increases mitochondrial biogenesis in cancer cells and inhibits mitochondrial permeability transition pore. **(A)** Mitochondrial DNA content and quantification of MitoTracker Green in LNCaP cells treated with metformin for 24 h. The results were obtained from three independent experiments. $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***). **(B)** Immunoblotting analyses of proteins and transcription factors implicated in mitochondrial function, after treatment with 5 mM metformin for 24 and 48 h. **(C)** Calcium retention capacity measured after the incubation of LNCaP cells with 1 μ M cyclosporin A for 4 h or 5 mM metformin for 4 h and 24 h.

the mitochondrial network in DU145 cells (Fig. 3B). However, metformin decreased the expression of mitofusin 2 (Mfn2), a major regulator of mitochondrial fusion (the opposite process from mitochondrial fission²⁴), thus suggesting that although we did not observe a clear fragmentation phenotype induced by metformin, mitochondrial fusion may have been altered by metformin. We and others have found that some of the biological effects of metformin are not mediated by AMPK^{9,25}. Therefore, we asked whether AMPK might be involved in the ultrastructural modifications induced by metformin. To this end, we treated cells with compound C (CC), a commonly used AMPK inhibitor. The inhibitor alone diminished the mitochondrial area and partially, but significantly, reversed the swelling and ultrastructural modifications induced by metformin (Fig. 3C). Altogether, our results demonstrated that metformin does not induce fragmentation of the mitochondrial network and exerts effects on mitochondrial swelling, at least in part, *via* AMPK.

The relationship between energy stress and modifications of the mitochondrial network has been elucidated by the discovery of AMPK function in regulating mitochondrial fragmentation²³. In this study, a short-term treatment (of minutes) with energy disruptors such as AICAR and rotenone induced fragmentation of the mitochondrial network. Metformin is a weak inducer of energy stress, as compared with AICAR and rotenone, thus potentially explaining the absence of mitochondrial fragmentation in prostate cancer cells. In addition, our study was performed 4 and 24 h after the addition of metformin. AMPK phosphorylated MFF, a receptor for Drp1 (a major regulator of mitochondrial fission). Interestingly, metformin induced the phosphorylation of MFF in hepatocytes²³. It would be interesting to determine whether MFF is involved in the swelling of mitochondria.

To further characterize the effects of metformin on mitochondria, we monitored mitochondrial biogenesis. Within 24 h, metformin increased the mitochondrial mass, as shown by the augmentation of mitochondrial DNA/nuclear DNA ratio and increased signal of MitoTracker Green (Fig. 4A). A direct consequence was the increase in the mitochondrial protein NDUFA9 (Complex 1). This effect is driven by an increase in NRF1 and TFAM, two transcription factors that regulate mitochondrial biogenesis (Fig. 4B). Altogether, these results demonstrated that metformin promotes mitochondrial biogenesis in prostate cancer cells. Because mitochondria are essential for supplying energy and play a central role in the metabolism of glutamine or synthesis of purines and pyrimidines in cancer cells, it would be interesting to investigate the importance of mitochondrial biogenesis in the metabolism, survival, and chemotherapy resistance of cancer cells.

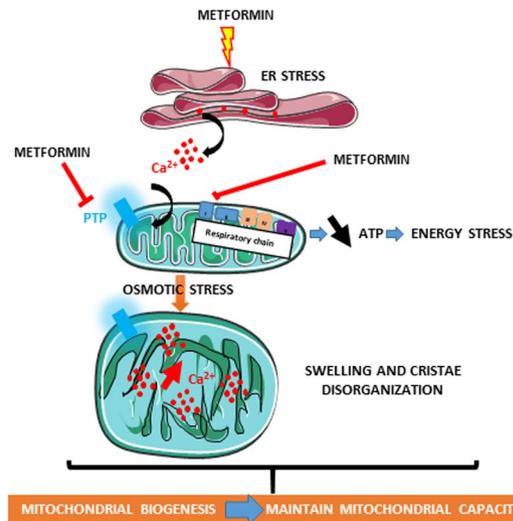


Figure 5. Schematic representation of the effects of metformin on mitochondrial biology in cancer cells. The illustrations were created by adopting templates from Servier Medical Arts (<http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>) which are free for use under the terms of the Creative Commons 3.0 License.

The intra-mitochondrial concentration of calcium determines the opening of mPTP, and metformin has been shown to inhibit mPTP in INS-1 (isolated insulinoma cells), HeLa and KB cells and in cardiomyocytes^{26–28}. To determine the effect of metformin on mPTP in cancer cells, we studied the Calcium Retention Capacity (CRC) of mitochondria in LNCaP and A375 cells treated with metformin. We found that metformin significantly increased CRC of mitochondria after 4 h and 24 h in both cell lines (Fig. 4C and Figure 4-figure supplement 1,2). Interestingly, the effect of metformin was stronger than that of cyclosporin A, a specific inhibitor of mPTP, and co-treatment with cyclosporin A and metformin had similar effects to those of metformin alone in LNCaP cells (Fig. 4C). Of note, we observed a significant decrease in the mRNA levels of cyclophilin D (Figure 4-figure supplement 3), a putative component of mPTP whose downregulation has been implicated in the retention of calcium in mitochondria²⁹. Thus, the inhibition of the opening of mPTP by metformin may explain the weak pro-apoptotic potential of metformin.

During apoptosis, the opening of mPTP leads to the release of cytochrome c and allows the entry of ions and water into the matrix resulting in mitochondrial swelling³⁰. The closure of mPTP with cyclosporin A, an inhibitor of cyclophilin D, reverses this swelling. In contrast with those results, we found that metformin inhibits the opening of mPTP and leads to mitochondrial swelling. We suggest that this discrepancy may be due to the massive influx of calcium into the mitochondria, probably through VDAC1 and MCU, which causes influx of water and osmotic swelling independently of mPTP. This hypothesis was supported by the electron microscopy data showing a clearer density of the matrix (Figs 2A and 3C and Figure 2-supplement 1 and 2) and by the increase in VDAC1 and MCU expression observed in the metformin-treated cells.

One of the novel findings in our study is that metformin modifies mitochondrial homeostasis in a different manner from acting directly on the respiratory chain complexes. The accumulation of calcium within the mitochondria regulates the intrinsic function of the organelle, including the production of ATP³¹. Three enzymes of the matrix are regulated by calcium: pyruvate dehydrogenase, α -ketoglutarate and isocitrate-dehydrogenase³². Activation of these enzymes increases the NADH/NAD ratio and hence the flow of electrons through the respiratory chain, thus increasing ATP production. Metformin inhibits complex 1 and decreases ATP production. Therefore, we postulate that similarly to the compensatory increase of glycolysis observed in response to metformin⁶, the increase in calcium influx may preserve the energetic status of cancer cells. Likewise, the induction of mitochondrial biogenesis may preserve the mitochondrial capacity, thereby increasing the calcium buffering abilities of the cells (Fig. 5). Together with the inhibition of mPTP opening, these biological responses protect cancer cells against apoptosis. The concept of the protective effect of metformin in normal cells is not new, but this effect is not extensively documented in cancer cells. Metformin has been shown to protect primary cortical neurons and cardiomyocytes from apoptosis^{33,34}. It also protects the Isolated insulinoma cell line INS-1 β from apoptosis induced by high concentrations of glucose, a condition that induces mPTP opening and apoptosis²⁷. This protective effect may seem controversial, given the antitumoral effect of the drug. However, we and others have shown that metformin is a stronger inhibitor of cell cycle than it is an inducer of apoptosis^{13,35,36}.

The relationship between complex 1 and mPTP is complicated. Previous studies have suggested that the inhibition of complex 1 is related to the effect of metformin on mPTP^{27,28}. It has been proposed that complex 1 interacts with mPTP and modulates its opening through a mechanism similar to the displacement of cyclophilin D by cyclosporin A²⁷. However, Batandier *et al.* have shown that the opening of mPTP directly affects electron transfer through complex 1³⁷.

In conclusion, we identify a new mechanism of action for metformin involving interference with mitochondrial biology through modification of calcium flux. The inhibition of mPTP opening and increase in

mitochondrial biogenesis are consistent with the anti-apoptotic and pro-survival response that should be considered in the future for the potential use of metformin in cancer therapy.

Methods

Cell lines and culture conditions. The cell lines were purchased from ATCC and authenticated by ATCC (Manassas, VA, USA). LNCaP cells were cultured in RPMI 1640 medium; DU145, A375 and A549 cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 4.5 g/L glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 units/mL penicillin at 37 °C and 5% CO₂. The cell line P69 was derived by immortalization of human primary prostate epithelial cells with simian virus-40 T antigen³⁸ and grown in RPMI 1640 with 10% FBS.

Chemicals. Metformin and phenformin were suspended in culture medium (without FBS and penicillin) and used at the respective concentrations of 5 mM and 100 μM, unless stated otherwise. Metformin, phenformin, 2-APB, KB-R7943 and cyclosporin A were purchased from Sigma-Aldrich. RU-360 was purchased from Merck Millipore.

Animal experiments. TRAMP mice were purchased from the Jackson Laboratory (stock # 003135). Metformin (100 g/kg/day) was dissolved in drinking water and administered to 6-week-old mice until the day of sacrifice at 8 months. For generating the tumor xenografts, LNCaP cells were inoculated subcutaneously (s.c.) with BD Matrigel™ matrix (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) in five-week-old male SCID mice in both flanks (10⁶ cells per site). Treatment with metformin in drinking water (100 g/kg/day) was started 3 days after tumor inoculation in mice. Tumor size was measured twice weekly for 8 weeks with a caliper, and the tumor volume was calculated with the formula $\pi/6 \times A \times B^2$ (A = larger diameter of the tumor, B = smaller diameter of the tumor) as previously described¹³. The animal experiments were carried out in accordance with French law and were approved by the local institutional ethics committee CIEPAL (Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire-Azur).

Electron microscopy. The cells were fixed with 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at room temperature (RT) and then for 16 h at 4 °C. The samples were rinsed with the same buffer, then post-fixed with 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at RT. The cells were rinsed with distilled water and embedded in epoxy resin and conventionally processed for thin-sectioning and observed with a JEM1400 transmission electron microscope (Jeol, Japan) equipped with a Morada CCD camera (Olympus SIS, Germany). The mitochondrial area was calculated by two different investigators in a blinded manner. The measurement was performed as follows: for each condition, we delineated the area occupied by individual mitochondrion in at least 5 cells (2–3 sections per cells) with ImageJ. This represented 60 to 100 mitochondria per condition; the means \pm sem are reported in the graphs.

Calcium Retention Capacity (CRC). Extra-mitochondrial calcium measurement was performed with a spectrofluorometer (excitation 500 nm; emission 530 nm) as previously described³⁹. Briefly, cells (equivalent to 800 μg of proteins) were added to 2 ml of CRC medium (150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM Tris/HCl and 5 mM Tris succinate). This medium was supplemented with 40 μM digitonin (to permeabilize the cells) and Calcium Green-5N (detection probe). The CRC measurements were performed in basal conditions or in the presence of the pharmacological compounds 1 μM cyclosporin A or 5 mM metformin. After 2 min of incubation, CRC was measured by addition of CaCl₂ pulses (40 nmol or 20 nmol calcium) every 2 min until the opening of mPTP.

Calcium flux measurements. Real-time calcium measurements were performed in LNCaP cells incubated in a physiological Tyrode solution (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl₂ and 11 mM glucose, pH 7.4). The cells were loaded with the Fluo-4AM dye at 37 °C for 15 min and observed with a LSM510 Meta microscope (Zeiss). The experiment was independently performed twice, and 32 cells were monitored for each condition and each experiment.

Microarray experiments. Pan-genomic microarrays were printed using the human RNG/MRC oligonucleotide collection, as previously described⁴⁰. The experimental data and associated microarray designs have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) under series GSE83673 and platform record GPL 1456. Normalizations were performed using the Limma package available from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Intra-slide and inter-slide normalizations were performed using the Print Tip Loess and quantile methods, respectively. The means of ratios from all comparisons were calculated, and B-test analysis was performed using the Limma package available from Bioconductor. Differentially expressed genes were selected using a Benjamini-Hochberg correction of the p-value for multiple tests on the basis of a p-value below 0.05 and a fold-change cutoff (log Ratio > 0.7).

Real-time quantitative PCR. The relative amount of mRNA was determined by quantitative RT-PCR using a SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)⁹. The primer sequences are available upon request.

Western blot analysis. Cell extracts were prepared using lysis buffer¹³¹³. Immunoblotting was performed with antibodies against SDHA, NDUFA9 (Molecular Probes), NRF1, TFAM, VDAC1 (Santa Cruz Biotechnology) and α -tubulin (Sigma-Aldrich). Antibodies against ATF4, GRP78, total and phospho-eIF2 α (Ser51) and CHOP/DDIT3 were purchased from Cell Signaling Technology. After incubation with the secondary antibodies, the membranes were washed 3 times, incubated with chemiluminescent HRP substrate Immobilon Western (Millipore) and scanned with a PXi gel imaging system.

Statistical analysis. The significance of differences between the means of 2 groups was evaluated using Student's t-tests.

References

- Bost, F., Decoux-Poullot, A. G., Tanti, J. F. & Clavel, S. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis* **5**, e188 (2016).
- Bost, F., Ben Sahra, I., Le Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. F. Metformin and cancer therapy. *Curr Opin Oncol* **24**, 103–108 (2012).
- Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I. G., Sonenberg, N. & Pollak, M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 10269–10273 (2006).
- El-Mir, M. Y. *et al.* Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* **275**, 223–228 (2000).
- Bridges, H. R., Jones, A. J., Pollak, M. N. & Hirst, J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J* **462**, 475–487 (2014).
- Ben Sahra, I. *et al.* Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* **70**, 2465–2475 (2010).
- Bhosale, G., Sharpe, J. A., Sundier, S. Y. & Duchon, M. R. Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci* **1350**, 107–116 (2015).
- Kirichok, Y., Kravitskiy, G. & Clapham, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360–364 (2004).
- Ben Sahra, I. *et al.* Metformin, Independent of AMPK, Induces mTOR Inhibition and Cell-Cycle Arrest through REDD1. *Cancer Res* **71**, 4366–4372 (2011).
- Ben-Sahra, I. *et al.* Sestrin2 integrates Akt and mTOR signaling to protect cells against energetic stress-induced death. *Cell Death Differ* **20**, 611–619 (2013).
- Macmillan, D. & McCarron, J. G. The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca(2+) release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca(2+) store by inhibiting Ca(2+) pumps in smooth muscle. *Br J Pharmacol* **160**, 1295–1301 (2010).
- Marchi, S. & Pinton, P. Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Curr Opin Pharmacol* **29**, 1–6 (2016).
- Ben Sahra, I. *et al.* The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect *in vitro* and *in vivo* through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* **27**, 3576–3586 (2008).
- Tomic, T. *et al.* Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis* **2**, e199 (2011).
- Deniaud, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* **27**, 285–299 (2008).
- Yang, J. *et al.* Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer. *Oncogenesis* **4**, e158 (2015).
- Sacco, F. *et al.* Deep Proteomics of Breast Cancer Cells Reveals that Metformin Rewires Signaling Networks Away from a Pro-growth State. *Cell Syst* **2**, 159–171 (2016).
- Santo-Domingo, J. *et al.* The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Br J Pharmacol* **151**, 647–654 (2007).
- Garcia-Rivas Gde, J., Carvajal, K., Correa, F. & Zazueta, C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats *in vivo*. *Br J Pharmacol* **149**, 829–837 (2006).
- Blondin, G. A. & Green, D. E. The mechanism of mitochondrial swelling. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**, 612–619 (1967).
- Chiche, J. *et al.* Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* **222**, 648–657 (2010).
- Chen, H., McCaffery, J. M. & Chan, D. C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **130**, 548–562 (2007).
- Toyama, E. Q. *et al.* Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* **351**, 275–281 (2016).
- Schrepfer, E. & Scorrano, L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell* **61**, 683–694 (2016).
- Kalender, A. *et al.* Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* **11**, 390–401 (2010).
- Bhamra, G. S. *et al.* Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol* **103**, 274–284 (2008).
- Li, B. *et al.* Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim Biophys Acta* **1817**, 1628–1634 (2012).
- Giguas, B. *et al.* Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological *in vitro* study. *Biochem J* **382**, 877–884 (2004).
- Kim, H. J., Magrane, J., Starkov, A. A. & Manfredi, G. The mitochondrial calcium regulator cyclophilin D is an essential component of oestrogen-mediated neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **135**, 2865–2874 (2012).
- Halestrap, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* **46**, 821–831 (2009).
- Cardenas, C. *et al.* Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* **142**, 270–283 (2010).
- McCormack, J. G., Halestrap, A. P. & Denton, R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* **70**, 391–425 (1990).
- El-Mir, M. Y. *et al.* Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci* **34**, 77–87 (2008).
- Sasaki, H. *et al.* Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation* **119**, 2568–2577 (2009).
- Alimova, I. N. *et al.* Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest *in vitro*. *Cell Cycle* **8**, 909–915 (2009).
- Zhuang, Y. & Miskimins, W. K. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. *J Mol Signal* **3**, 18 (2008).
- Batandier, C., Leverve, X. & Fontaine, E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **279**, 17197–17204 (2004).
- Plymate, S. R. *et al.* The effect on the insulin-like growth factor system in human prostate epithelial cells of immortalization and transformation by simian virus-40 T antigen. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3709–3716 (1996).
- Bochaton, T. *et al.* Inhibition of myocardial reperfusion injury by ischemic postconditioning requires sirtuin 3-mediated deacetylation of cyclophilin D. *J Mol Cell Cardiol* **84**, 61–69 (2015).
- Le Brigand, K. *et al.* An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res* **34**, e87 (2006).

Acknowledgements

We thank Sophie Giorgetti-Peraldi and Béatrice Ré for carefully reading the manuscript. We acknowledge the excellent support of the Nice-Sophia Antipolis Functional Genomics Platform. We thank Nicolas Nottet and Agnès Paquet for data management and statistical analysis. This study was supported by ITMO-Cancer and the foundation ARC. CL and LK were supported by the French Ministry of Research. JFT and FB are CNRS investigators. Light microscopy was performed at the C3M Imaging Core Facility (part of the Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA). The Nikon A1R-FLIM microscope was funded by the Conseil Général Alpes-Maritimes (Appel à projets santé) and by Région PACA (Appel à projets plateforme). This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (grant ANR-11-LABX-0028-01). We also acknowledge the animal facility of C3M.

Author Contributions

C.L., S.C., R.H., J.F., L.K., S.H., I.B.S., S.L.G. and K.L. conducted the experiments. C.L., S.C., J.G., D.A., B.M., A.L. and A.G. analyzed the data. J.F., A.L., S.R., L.S., J.F.M. and F.B. provided the materials. S.C., I.B.S., M.C., N.M.M. and J.F.T. corrected and critically read the manuscript. F.B. and S.C. directed the study and wrote the manuscript. All the authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-05052-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05052-2)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeloff, M.D., Slavik, M., Luk, G.D., Griffin, C.A., Hermann, J., Blanc, O., Sjoerdsma, A., and Baylin, S.B. (1984). Phase I trial and pharmacokinetic studies of alpha-difluoromethylornithine--an inhibitor of polyamine biosynthesis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *2*, 124–130.
- Abeloff, M.D., Rosen, S.T., Luk, G.D., Baylin, S.B., Zeltzman, M., and Sjoerdsma, A. (1986). Phase II trials of alpha-difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine synthesis, in advanced small cell lung cancer and colon cancer. *Cancer Treat. Rep.* *70*, 843–845.
- Ahluwalia, G.S., Grem, J.L., Hao, Z., and Cooney, D.A. (1990). Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents. *Pharmacol. Ther.* *46*, 243–271.
- Akimoto, T., Sorg, B.S., and Yan, Z. (2004). Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *287*, C790-796.
- Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S., and Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 19587–19593.
- Alam, T.N., O'Hare, M.J., Laczko, I., Freeman, A., Al-Beidh, F., Masters, J.R., and Hudson, D.L. (2004). Differential expression of CD44 during human prostate epithelial cell differentiation. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *52*, 1083–1090.
- 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.
- Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P., Lynch, C.F., Knott, C., Lubin, J.H., Tarone, R., Thomas, K., Dosemeci, M., Barker, J., Hoppin, J.A., et al. (2005). Cancer incidence in the agricultural health study. *Scand. J. Work. Environ. Health* *31 Suppl 1*, 39–45; discussion 5-7.
- Albeck, S., Dym, O., Unger, T., Snapir, Z., Bercovich, Z., and Kahana, C. (2008). Crystallographic and biochemical studies revealing the structural basis for antizyme inhibitor function. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *17*, 793–802.
- Alberghina, L., and Gaglio, D. (2014). Redox control of glutamine utilization in cancer. *Cell Death Dis.* *5*, e1561.
- Alexeyev, M.F., Ledoux, S.P., and Wilson, G.L. (2004). Mitochondrial DNA and aging. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979 107*, 355–364.
- Alexiou, G.A., Tsamis, K.I., Vartholomatos, E., Peponi, E., Tzima, E., Tasiou, I., Lykoudis, E., Tsekeris, P., and Kyritsis, A.P. (2015). Combination treatment of TRAIL, DFMO and radiation for malignant glioma cells. *J. Neurooncol.* *123*, 217–224.
- Alexiou, G.A., Lianos, G.D., Ragos, V., Galani, V., and Kyritsis, A.P. (2017). Difluoromethylornithine in cancer: new advances. *Future Oncol. Lond. Engl.* *13*, 809–819.
- Allen, B.L., and Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 155–166.
- Alm, K., and Oredsson, S. (2009). Cells and polyamines do it cyclically. *Essays Biochem.* *46*, 63–76.
- Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 619–634.

- Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* *107*, 481–495.
- Amorino, G.P., and Parsons, S.J. (2004). Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *14*, 287–300.
- Anderson, L. (1981). Identification of mitochondrial proteins and some of their precursors in two-dimensional electrophoretic maps of human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 2407–2411.
- Anderson, R., and Prolla, T. (2009). PGC-1 α in aging and anti-aging interventions. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 1059–1066.
- Andersson, U., and Scarpulla, R.C. (2001). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3738–3749.
- Andrzejewski, S., Klimcakova, E., Johnson, R.M., Tabariès, S., Annis, M.G., McGuirk, S., Northey, J.J., Chénard, V., Sriram, U., Papadopoli, D.J., et al. (2017). PGC-1 α Promotes Breast Cancer Metastasis and Confers Bioenergetic Flexibility against Metabolic Drugs. *Cell Metab.* *26*, 778-787.e5.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., Semenchenko, A.V., Provinciali, M., et al. (2005). Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp. Gerontol.* *40*, 685–693.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., Cannata, S.M., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2013). p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 386–399.
- Arany, Z., Foo, S.-Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., et al. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* *451*, 1008–1012.
- Armbruster, D.A. (1993). Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin. Chem.* *39*, 181–195.
- Armelin, H.A., Armelin, M.C., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B.H., and Stiles, C.D. (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* *310*, 655–660.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., and Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* *17*, 7170–7178.
- Arnsrud Godtman, R., Holmberg, E., Lilja, H., Stranne, J., and Hugosson, J. (2015). Opportunistic testing versus organized prostate-specific antigen screening: outcome after 18 years in the Göteborg randomized population-based prostate cancer screening trial. *Eur. Urol.* *68*, 354–360.
- Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* *20*, 31–42.
- Audet-Walsh, É., Papadopoli, D.J., Gravel, S.-P., Yee, T., Bridon, G., Caron, M., Bourque, G., Giguère, V., and St-Pierre, J. (2016). The PGC-1 α /ERR α Axis Represses One-Carbon Metabolism and Promotes Sensitivity to Anti-folate Therapy in Breast Cancer. *Cell Rep.* *14*, 920–931.

- Ayala, A.G., Ro, J.Y., Babaian, R., Troncoso, P., and Grignon, D.J. (1989). The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* *13*, 21–27.
- Babbar, N., and Gerner, E.W. (2011). Targeting polyamines and inflammation for cancer prevention. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* *188*, 49–64.
- Bachrach, U., Wang, Y.C., and Tabib, A. (2001). Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* *16*, 106–109.
- Bailey, H.H., Kim, K., Verma, A.K., Sielaff, K., Larson, P.O., Snow, S., Lenaghan, T., Viner, J.L., Douglas, J., Dreckschmidt, N.E., et al. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 skin cancer prevention study of {alpha}-difluoromethylornithine in subjects with previous history of skin cancer. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *3*, 35–47.
- Bakeeva, L.E., Chentsov YuS, null, and Skulachev, V.P. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta* *501*, 349–369.
- Bale, S., and Ealick, S.E. (2010). Structural biology of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Amino Acids* *38*, 451–460.
- Bale, S., Lopez, M.M., Makhatadze, G.I., Fang, Q., Pegg, A.E., and Ealick, S.E. (2008). Structural basis for putrescine activation of human S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 13404–13417.
- Balk, S.P., Ko, Y.-J., and Bubley, G.J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *21*, 383–391.
- Ball, E.H., and Singer, S.J. (1982). Mitochondria are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 123–126.
- Banan, A., Wang, J.Y., McCormack, S.A., and Johnson, L.R. (1996). Relationship between polyamines, actin distribution, and gastric healing in rats. *Am. J. Physiol.* *271*, G893-903.
- Banan, A., McCormack, S.A., and Johnson, L.R. (1998). Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. *Am. J. Physiol.* *274*, G879-885.
- Barata, J.T., Silva, A., Brandao, J.G., Nadler, L.M., Cardoso, A.A., and Boussiotis, V.A. (2004). Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* *200*, 659–669.
- Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A., and Ralph, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br. J. Nutr.* *73*, 819–828.
- Baron, A., Migita, T., Tang, D., and Loda, M. (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J. Cell. Biochem.* *91*, 47–53.
- Bastide, C., Bruyère, F., Karsenty, G., Guy, L., and Rozet, F. (2013). [Hormonal treatment in prostate cancer]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *23*, 1246–1257.
- Bastien, L., Fourcade†, R.-O., Makhoul, B., Meria, P., and Desgrandchamps, F. (2012). Hyperplasie bénigne de la prostate. </data/revues/11667087/00220HS6/14/>.
- Bauer, D.E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* *24*, 6314–6322.

- Ben Sahra, I., Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., Tanti, J.-F., Giorgetti-Peraldi, S., and Bost, F. (2011). Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* *71*, 4366–4372.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* *120*, 838–848.
- Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., et al. (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* *8*, 411–424.
- van den Bergh, R.C.N., and Giannarini, G. (2014). Prostate cancer: surgery versus observation for localized prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* *11*, 312–313.
- Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* *463*, 899–905.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 967–975.
- Berwick, D.C., Hers, I., Heesom, K.J., Moule, S.K., and Tavare, J.M. (2002). The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* *277*, 33895–33900.
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Carani, C., Madeo, B., Tampieri, A., Corti, A., Saverio, B., Pierpaola, D., Serenella, A., et al. (2000). Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res.* *60*, 28–34.
- Bhalla, K., Hwang, B.J., Dewi, R.E., Ou, L., Twaddel, W., Fang, H.-B., Vafai, S.B., Vazquez, F., Puigserver, P., Boros, L., et al. (2011). PGC1 α promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. *Cancer Res.* *71*, 6888–6898.
- Bhalla, S., Ozalp, C., Fang, S., Xiang, L., and Kemper, J.K. (2004). Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1 α . Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* *279*, 45139–45147.
- Bhattacharya, S., Ray, R.M., and Johnson, L.R. (2009). Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell. Signal.* *21*, 509–522.
- Bhutia, Y.D., Babu, E., Ramachandran, S., and Ganapathy, V. (2015). Amino Acid transporters in cancer and their relevance to “glutamine addiction”: novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res.* *75*, 1782–1788.
- Bill-Axelson, A., Holmberg, L., Garmo, H., Rider, J.R., Taari, K., Busch, C., Nordling, S., Häggman, M., Andersson, S.-O., Spångberg, A., et al. (2014). Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* *370*, 932–942.
- Biol-N’Garagba, M.-C., Greco, S., George, P., Hugueny, I., and Louisot, P. (2002). Polyamine participation in the maturation of glycoprotein fucosylation, but not sialylation, in rat small intestine. *Pediatr. Res.* *51*, 625–634.

- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F., and Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33, 547–562.
- Bode, B.P. (2001). Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* 131, 2475S–85S; discussion 2486S–7S.
- Bogunovic, D., O’Neill, D.W., Belitskaya-Levy, I., Vacic, V., Yu, Y.-L., Adams, S., Darvishian, F., Berman, R., Shapiro, R., Pavlick, A.C., et al. (2009). Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20429–20434.
- Bokhorst, L.P., and Roobol, M.J. (2015). Ethnicity and prostate cancer: the way to solve the screening problem? *BMC Med.* 13, 179.
- Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1994). Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum. Pathol.* 25, 42–46.
- Bonner, M.R., Lee, W.J., Sandler, D.P., Hoppin, J.A., Dosemeci, M., and Alavanja, M.C.R. (2005). Occupational exposure to carbofuran and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Environ. Health Perspect.* 113, 285–289.
- Bonner, M.R., Williams, B.A., Rusiecki, J.A., Blair, A., Beane Freeman, L.E., Hoppin, J.A., Dosemeci, M., Lubin, J., Sandler, D.P., and Alavanja, M.C.R. (2010). Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Causes Control CCC* 21, 871–877.
- de Bono, J.S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J.-P., Kocak, I., Gravis, G., Bodrogi, I., Mackenzie, M.J., Shen, L., et al. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet Lond. Engl.* 376, 1147–1154.
- Boroughs, L.K., and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol.* 17, 351–359.
- Boss, O., Bachman, E., Vidal-Puig, A., Zhang, C.Y., Peroni, O., and Lowell, B.B. (1999). Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 870–876.
- Briganti, A., Larcher, A., Abdollah, F., Capitanio, U., Gallina, A., Suardi, N., Bianchi, M., Sun, M., Freschi, M., Salonia, A., et al. (2012). Updated nomogram predicting lymph node invasion in patients with prostate cancer undergoing extended pelvic lymph node dissection: the essential importance of percentage of positive cores. *Eur. Urol.* 61, 480–487.
- Brookman-May, S.D., Campi, R., Henríquez, J.D.S., Klatter, T., Langenhuijsen, J.F., Brausi, M., Linares-Espinós, E., Volpe, A., Marszalek, M., Akdogan, B., et al. (2018). Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU). *Eur. Urol. Focus.*
- Brown, I., Halliday, S., Greig, H., Heys, S.D., Wallace, H.M., and Schofield, A.C. (2009). Genetic polymorphism in ornithine decarboxylase and risk of breast cancer. *Fam. Cancer* 8, 307–311.

Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., and Chandel, N.S. (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* *1*, 409–414.

Bruner, D.W., Moore, D., Parlanti, A., Dorgan, J., and Engstrom, P. (2003). Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* *107*, 797–803.

Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 203–208.

Bunpo, P., Murray, B., Cundiff, J., Brizius, E., Aldrich, C.J., and Anthony, T.G. (2008). Alanyl-glutamine consumption modifies the suppressive effect of L-asparaginase on lymphocyte populations in mice. *J. Nutr.* *138*, 338–343.

Burns, M.R., Graminski, G.F., Weeks, R.S., Chen, Y., and O'Brien, T.G. (2009). Lipophilic lysine-spermine conjugates are potent polyamine transport inhibitors for use in combination with a polyamine biosynthesis inhibitor. *J. Med. Chem.* *52*, 1983–1993.

Buzzai, M., Bauer, D.E., Jones, R.G., Deberardinis, R.J., Hatzivassiliou, G., Elstrom, R.L., and Thompson, C.B. (2005). The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene* *24*, 4165–4173.

Buzzoni, C., Auvinen, A., Roobol, M.J., Carlsson, S., Moss, S.M., Puliti, D., de Koning, H.J., Bangma, C.H., Denis, L.J., Kwiatkowski, M., et al. (2015). Metastatic Prostate Cancer Incidence and Prostate-specific Antigen Testing: New Insights from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Eur. Urol.* *68*, 885–890.

Byers, T.L., Wiest, L., Wechter, R.S., and Pegg, A.E. (1993). Effects of chronic 5'-((Z)-4-amino-2-butenyl)methylamino)-5'-deoxy- adenosine (AbeAdo) treatment on polyamine and eIF-5A metabolism in AbeAdo-sensitive and -resistant L1210 murine leukaemia cells. *Biochem. J.* *290 (Pt 1)*, 115–121.

Cairns, R.A., Papandreou, I., Sutphin, P.D., and Denko, N.C. (2007). Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9445–9450.

Cairns, R.A., Bennewith, K.L., Graves, E.E., Giaccia, A.J., Chang, D.T., and Denko, N.C. (2009). Pharmacologically increased tumor hypoxia can be measured by 18F-Fluoroazomycin arabinoside positron emission tomography and enhances tumor response to hypoxic cytotoxin PR-104. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 7170–7174.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 85–95.

Calais da Silva, F., Calais da Silva, F.M., Gonçalves, F., Santos, A., Kliment, J., Whelan, P., Oliver, T., Antoniou, N., Pastidis, S., Marques Queimadelos, A., et al. (2014). Locally advanced and metastatic prostate cancer treated with intermittent androgen monotherapy or maximal androgen blockade: results from a randomised phase 3 study by the South European Urooncological Group. *Eur. Urol.* *66*, 232–239.

Calvo, J.A., Daniels, T.G., Wang, X., Paul, A., Lin, J., Spiegelman, B.M., Stevenson, S.C., and Rangwala, S.M. (2008). Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *104*, 1304–1312.

Campi, R., Brookman-May, S.D., Subiela Henríquez, J.D., Akdoğan, B., Brausi, M., Klatte, T., Langenhuijsen, J.F., Linares-Espinos, E., Marszalek, M., Roupret, M., et al. (2018). Impact of Metabolic Diseases, Drugs, and Dietary Factors on Prostate Cancer Risk, Recurrence, and Survival: A Systematic Review by the European Association of Urology Section of Oncological Urology. *Eur. Urol. Focus.*

Cao, D., Jin, L., Zhou, H., Yu, W., Hu, Y., and Guo, T. (2015). Inhibition of PGC-1 α after chemotherapy-mediated insult confines multiple myeloma cell survival by affecting ROS accumulation. *Oncol. Rep.* *33*, 899–904.

Cao, W., Collins, Q.F., Becker, T.C., Robidoux, J., Lupo, E.G., Xiong, Y., Daniel, K.W., Floering, L., and Collins, S. (2005). p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 42731–42737.

Carlsson, S.V., and Kattan, M.W. (2016). Prostate cancer: Personalized risk - stratified screening or abandoning it altogether? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *13*, 140–142.

Carracedo, A., Cantley, L.C., and Pandolfi, P.P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 227–232.

Carter, H.B. (2006). Assessing risk: does this patient have prostate cancer? *J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 506–507.

Carvalho, L., Foulkes, K., and Mickey, D.D. (1989). Effect of DMSO and DFMO on rat prostate tumor growth. *The Prostate* *15*, 123–133.

Casero, R.A., and Marton, L.J. (2007). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 373–390.

Catalona, W.J., Richie, J.P., Ahmann, F.R., Hudson, M.A., Scardino, P.T., Flanigan, R.C., deKernion, J.B., Ratliff, T.L., Kavoussi, L.R., and Dalkin, B.L. (1994). Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J. Urol.* *151*, 1283–1290.

Cervený, K.L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R.E., and Sesaki, H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol.* *17*, 563–569.

Chajès, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G.M., and Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* *66*, 5287–5294.

Chamaillard, L., Quemener, V., Havouis, R., and Moulinoux, J.P. (1993). Polyamine deprivation stimulates natural killer cell activity in cancerous mice. *Anticancer Res.* *13*, 1027–1033.

Chang, J.S., Fernand, V., Zhang, Y., Shin, J., Jun, H.-J., Joshi, Y., and Gettys, T.W. (2012). NT-PGC-1 α protein is sufficient to link β 3-adrenergic receptor activation to transcriptional and physiological components of adaptive thermogenesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 9100–9111.

Chang, Y., Wang, J., Lu, X., Thewke, D.P., and Mason, R.J. (2005). KGF induces lipogenic genes through a PI3K and JNK/SREBP-1 pathway in H292 cells. *J. Lipid Res.* *46*, 2624–2635.

Chao, J., Seiler, N., Renault, J., Kashiwagi, K., Masuko, T., Igarashi, K., and Williams, K. (1997). N1-dansyl-spermine and N1-(n-octanesulfonyl)-spermine, novel glutamate receptor antagonists: block and permeation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* *51*, 861–871.

- Chatterjee, I., Gross, S.R., Kinzy, T.G., and Chen, K.Y. (2006). Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol. Genet. Genomics* *MGG* *275*, 264–276.
- Chattopadhyay, M.K., Park, M.H., and Tabor, H. (2008). Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6554–6559.
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* *541*, 321–330.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2004). Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* *59*, 119–144.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R169-176.
- Chen, L., and Cui, H. (2015). Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 22830–22855.
- Chen, E.I., Hewel, J., Krueger, J.S., Tiraby, C., Weber, M.R., Kralli, A., Becker, K., Yates, J.R., and Felding-Habermann, B. (2007a). Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Res.* *67*, 1472–1486.
- Chen, J., Rao, J.N., Zou, T., Liu, L., Marasa, B.S., Xiao, L., Zeng, X., Turner, D.J., and Wang, J.-Y. (2007b). Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G568-576.
- Chen, S.-D., Yang, D.-I., Lin, T.-K., Shaw, F.-Z., Liou, C.-W., and Chuang, Y.-C. (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* *12*, 7199–7215.
- Chen, X., Che, X., Wang, J., Chen, F., Wang, X., Zhang, Z., Fan, B., Yang, D., and Song, X. (2013). Zinc sensitizes prostate cancer cells to sorafenib and regulates the expression of Livin. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *45*, 353–358.
- Chen, Y.-C., Page, J.H., Chen, R., and Giovannucci, E. (2008). Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *The Prostate* *68*, 1582–1591.
- Chen, Y.-M., Gerwin, C., and Sheng, Z.-H. (2009). Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 9429–9438.
- Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., and Stepien, G. (2011). Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 562–567.
- Childs, A.C., Mehta, D.J., and Gerner, E.W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *60*, 1394–1406.
- Choi, Y.-K., and Park, K.-G. (2018). Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. *Biomol. Ther.* *26*, 19–28.
- Choi, S.H., Kim, S.W., Choi, D.H., Min, B.H., and Chun, B.G. (2000). Polyamine-depletion induces p27Kip1 and enhances dexamethasone-induced G1 arrest and apoptosis in human T lymphoblastic leukemia cells. *Leuk. Res.* *24*, 119–127.

- Christensen, C.H., Platz, E.A., Andreotti, G., Blair, A., Hoppin, J.A., Koutros, S., Lynch, C.F., Sandler, D.P., and Alavanja, M.C.R. (2010). Coumaphos exposure and incident cancer among male participants in the Agricultural Health Study (AHS). *Environ. Health Perspect.* *118*, 92–96.
- Chu, P.J., Saito, H., and Abe, K. (1995). Polyamines promote regeneration of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* *673*, 233–241.
- Chua, C.W., Shibata, M., Lei, M., Toivanen, R., Barlow, L.J., Bergren, S.K., Badani, K.K., McKiernan, J.M., Benson, M.C., Hibshoosh, H., et al. (2014). Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat. Cell Biol.* *16*, 951–961, 1–4.
- Cipolla, B.G., Havouis, R., and Moulinoux, J.-P. (2010). Polyamine reduced diet (PRD) nutrition therapy in hormone refractory prostate cancer patients. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *64*, 363–368.
- Clayton, D.A. (1992). Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* *141*, 217–232.
- Coburn, R.F. (2009). Polyamine effects on cell function: Possible central role of plasma membrane PI(4,5)P₂. *J. Cell. Physiol.* *221*, 544–551.
- Coffino, P. (2000). Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4421–4423.
- Coleman, C.S., Hu, G., and Pegg, A.E. (2004). Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem. J.* *379*, 849–855.
- Collins, A.T., Habib, F.K., Maitland, N.J., and Neal, D.E. (2001). Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J. Cell Sci.* *114*, 3865–3872.
- Collinson, I.R., van Raaij, M.J., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Orriss, G.L., Miroux, B., and Walker, J.E. (1994a). ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence. *J. Mol. Biol.* *242*, 408–421.
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., and Walker, J.E. (1994b). Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F₁-ATPase. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 7971–7978.
- Cornud, F., Flam, T., Chauveinc, L., Hamida, K., Chrétien, Y., Vieillefond, A., Hélénon, O., and Moreau, J.F. (2002). Extraprostatic spread of clinically localized prostate cancer: factors predictive of pT3 tumor and of positive endorectal MR imaging examination results. *Radiology* *224*, 203–210.
- Cortesi, M., Fridman, E., Volkov, A., Shilstein, S.S., Chechik, R., Breskin, A., Vartsky, D., Kleinman, N., Kogan, G., Moriel, E., et al. (2008). Clinical assessment of the cancer diagnostic value of prostatic zinc: a comprehensive needle-biopsy study. *The Prostate* *68*, 994–1006.
- Costello, L.C., and Franklin, R.B. (1998). Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. *The Prostate* *35*, 285–296.
- Costello, L.C., and Franklin, R.B. (2000). The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology* *59*, 269–282.
- Costello, L.C., and Franklin, R.B. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol. Cancer* *5*, 17.

- Costello, L.C., and Franklin, R.B. (2016). A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. *Arch. Biochem. Biophys.* *611*, 100–112.
- Costello, L.C., Liu, Y., Franklin, R.B., and Kennedy, M.C. (1997). Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 28875–28881.
- Costello, L.C., Feng, P., Milon, B., Tan, M., and Franklin, R.B. (2004). Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *7*, 111–117.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., and Feng, P. (2005a). Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. *Mitochondrion* *5*, 143–153.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., Feng, P., Tan, M., and Bagasra, O. (2005b). Zinc and prostate cancer: a critical scientific, medical, and public interest issue (United States). *Cancer Causes Control CCC* *16*, 901–915.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., Zou, J., Feng, P., Bok, R., Swanson, M.G., and Kurhanewicz, J. (2011). Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. *Cancer Biol. Ther.* *12*, 1078–1084.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., Zou, J., and Naslund, M.J. (2015). Evidence that Human Prostate Cancer is a ZIP1-Deficient Malignancy that could be Effectively Treated with a Zinc Ionophore (Clioquinol) Approach. *Chemotherapy* *4*.
- Crawford, E.D., Tombal, B., Miller, K., Boccon-Gibod, L., Schröder, F., Shore, N., Moul, J.W., Jensen, J.-K., Olesen, T.K., and Persson, B.-E. (2011). A phase III extension trial with a 1-arm crossover from leuprolide to degarelix: comparison of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist effect on prostate cancer. *J. Urol.* *186*, 889–897.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* *450*, 736–740.
- Curthoys, N.P., and Watford, M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* *15*, 133–159.
- Cutruzzolà, F., Giardina, G., Marani, M., Maccone, A., Paiardini, A., Rinaldo, S., and Paone, A. (2017). Glucose Metabolism in the Progression of Prostate Cancer. *Front. Physiol.* *8*, 97.
- Cuzick, J., Thorat, M.A., Andriole, G., Brawley, O.W., Brown, P.H., Culig, Z., Eeles, R.A., Ford, L.G., Hamdy, F.C., Holmberg, L., et al. (2014). Prevention and early detection of prostate cancer. *Lancet Oncol.* *15*, e484–e492.
- Cynober, L.A. (2002). Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *18*, 761–766.
- Dakubo, G.D., Parr, R.L., Costello, L.C., Franklin, R.B., and Thayer, R.E. (2006). Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* *59*, 10–16.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7824–7827.

- D'Amico, A.V., Whittington, R., Malkowicz, S.B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G.A., Tomaszewski, J.E., Renshaw, A.A., Kaplan, I., Beard, C.J., et al. (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* *280*, 969–974.
- Dang, C.V. (2010). Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res.* *70*, 859–862.
- Dang, C.V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* *26*, 877–890.
- Dang, C.V. (2013). MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*.
- Dang, C.V., Kim, J., Gao, P., and Yustein, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 51–56.
- Dang, C.V., Le, A., and Gao, P. (2009a). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 6479–6483.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009b). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* *462*, 739–744.
- Danhier, P., Bański, P., Payen, V.L., Grasso, D., Ippolito, L., Sonveaux, P., and Porporato, P.E. (2017). Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochim. Biophys. Acta* *1858*, 556–572.
- Danzin, C., Jung, M.J., Metcalf, B.W., Grove, J., and Casara, P. (1979). Decrease of polyamine levels in rat tissues by 5-hexyne-1,4-diamine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Biochem. Pharmacol.* *28*, 627–631.
- Danzin, C., Marchal, P., and Casara, P. (1990). Irreversible inhibition of rat S-adenosylmethionine decarboxylase by 5'-((Z)-4-amino-2-butenyl)methylamino)-5'-deoxyadenosine. *Biochem. Pharmacol.* *40*, 1499–1503.
- Davidson, N.E., Hahm, H.A., McCloskey, D.E., Woster, P.M., and Casero, R.A. (1999). Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment. *Endocr. Relat. Cancer* *6*, 69–73.
- Daye, D., and Wellen, K.E. (2012). Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 362–369.
- Dayoub, R., Thasler, W.E., Bosserhoff, A.K., Singer, T., Jauch, K.-W., Schlitt, H.J., and Weiss, T.S. (2006). Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augments liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 181–187.
- De Marzo, A.M., Nelson, W.G., Meeker, A.K., and Coffey, D.S. (1998). Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J. Urol.* *160*, 2381–2392.
- De Souza-Teixeira, F., Alonso-Molero, J., Ayán, C., Vilorio-Marques, L., Molina, A.J., González-Donquiles, C., Davila-Batista, V., Fernández-Villa, T., de Paz, J.A., and Martín, V. (2018). PGC-1 α as a Biomarker of Physical Activity-Protective Effect on Colorectal Cancer. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa.*
- DeBerardinis, R.J., and Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* *29*, 313–324.

DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19345–19350.

Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C.B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *18*, 54–61.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* *7*, 11–20.

Deblois, G., St-Pierre, J., and Giguère, V. (2013). The PGC-1/ERR signaling axis in cancer. *Oncogene* *32*, 3483–3490.

Deblois, G., Smith, H.W., Tam, I.S., Gravel, S.-P., Caron, M., Savage, P., Labbé, D.P., Bégin, L.R., Tremblay, M.L., Park, M., et al. (2016). ERR α mediates metabolic adaptations driving lapatinib resistance in breast cancer. *Nat. Commun.* *7*, 12156.

Delerive, P., Wu, Y., Burris, T.P., Chin, W.W., and Suen, C.S. (2002). PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 3913–3917.

Deng, W., Viar, M.J., and Johnson, L.R. (2005). Polyamine depletion inhibits irradiation-induced apoptosis in intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G599-606.

D’Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Lo Sasso, G., Latorre, D., Martelli, N., Egorova, A.V., Polishuck, R., Madeyski-Bengtson, K., Lelliott, C., et al. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 6603–6608.

Desmond, A.D., Arnold, A.J., and Hastie, K.J. (1988). Subcapsular orchiectomy under local anaesthesia. Technique, results and implications. *Br. J. Urol.* *61*, 143–145.

Dhingra, N., and Bhagwat, D. (2011). Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment. *Indian J. Pharmacol.* *43*, 6–12.

Ding, W.-X., and Yin, X.-M. (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* *393*, 547–564.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* *51*, 7–61.

Dirat, B., Ader, I., Golzio, M., Massa, F., Mettouchi, A., Laurent, K., Larbret, F., Malavaud, B., Cormont, M., Lemichez, E., et al. (2015). Inhibition of the GTPase Rac1 mediates the antimigratory effects of metformin in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 586–596.

Dobrzyn, P., Pyrkowska, A., Jazurek, M., Szymanski, K., Langfort, J., and Dobrzyn, A. (2010). Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *109*, 1653–1661.

Dosemeci, M., Alavanja, M.C.R., Rowland, A.S., Mage, D., Zahm, S.H., Rothman, N., Lubin, J.H., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., and Blair, A. (2002). A quantitative approach for estimating exposure to pesticides in the Agricultural Health Study. *Ann. Occup. Hyg.* *46*, 245–260.

Droz, J.-P., Balducci, L., Bolla, M., Emberton, M., Fitzpatrick, J.M., Joniau, S., Kattan, M.W., Monfardini, S., Moul, J.W., Naeim, A., et al. (2010). Background for the proposal of SIOG guidelines for the management of prostate cancer in senior adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *73*, 68–91.

- Dunzendorfer, U., Relyea, N.M., Kleinert, E., Balis, M.E., and Whitmore, W.F. (1983). Antigrowth effect of some inhibitors of polyamine synthesis on transplantable prostate cancer. *Oncology* *40*, 57–62.
- Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* *39*, 171–183.
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* *122*, 501–514.
- Ecker, J., and Liebisch, G. (2014). Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species. *Prog. Lipid Res.* *54*, 14–31.
- Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2002). Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2276–2288.
- Edwan, G.A., Ghai, S., Margel, D., Kulkarni, G., Hamilton, R., Toi, A., Haidar, M.A., Finelli, A., and Fleshner, N.E. (2015). Magnetic resonance imaging detected prostate evasive anterior tumours: Further insights. *Can. Urol. Assoc. J. J. Assoc. Urol. Can.* *9*, E267-272.
- Eidelman, E., Twum-Ampofo, J., Ansari, J., and Siddiqui, M.M. (2017). The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer. *Front. Oncol.* *7*, 131.
- Eifler, J.B., Feng, Z., Lin, B.M., Partin, M.T., Humphreys, E.B., Han, M., Epstein, J.I., Walsh, P.C., Trock, B.J., and Partin, A.W. An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011. *BJU Int.* *111*, 22–29.
- Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev.* *22*, 2755–2766.
- Elmets, C.A., and Athar, M. (2010). Targeting ornithine decarboxylase for the prevention of nonmelanoma skin cancer in humans. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *3*, 8–11.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., et al. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 3892–3899.
- Epstein, J.I., Allsbrook, W.C., Amin, M.B., Egevad, L.L., and ISUP Grading Committee (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* *29*, 1228–1242.
- Epstein, J.I., Egevad, L., Amin, M.B., Delahunt, B., Srigley, J.R., Humphrey, P.A., and Grading Committee (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am. J. Surg. Pathol.* *40*, 244–252.
- Epstein, M.M., Kasperzyk, J.L., Andrén, O., Giovannucci, E.L., Wolk, A., Håkansson, N., Andersson, S.-O., Johansson, J.-E., Fall, K., and Mucci, L.A. (2011). Dietary zinc and prostate cancer survival in a Swedish cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*, 586–593.
- Epstein, R.S., Deverka, P.A., Chute, C.G., Lieber, M.M., Oesterling, J.E., Panser, L., Schwartz, S.W., Guess, H.A., and Patrick, D. (1991). Urinary symptom and quality of life questions indicative of obstructive benign prostatic hyperplasia. Results of a pilot study. *Urology* *38*, 20–26.
- Erez, A., and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer - finding method in madness. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 440–448.

Eskens, F.A., Greim, G.A., van Zuylen, C., Wolff, I., Denis, L.J., Planting, A.S., Muskiet, F.A., Wanders, J., Barbet, N.C., Choi, L., et al. (2000). Phase I and pharmacological study of weekly administration of the polyamine synthesis inhibitor SAM 486A (CGP 48 664) in patients with solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer Early Clinical Studies Group. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1736–1743.

Esmat, A.Y., Refaie, F.M., Shaheen, M.H., and Said, M.M. (2002). Chemoprevention of prostate carcinogenesis by DFMO and/or finasteride treatment in male Wistar rats. *Tumori* *88*, 513–521.

Evans, S., Metcalfe, C., Ibrahim, F., Persad, R., and Ben-Shlomo, Y. (2008). Investigating Black-White differences in prostate cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* *123*, 430–435.

Fan, M., Rhee, J., St-Pierre, J., Handschin, C., Puigserver, P., Lin, J., Jäeger, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Spiegelman, B.M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* *18*, 278–289.

Fan, Y., Dickman, K.G., and Zong, W.-X. (2010). Akt and c-Myc Differentially Activate Cellular Metabolic Programs and Prime Cells to Bioenergetic Inhibition. *J. Biol. Chem.* *285*, 7324–7333.

Farnsworth, W.E. (1999). Prostate stroma: physiology. *The Prostate* *38*, 60–72.

Feilchenfeldt, J., Bründler, M.A., Soravia, C., Tötsch, M., and Meier, C.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPAR γ -coactivator 1 (PGC-1). *Cancer Lett.* *203*, 25–33.

Feith, D.J., Origanti, S., Shoop, P.L., Sass-Kuhn, S., and Shantz, L.M. (2006). Tumor suppressor activity of ODC antizyme in MEK-driven skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* *27*, 1090–1098.

Fendt, S.-M., Bell, E.L., Keibler, M.A., Olenchock, B.A., Mayers, J.R., Wasylenko, T.M., Vokes, N.I., Guarente, L., Vander Heiden, M.G., and Stephanopoulos, G. (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat. Commun.* *4*, 2236.

Feng, P., Li, T.-L., Guan, Z.-X., Franklin, R.B., and Costello, L.C. (2002). Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells. *The Prostate* *52*, 311–318.

Feroli, M.E., Pirona, L., and Pinotti, O. (2000). Prolactin and polyamine catabolism: specific effect on polyamine oxidase activity in rat thymus. *Mol. Cell. Endocrinol.* *165*, 51–56.

Fernandez-Marcos, P.J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*, 884S – 90.

Ferro, M., Terracciano, D., Buonerba, C., Lucarelli, G., Bottero, D., Perdonà, S., Autorino, R., Serino, A., Cantiello, F., Damiano, R., et al. (2017). The emerging role of obesity, diet and lipid metabolism in prostate cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* *13*, 285–293.

Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* *116*, 615–622.

Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* *115*, 2540–2548.

Fitzpatrick, J.M. (2006). The natural history of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* *97 Suppl 2*, 3–6; discussion 21–22.

- Flamigni, F., Stanic', I., Facchini, A., Cetrullo, S., Tantini, B., Borzì, R.M., Guarnieri, C., and Caldarera, C.M. (2007). Polyamine biosynthesis as a target to inhibit apoptosis of non-tumoral cells. *Amino Acids* 33, 197–202.
- Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P.L., and Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* 6, 551–562.
- Flavin, R., Zadra, G., and Loda, M. (2011). Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer. *J. Pathol.* 223, 283–294.
- Fleiderovich, I.A., Libman, L., Katz, E., and Gutnick, M.J. (2008). Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated Na⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18994–18999.
- Ford, W.C., and Harrison, A. (1984). The role of citrate in determining the activity of calcium ions in human semen. *Int. J. Androl.* 7, 198–202.
- Forte, M., Guy, H.R., and Mannella, C.A. (1987). Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19, 341–350.
- Fradet, A., Bouchet, M., Delliaux, C., Gervais, M., Kan, C., Benetollo, C., Pantano, F., Vargas, G., Bouazza, L., Croset, M., et al. (2016). Estrogen related receptor alpha in castration-resistant prostate cancer cells promotes tumor progression in bone. *Oncotarget* 7, 77071–77086.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., and Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983–8998.
- Franz, M.-C., Anderle, P., Bürzle, M., Suzuki, Y., Freeman, M.R., Hediger, M.A., and Kovacs, G. (2013). Zinc transporters in prostate cancer. *Mol. Aspects Med.* 34, 735–741.
- Freie, B.W., and Eisenman, R.N. (2008). Ratcheting Myc. *Cancer Cell* 14, 425–426.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.
- Fulda, S., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 447–464.
- Galiano, M., Pignot, G., Costa, C., Vallancien, G., and Virag, R. (2010). [Erectile dysfunction and cavernosal endothelial cells]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* 20, 188–193.
- Gallagher, F.A., Kettunen, M.I., Day, S.E., Lerche, M., and Brindle, K.M. (2008). ¹³C MR spectroscopy measurements of glutaminase activity in human hepatocellular carcinoma cells using hyperpolarized ¹³C-labeled glutamine. *Magn. Reson. Med.* 60, 253–257.
- Gallus, S., Foschi, R., Negri, E., Talamini, R., Franceschi, S., Montella, M., Ramazzotti, V., Tavani, A., Dal Maso, L., and La Vecchia, C. (2007). Dietary zinc and prostate cancer risk: a case-control study from Italy. *Eur. Urol.* 52, 1052–1056.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G., and Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 829–846.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 28, 690–714.

- Gandre, S., Bercovich, Z., and Kahana, C. (2002). Ornithine decarboxylase-antizyme is rapidly degraded through a mechanism that requires functional ubiquitin-dependent proteolytic activity. *Eur. J. Biochem.* *269*, 1316–1322.
- Gann, P.H. (2002). Risk factors for prostate cancer. *Rev. Urol.* *4 Suppl 5*, S3–S10.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762–765.
- García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernandez, P., and Rodríguez-Zavala, J.S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 12695–12703.
- Garraway, I.P., Sun, W., Tran, C.P., Perner, S., Zhang, B., Goldstein, A.S., Hahm, S.A., Haider, M., Head, C.S., Reiter, R.E., et al. (2010). Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. *The Prostate* *70*, 491–501.
- Geissler, A., Krimmer, T., Bömer, U., Guiard, B., Rassow, J., and Pfanner, N. (2000). Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the $\Delta\psi$ -dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol. Biol. Cell* *11*, 3977–3991.
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* *26*, 1913–1923.
- Gerner, E.W., and Meyskens, F.L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 781–792.
- Giardiello, F.M., Hamilton, S.R., Hylind, L.M., Yang, V.W., Tamez, P., and Casero, R.A. (1997). Ornithine decarboxylase and polyamines in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* *57*, 199–201.
- Gilmour, S.K. (2007). Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *224*, 249–256.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* *15*, 807–826.
- Giordano, A., Calvani, M., Petillo, O., Grippo, P., Tuccillo, F., Melone, M. a. B., Bonelli, P., Calarco, A., and Peluso, G. (2005). tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death Differ.* *12*, 603–613.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., and Yee, D. (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* *33*, 1674–1685.
- Gleason, D.F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* *50*, 125–128.
- Goetzman, E.S., and Prochownik, E.V. (2018). The Role for Myc in Coordinating Glycolysis, Oxidative Phosphorylation, Glutaminolysis, and Fatty Acid Metabolism in Normal and Neoplastic Tissues. *Front. Endocrinol.* *9*.
- Goldstein, A.S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I.P., and Witte, O.N. (2010). Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* *329*, 568–571.

- Gomella, L.G., Liu, X.S., Trabulsi, E.J., Kelly, W.K., Myers, R., Showalter, T., Dicker, A., and Wender, R. (2011). Screening for prostate cancer: the current evidence and guidelines controversy. *Can. J. Urol.* *18*, 5875–5883.
- Gómez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., and Martínez, J.A. (2001). Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol. Cell. Endocrinol.* *176*, 85–90.
- Gonzalez, A., Peters, U., Lampe, J.W., and White, E. (2009). Zinc intake from supplements and diet and prostate cancer. *Nutr. Cancer* *61*, 206–215.
- Gordan, J.D., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *17*, 71–77.
- Gorrini, C., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 931–947.
- Gosselaar, C., Roobol, M.J., Roemeling, S., and Schröder, F.H. (2008). The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur. Urol.* *54*, 581–588.
- Greco, S., Hugueny, I., George, P., Perrin, P., Louisot, P., and Biol, M.C. (2000). Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. *Biochem. J.* *345 Pt 1*, 69–75.
- Gréco, S., Niepceron, E., Hugueny, I., George, P., Louisot, P., and Biol, M.C. (2001). Dietary spermidine and spermine participate in the maturation of galactosyltransferase activity and glycoprotein galactosylation in rat small intestine. *J. Nutr.* *131*, 1890–1897.
- Griffiths, J. (1889). Observations on the Anatomy of the Prostate. *J. Anat. Physiol.* *23*, 374–386.
- Grosclaude, P., Belot, A., Daubisse Marliac, L., Remontet, L., Leone, N., Bossard, N., Velten, M., and réseau Francim (2015). [Prostate cancer incidence and mortality trends in France from 1980 to 2011]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *25*, 536–542.
- Gross, E. (2011). [Conformal radiotherapy for prostate cancers]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *21*, 801–807.
- Gross, M.I., Demo, S.D., Dennison, J.B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J.R., Laidig, G.J., Lewis, E.R., Li, J., et al. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 890–901.
- Grossi, M., Phanstiel, O., Rippe, C., Swärd, K., Alajbegovic, A., Albinsson, S., Forte, A., Persson, L., Hellstrand, P., and Nilsson, B.-O. (2016). Inhibition of Polyamine Uptake Potentiates the Anti-Proliferative Effect of Polyamine Synthesis Inhibition and Preserves the Contractile Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Cell. Physiol.* *231*, 1334–1342.
- Group PCTC (2000). Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials. Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet Lond. Engl.* *355*, 1491–1498.
- Guan, H.-P., Ishizuka, T., Chui, P.C., Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev.* *19*, 453–461.
- Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* *12*, 9–22.

- Gugliucci, A. (2004). Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *344*, 23–35.
- Guo, D., and Lu, Z. (2003). Interaction mechanisms between polyamines and IRK1 inward rectifier K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* *122*, 485–500.
- Guo, X., Rao, J.N., Liu, L., Rizvi, M., Turner, D.J., and Wang, J.-Y. (2002). Polyamines regulate beta-catenin tyrosine phosphorylation via Ca²⁺ during intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *283*, C722-734.
- Guo, X., Rao, J.N., Liu, L., Zou, T.-T., Turner, D.J., Bass, B.L., and Wang, J.-Y. (2003). Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C1174-1187.
- Guo, X., Rao, J.N., Liu, L., Zou, T., Keledjian, K.M., Boneva, D., Marasa, B.S., and Wang, J.-Y. (2005). Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G1159-1169.
- Gupta, S., Ahmad, N., Marengo, S.R., MacLennan, G.T., Greenberg, N.M., and Mukhtar, H. (2000). Chemoprevention of prostate carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in TRAMP mice. *Cancer Res.* *60*, 5125–5133.
- Gutzeit, A., Doert, A., Froehlich, J.M., Eckhardt, B.P., Meili, A., Scherr, P., Schmid, D.T., Graf, N., von Weyarn, C.A., Willemse, E.M.M., et al. (2010). Comparison of diffusion-weighted whole body MRI and skeletal scintigraphy for the detection of bone metastases in patients with prostate or breast carcinoma. *Skeletal Radiol.* *39*, 333–343.
- Guzy, R.D., and Schumacker, P.T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* *91*, 807–819.
- Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., and Schumacker, P.T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* *1*, 401–408.
- Hackshaw-McGeagh, L.E., Perry, R.E., Leach, V.A., Qandil, S., Jeffreys, M., Martin, R.M., and Lane, J.A. (2015). A systematic review of dietary, nutritional, and physical activity interventions for the prevention of prostate cancer progression and mortality. *Cancer Causes Control CCC* *26*, 1521–1550.
- Hales, K.G. (2004). The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion* *4*, 285–308.
- Hambrock, T., Hoeks, C., Hulsbergen-van de Kaa, C., Scheenen, T., Fütterer, J., Bouwense, S., van Oort, I., Schröder, F., Huisman, H., and Barentsz, J. (2012). Prospective assessment of prostate cancer aggressiveness using 3-T diffusion-weighted magnetic resonance imaging-guided biopsies versus a systematic 10-core transrectal ultrasound prostate biopsy cohort. *Eur. Urol.* *61*, 177–184.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* *27*, 728–735.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T., and Spiegelman, B.M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7111–7116.

- Hanfrey, C., Elliott, K.A., Franceschetti, M., Mayer, M.J., Illingworth, C., and Michael, A.J. (2005). A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation. *J. Biol. Chem.* *280*, 39229–39237.
- Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., et al. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* *23*, 302–315.
- Haraldsdottir, S., Hampel, H., Wei, L., Wu, C., Frankel, W., Bekaii-Saab, T., de la Chapelle, A., and Goldberg, R.M. (2014). Prostate cancer incidence in males with Lynch syndrome. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* *16*, 553–557.
- Hassanein, M., Qian, J., Hoeksema, M.D., Wang, J., Jacobovitz, M., Ji, X., Harris, F.T., Harris, B.K., Boyd, K.L., Chen, H., et al. (2015). Targeting SLC1a5-mediated glutamine dependence in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* *137*, 1587–1597.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A.N., Dhanak, D., Hingorani, S.R., Tuveson, D.A., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* *8*, 311–321.
- Hayashi, S., Murakami, Y., and Matsufuji, S. (1996). Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 27–30.
- Hayes, C.S., Shicora, A.C., Keough, M.P., Snook, A.E., Burns, M.R., and Gilmour, S.K. (2014). Polyamine-blocking therapy reverses immunosuppression in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 274–285.
- Hayward, S.W., and Cunha, G.R. (2000). The prostate: development and physiology. *Radiol. Clin. North Am.* *38*, 1–14.
- Heck, M.M., Souvatzoglou, M., Retz, M., Nawroth, R., Kübler, H., Maurer, T., Thalgott, M., Gramer, B.M., Weirich, G., Rondak, I.-C., et al. (2014). Prospective comparison of computed tomography, diffusion-weighted magnetic resonance imaging and [11C]choline positron emission tomography/computed tomography for preoperative lymph node staging in prostate cancer patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *41*, 694–701.
- Heinzer, H., Hammerer, P.G., and Huland, H. (1999). Anatomy and physiology of the male urethral sphincter and its preservation in prostatic surgery. *Urol. Res.* *27*, 404–408.
- Hemminki, K., and Czene, K. (2002). Age specific and attributable risks of familial prostate carcinoma from the family-cancer database. *Cancer* *95*, 1346–1353.
- Henderson Pozzi, M., Gawandi, V., and Fitzpatrick, P.F. (2009). pH dependence of a mammalian polyamine oxidase: insights into substrate specificity and the role of lysine 315. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 1508–1516.
- Hennequin, C., Cormier, L., Richaud, P., Bastide, C., Beuzeboc, P., Fromont, G., Mongiat-Artus, P., Peyromaure, M., Ploussard, G., Renard-Penna, R., et al. (2013). [Prostate brachytherapy: indications and outcomes]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *23*, 378–385.
- Hermabessière, E. *Physiologie de la prostate.*

- Herr, H.W., Warrel, R.P., and Burchenal, J.H. (1986). Phase I trial of alpha-difluoromethyl ornithine (DFMO) and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) (MGBG) in patients with advanced prostatic cancer. *Urology* 28, 508–511.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179–183.
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.-L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S., and Martinou, J.-C. (2012). Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 337, 93–96.
- Hewitson, K.S., Liénard, B.M.R., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Butler, D., Soares, A.S., Oldham, N.J., McNeill, L.A., and Schofield, C.J. (2007). Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* 282, 3293–3301.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Döbbling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res.* 68, 650–656.
- Hoet, P.H., and Nemery, B. (2000). Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L417–433.
- Holmuhamedov, E., Lewis, L., Bienengraeber, M., Holmuhamedova, M., Jahangir, A., and Terzic, A. (2002). Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1010–1016.
- Hood, D.A., Irrcher, I., Ljubicic, V., and Joseph, A.-M. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 209, 2265–2275.
- Horn, Y., Schechter, P.J., and Marton, L.J. (1987). Phase I-II clinical trial with alpha-difluoromethylornithine--an inhibitor of polyamine biosynthesis. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23, 1103–1107.
- Hosios, A.M., Hecht, V.C., Danai, L.V., Johnson, M.O., Rathmell, J.C., Steinhäuser, M.L., Manalis, S.R., and Vander Heiden, M.G. (2016). Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev. Cell* 36, 540–549.
- Hossain, F., Al-Khami, A.A., Wyczechowska, D., Hernandez, C., Zheng, L., Reiss, K., Valle, L.D., Trillo-Tinoco, J., Maj, T., Zou, W., et al. (2015). Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol. Res.* 3, 1236–1247.
- Hövels, A.M., Heesackers, R. a. M., Adang, E.M., Jager, G.J., Strum, S., Hoogeveen, Y.L., Severens, J.L., and Barentsz, J.O. (2008). The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin. Radiol.* 63, 387–395.
- Hsu, P.P., and Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–707.
- Hu, S., Balakrishnan, A., Bok, R.A., Anderton, B., Larson, P.E.Z., Nelson, S.J., Kurhanewicz, J., Vigneron, D.B., and Goga, A. (2011). ¹³C-pyruvate imaging reveals alterations in glycolysis that precede c-Myc-induced tumor formation and regression. *Cell Metab.* 14, 131–142.

- Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J., and Abraham, R.T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7004–7014.
- Hudson, D.L., O'Hare, M., Watt, F.M., and Masters, J.R. (2000). Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *80*, 1243–1250.
- Hurt, E.M., Kawasaki, B.T., Klarmann, G.J., Thomas, S.B., and Farrar, W.L. (2008). CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br. J. Cancer* *98*, 756–765.
- Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2004). Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ. Res.* *95*, 568–578.
- Huss, J.M., Kopp, R.P., and Kelly, D.P. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.* *277*, 40265–40274.
- Huss, J.M., Torra, I.P., Staels, B., Giguère, V., and Kelly, D.P. (2004). Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9079–9091.
- Hutch, J.A., and Rambo, O.S. (1970). A study of the anatomy of the prostate, prostatic urethra and the urinary sphincter system. *J. Urol.* *104*, 443–452.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *271*, 559–564.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2010a). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol. Biochem. PPB* *48*, 506–512.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2010b). Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 39–51.
- Ilic, D., Neuberger, M.M., Djulbegovic, M., and Dahm, P. (2013). Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004720.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.-L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., et al. (2005). HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* *8*, 143–153.
- Ivanov, I.P., and Atkins, J.F. (2007). Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation. *Nucleic Acids Res.* *35*, 1842–1858.
- Ivanov, I.P., Loughran, G., and Atkins, J.F. (2008). uORFs with unusual translational start codons autoregulate expression of eukaryotic ornithine decarboxylase homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10079–10084.

- Ivanov, I.P., Atkins, J.F., and Michael, A.J. (2010). A profusion of upstream open reading frame mechanisms in polyamine-responsive translational regulation. *Nucleic Acids Res.* *38*, 353–359.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., et al. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* *12*, 149–162.
- Jacque, N., Ronchetti, A.M., Larrue, C., Meunier, G., Birsén, R., Willems, L., Saland, E., Decroocq, J., Maciel, T.T., Lambert, M., et al. (2015). Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood* *126*, 1346–1356.
- Jager, G.J., Ruijter, E.T., van de Kaa, C.A., de la Rosette, J.J., Oosterhof, G.O., Thornbury, J.R., and Barentsz, J.O. (1996). Local staging of prostate cancer with endorectal MR imaging: correlation with histopathology. *AJR Am. J. Roentgenol.* *166*, 845–852.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12017–12022.
- Jänne, J., Alhonen, L., Pietilä, M., and Keinänen, T.A. (2004). Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem.* *271*, 877–894.
- Jänne, J., Alhonen, L., Pietilä, M., Keinänen, T.A., Uimari, A., Hyvönen, M.T., Pirinen, E., and Järvinen, A. (2006). Genetic manipulation of polyamine catabolism in rodents. *J. Biochem. (Tokyo)* *139*, 155–160.
- Jeevanandam, M., and Petersen, S.R. (2001). Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *4*, 385–390.
- Jell, J., Merali, S., Hensen, M.L., Mazurchuk, R., Spornyak, J.A., Diegelman, P., Kisiel, N.D., Barrero, C., Deeb, K.K., Alhonen, L., et al. (2007). Genetically altered expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. *J. Biol. Chem.* *282*, 8404–8413.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA. Cancer J. Clin.* *60*, 277–300.
- Jeter, J.M., Curiel-Lewandrowski, C., Stratton, S.P., Myrdal, P.B., Warneke, J.A., Einspahr, J.G., Bartels, H.G., Yozwiak, M., Bermudez, Y., Hu, C., et al. (2016). Phase IIB Randomized Study of Topical Difluoromethylornithine and Topical Diclofenac on Sun-Damaged Skin of the Forearm. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *9*, 128–134.
- Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., et al. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* *448*, 807–810.
- Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T., and Vogt, P.K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 363–369.
- Jiang, L., Shestov, A.A., Swain, P., Yang, C., Parker, S.J., Wang, Q.A., Terada, L.S., Adams, N.D., McCabe, M.T., Pietrak, B., et al. (2016). Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature* *532*, 255–258.
- Johns, L.E., and Houlston, R.S. (2003). A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* *91*, 789–794.

- Johnson, L.R., and McCormack, S.A. (1999). Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* *14*, 12–17.
- Jolois, O., Peulen, O., Collin, S., Simons, M., Dandrifosse, G., and Heinen, E. (2002). Spermine induces precocious development of the spleen in mice. *Exp. Physiol.* *87*, 69–75.
- Jones, A.W.E., Yao, Z., Vicencio, J.M., Karkucinska-Wieckowska, A., and Szabadkai, G. (2012). PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling. *Mitochondrion* *12*, 86–99.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* *18*, 283–293.
- Jørgensen, S.B., Wojtaszewski, J.F.P., Viollet, B., Andreelli, F., Birk, J.B., Hellsten, Y., Schjerling, P., Vaulont, S., Neuffer, P.D., Richter, E.A., et al. (2005). Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1146–1148.
- Joshi, A.D., Corral, R., Catsburg, C., Lewinger, J.P., Koo, J., John, E.M., Ingles, S.A., and Stern, M.C. (2012). Red meat and poultry, cooking practices, genetic susceptibility and risk of prostate cancer: results from a multiethnic case-control study. *Carcinogenesis* *33*, 2108–2118.
- Kaadige, M.R., Elgort, M.G., and Ayer, D.E. (2010). Coordination of glucose and glutamine utilization by an expanded Myc network. *Transcription* *1*, 36–40.
- Kaelin, W.G. (2005). ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metab.* *1*, 357–358.
- Kaelin, W.G. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 865–873.
- Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* *30*, 393–402.
- Kahana, C. (2007). Ubiquitin dependent and independent protein degradation in the regulation of cellular polyamines. *Amino Acids* *33*, 225–230.
- Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., and Kakizuka, A. (2003). PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12378–12383.
- Kankare, K., Uusi-Oukari, M., and Jänne, O.A. (1997). Structure, organization and expression of the mouse ornithine decarboxylase antizyme gene. *Biochem. J.* *324 (Pt 3)*, 807–813.
- Kapitsinou, P.P., and Haase, V.H. (2008). The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ.* *15*, 650–659.
- Karthaus, W.R., Iaquinta, P.J., Drost, J., Gracanin, A., van Boxtel, R., Wongvipat, J., Dowling, C.M., Gao, D., Begthel, H., Sachs, N., et al. (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* *159*, 163–175.
- Katt, W.P., and Cerione, R.A. (2014). Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. *Drug Discov. Today* *19*, 450–457.

- Kaur, N., Delcros, J.-G., Archer, J., Weagraff, N.Z., Martin, B., and Phanstiel IV, O. (2008). Designing the polyamine pharmacophore: influence of N-substituents on the transport behavior of polyamine conjugates. *J. Med. Chem.* *51*, 2551–2560.
- Kawakami, Y., Tsuda, M., Takahashi, S., Taniguchi, N., Esteban, C.R., Zemmyo, M., Furumatsu, T., Lotz, M., Izpisua Belmonte, J.C., and Asahara, H. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 α regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2414–2419.
- Kelly, D.P., and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* *18*, 357–368.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* *35*, 603–610.
- Khan, F.U., Ihsan, A.U., Khan, H.U., Jana, R., Wazir, J., Khongorzul, P., Waqar, M., and Zhou, X. (2017). Comprehensive overview of prostatitis. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *94*, 1064–1076.
- Kheirandish, P., and Chinegwundoh, F. (2011). Ethnic differences in prostate cancer. *Br. J. Cancer* *105*, 481–485.
- Kiciński, M., Vangronsveld, J., and Nawrot, T.S. (2011). An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: a meta-analysis. *PLoS One* *6*, e27130.
- Kim, J., Zeller, K.I., Wang, Y., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A., and Dang, C.V. (2004). Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5923–5936.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* *3*, 177–185.
- Kim, J., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7381–7393.
- Kim, J.Y., Kim, S.H., Kim, Y.H., Lee, H.J., Kim, M.J., and Choi, M.S. (2014). Low-risk prostate cancer: the accuracy of multiparametric MR imaging for detection. *Radiology* *271*, 435–444.
- Klimberg, V.S., and McClellan, J.L. (1996). Claude H. Organ, Jr. Honorary Lectureship. Glutamine, cancer, and its therapy. *Am. J. Surg.* *172*, 418–424.
- Klimcakova, E., Chénard, V., McQuirk, S., Germain, D., Avizonis, D., Muller, W.J., and St-Pierre, J. (2012). PGC-1 α promotes the growth of ErbB2/Neu-induced mammary tumors by regulating nutrient supply. *Cancer Res.* *72*, 1538–1546.
- Knutti, D., and Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *12*, 360–365.
- Knutti, D., Kaul, A., and Kralli, A. (2000). A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2411–2422.
- Knutti, D., Kressler, D., and Kralli, A. (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9713–9718.

- Konturek, P.C., Brzozowski, T., Konturek, S.J., Szlachcic, A., and Hahn, E.G. (1998). Polyamines and epidermal growth factor in the recovery of gastric mucosa from stress-induced gastric lesions. *J. Clin. Gastroenterol.* *27 Suppl 1*, S97-104.
- Koomoa, D.-L.T., Yco, L.P., Borsics, T., Wallick, C.J., and Bachmann, A.S. (2008). Ornithine decarboxylase inhibition by alpha-difluoromethylornithine activates opposing signaling pathways via phosphorylation of both Akt/protein kinase B and p27Kip1 in neuroblastoma. *Cancer Res.* *68*, 9825–9831.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C.V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 325–337.
- Koutros, S., Alavanja, M.C.R., Lubin, J.H., Sandler, D.P., Hoppin, J.A., Lynch, C.F., Knott, C., Blair, A., and Freeman, L.E.B. (2010). An update of cancer incidence in the Agricultural Health Study. *J. Occup. Environ. Med.* *52*, 1098–1105.
- Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D., and Kralli, A. (2002). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *277*, 13918–13925.
- Kreul, S.M., Havighurst, T., Kim, K., Mendonça, E.A., Wood, G.S., Snow, S., Borich, A., Verma, A., and Bailey, H.H. (2012). A phase III skin cancer chemoprevention study of DFMO: long-term follow-up of skin cancer events and toxicity. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *5*, 1368–1374.
- Kridel, S.J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., and Smith, J.W. (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* *64*, 2070–2075.
- Krieger, J.N., and Thumbikat, P. (2016). Bacterial Prostatitis: Bacterial Virulence, Clinical Outcomes, and New Directions. *Microbiol. Spectr.* *4*.
- Kristal, A.R., Arnold, K.B., Neuhaus, M.L., Goodman, P., Platz, E.A., Albanes, D., and Thompson, I.M. (2010). Diet, supplement use, and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Am. J. Epidemiol.* *172*, 566–577.
- Kroemer, G., Senovilla, L., Galluzzi, L., André, F., and Zitvogel, L. (2015). Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat. Med.* *21*, 1128–1138.
- Ku, J.H., Seo, S.Y., Kwak, C., and Kim, H.H. (2012). The role of survivin and Bcl-2 in zinc-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Urol. Oncol.* *30*, 562–568.
- Kucharzewska, P., Welch, J.E., Svensson, K.J., and Belting, M. (2009). The polyamines regulate endothelial cell survival during hypoxic stress through PI3K/AKT and MCL-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *380*, 413–418.
- Kuemmerle, N.B., Rysman, E., Lombardo, P.S., Flanagan, A.J., Lipe, B.C., Wells, W.A., Pettus, J.R., Froehlich, H.M., Memoli, V.A., Morganelli, P.M., et al. (2011). Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 427–436.
- Kuhajda, F.P. (2008). AMP-activated protein kinase and human cancer: cancer metabolism revisited. *Int. J. Obes.* *2005 32 Suppl 4*, S36-41.
- Kuhajda, F.P., Pizer, E.S., Li, J.N., Mani, N.S., Frehywot, G.L., and Townsend, C.A. (2000). Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 3450–3454.
- Kumar, A., Giri, S., and Shaha, C. (2018). Sestrin2 facilitates glutamine-dependent transcription of PGC-1 α and survival of liver cancer cells under glucose limitation. *FEBS J.* *285*, 1326–1345.

Kurata, H.T., Cheng, W.W., Arrabit, C., Slesinger, P.A., and Nichols, C.G. (2007). The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of Kir2.1 channels. *J. Gen. Physiol.* *130*, 145–155.

Kurata, H.T., Diraviyam, K., Marton, L.J., and Nichols, C.G. (2008). Blocker protection by short spermine analogs: refined mapping of the spermine binding site in a Kir channel. *Biophys. J.* *95*, 3827–3839.

Kyriakopoulos, C.E., and Liu, G. (2016). Chemohormonal Therapy for Hormone-Sensitive Prostate Cancer: A Review. *Cancer J. Sudbury Mass* *22*, 322–325.

LaGory, E.L., Wu, C., Taniguchi, C.M., Ding, C.-K.C., Chi, J.-T., von Eyben, R., Scott, D.A., Richardson, A.D., and Giaccia, A.J. (2015). Suppression of PGC-1 α Is Critical for Reprogramming Oxidative Metabolism in Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.* *12*, 116–127.

Lam, K., Zhang, L., Bewick, M., and Lafrenie, R.M. (2005). HSG cells differentiated by culture on extracellular matrix involves induction of S-adenosylmethione decarboxylase and ornithine decarboxylase. *J. Cell. Physiol.* *203*, 353–361.

Langenhuijsen, J.F., Badhauser, D., Schaaf, B., Kiemeny, L.A.L.M., Witjes, J.A., and Mulders, P.F.A. (2013). Continuous vs. intermittent androgen deprivation therapy for metastatic prostate cancer. *Urol. Oncol.* *31*, 549–556.

Larqué, E., Sabater-Molina, M., and Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *23*, 87–95.

Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Zhang, H., et al. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* *15*, 110–121.

LeBleu, V.S., O'Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., de Carvalho, F.M., Damascena, A., Domingos Chinen, L.T., Rocha, R.M., et al. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* *16*, 992–1003, 1–15.

Lecouvet, F.E., Simon, M., Tombal, B., Jamart, J., Vande Berg, B.C., and Simoni, P. (2010). Whole-body MRI (WB-MRI) versus axial skeleton MRI (AS-MRI) to detect and measure bone metastases in prostate cancer (PCa). *Eur. Radiol.* *20*, 2973–2982.

Lee, S.H., and Shen, M.M. (2015). Cell types of origin for prostate cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *37*, 35–41.

Lee, H.-J., Su, Y., Yin, P.-H., Lee, H.-C., and Chi, C.-W. (2009). PPAR(γ)/PGC-1(α) pathway in E-cadherin expression and motility of HepG2 cells. *Anticancer Res.* *29*, 5057–5063.

Lee, J., Michael, A.J., Martynowski, D., Goldsmith, E.J., and Phillips, M.A. (2007). Phylogenetic diversity and the structural basis of substrate specificity in the beta/alpha-barrel fold basic amino acid decarboxylases. *J. Biol. Chem.* *282*, 27115–27125.

Lefèvre, P.L.C., Palin, M.-F., and Murphy, B.D. (2011). Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr. Rev.* *32*, 694–712.

Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., and Kelly, D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.* *106*, 847–856.

- Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* *3*, e101.
- Lepor, H. (2005). Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia in the aging male population. *Rev. Urol.* *7 Suppl 4*, S3–S12.
- Lerin, C., Rodgers, J.T., Kalume, D.E., Kim, S., Pandey, A., and Puigserver, P. (2006). GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* *3*, 429–438.
- Levêque-Morlais, N., Tual, S., Clin, B., Adjemian, A., Baldi, I., and Lebailly, P. (2015). The AGRiculture and CANcer (AGRICAN) cohort study: enrollment and causes of death for the 2005-2009 period. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* *88*, 61–73.
- Levin, V.A., Uhm, J.H., Jaeckle, K.A., Choucair, A., Flynn, P.J., Yung WKA, null, Prados, M.D., Bruner, J.M., Chang, S.M., Kyritsis, A.P., et al. (2000). Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with alpha-difluoromethylornithine-procarbazine, N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosurea, vincristine (DFMO-PCV) versus PCV for glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 3878–3884.
- Levine, A.J., and Puzio-Kuter, A.M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* *330*, 1340–1344.
- Lewis, B.C., Shim, H., Li, Q., Wu, C.S., Lee, L.A., Maity, A., and Dang, C.V. (1997). Identification of putative c-Myc-responsive genes: characterization of rcl, a novel growth-related gene. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4967–4978.
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J.-W., Yustein, J.T., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6225–6234.
- Li, J., Zhao, S., Zhou, X., Zhang, T., Zhao, L., Miao, P., Song, S., Sun, X., Liu, J., Zhao, X., et al. (2013). Inhibition of lipolysis by mercaptoacetate and etomoxir specifically sensitize drug-resistant lung adenocarcinoma cell to paclitaxel. *PLoS One* *8*, e74623.
- Li, L., Rao, J.N., Guo, X., Liu, L., Santora, R., Bass, B.L., and Wang, J.Y. (2001). Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *281*, C941-953.
- Li, S., Liu, C., Li, N., Hao, T., Han, T., Hill, D.E., Vidal, M., and Lin, J.D. (2008). Genome-wide coactivation analysis of PGC-1alpha identifies BAF60a as a regulator of hepatic lipid metabolism. *Cell Metab.* *8*, 105–117.
- Li, X., Monks, B., Ge, Q., and Birnbaum, M.J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* *447*, 1012–1016.
- Libby, G., Donnelly, L.A., Donnan, P.T., Alessi, D.R., Morris, A.D., and Evans, J.M.M. (2009). New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* *32*, 1620–1625.

- Lichtensztajn, D.Y., Gomez, S.L., Sieh, W., Chung, B.I., Cheng, I., and Brooks, J.D. (2014). Prostate cancer risk profiles of Asian-American men: disentangling the effects of immigration status and race/ethnicity. *J. Urol.* *191*, 952–956.
- Lieberman, B.P., Ploessl, K., Wang, L., Qu, W., Zha, Z., Wise, D.R., Chodosh, L.A., Belka, G., Thompson, C.B., and Kung, H.F. (2011). PET imaging of glutaminolysis in tumors by 18F-(2S,4R)4-fluoroglutamine. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *52*, 1947–1955.
- Liesa, M., Palacín, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* *89*, 799–845.
- Lilja, H. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Urology* *62*, 27–33.
- Lilja, H., Ulmert, D., and Vickers, A.J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 268–278.
- Lin, X., and Veenstra, R.D. (2007). Effect of transjunctional KCl gradients on the spermine inhibition of connexin40 gap junctions. *Biophys. J.* *93*, 483–495.
- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* *277*, 1645–1648.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* *418*, 797–801.
- Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005a). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* *1*, 361–370.
- Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.-H., Handschin, C., Li, S., Yang, W., Pei, L., Uldry, M., Tontonoz, P., et al. (2005b). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* *120*, 261–273.
- Lin, P.-H., Aronson, W., and Freedland, S.J. (2017). An update of research evidence on nutrition and prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*
- Liu, Y. (2006). Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *9*, 230–234.
- Liu, A.Y., and True, L.D. (2002). Characterization of prostate cell types by CD cell surface molecules. *Am. J. Pathol.* *160*, 37–43.
- Liu, A.Y., Roudier, M.P., and True, L.D. (2004). Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. *Am. J. Pathol.* *165*, 1543–1556.
- Liu, L., Guo, X., Rao, J.N., Zou, T., Marasa, B.S., Chen, J., Greenspon, J., Casero, R.A., and Wang, J.-Y. (2006). Polyamine-modulated c-Myc expression in normal intestinal epithelial cells regulates p21Cip1 transcription through a proximal promoter region. *Biochem. J.* *398*, 257–267.
- Liu, L., Rao, J.N., Zou, T., Xiao, L., Wang, P.-Y., Turner, D.J., Gorospe, M., and Wang, J.-Y. (2009a). Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 4885–4898.

- Liu, L., Guo, X., Rao, J.N., Zou, T., Xiao, L., Yu, T., Timmons, J.A., Turner, D.J., and Wang, J.-Y. (2009b). Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C801-810.
- Liu, L., Sakakibara, K., Chen, Q., and Okamoto, K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.* *24*, 787–795.
- Liu, R., Zhang, H., Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Wang, X., Wang, C., Liu, B., Zen, K., Zhang, C.-Y., et al. (2017). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *39*, 1010428317695031.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147–157.
- Liu, Y., Zuckier, L.S., and Ghesani, N.V. (2010). Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer Res.* *30*, 369–374.
- Livingston, R.B., Venditti, J.M., Cooney, D.A., and Carter, S.K. (1970). Glutamine antagonists in chemotherapy. *Adv. Pharmacol. Chemother.* *8*, 57–120.
- Lloyd, T., Hounsome, L., Mehay, A., Mee, S., Verne, J., and Cooper, A. (2015). Lifetime risk of being diagnosed with, or dying from, prostate cancer by major ethnic group in England 2008-2010. *BMC Med.* *13*, 171.
- Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 572–583.
- Lonergan, P.E., and Tindall, D.J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J. Carcinog.* *10*, 20.
- López-Contreras, A.J., López-García, C., Jiménez-Cervantes, C., Cremades, A., and Peñafiel, R. (2006). Mouse ornithine decarboxylase-like gene encodes an antizyme inhibitor devoid of ornithine and arginine decarboxylating activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 30896–30906.
- Loubiere, C., Clavel, S., Gilleron, J., Harisseh, R., Fauconnier, J., Ben-Sahra, I., Kaminski, L., Laurent, K., Herkenne, S., Lacas-Gervais, S., et al. (2017). The energy disruptor metformin targets mitochondrial integrity via modification of calcium flux in cancer cells. *Sci. Rep.* *7*, 5040.
- Lowsley, O.S. (1915). THE PROSTATE GLAND IN OLD AGE. *Ann. Surg.* *62*, 716–737.
- Luk, G.D., Goodwin, G., Marton, L.J., and Baylin, S.B. (1981). Polyamines are necessary for the survival of human small-cell lung carcinoma in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 2355–2358.
- Luk, G.D., Goodwin, G., Gazdar, A.F., and Baylin, S.B. (1982). Growth-inhibitory effects of DL-alpha-difluoromethylornithine in the spectrum of human lung carcinoma cells in culture. *Cancer Res.* *42*, 3070–3073.
- Luk, G.D., Abeloff, M.D., Griffin, C.A., and Baylin, S.B. (1983). Successful treatment with DL-alpha-difluoromethylornithine in established human small cell variant lung carcinoma implants in athymic mice. *Cancer Res.* *43*, 4239–4243.
- Lum, J.J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J.D., DeBerardinis, R.J., Covelto, K.L., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2007). The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev.* *21*, 1037–1049.

- Luo, C., Lim, J.-H., Lee, Y., Granter, S.R., Thomas, A., Vazquez, F., Widlund, H.R., and Puigserver, P. (2016a). A PGC1 α -mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis. *Nature* 537, 422–426.
- Luo, C., Puigserver, P., and Widlund, H.R. (2016b). Breaking BRAF(V600E)-drug resistance by stressing mitochondria. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29, 401–403.
- Luo, C., Widlund, H.R., and Puigserver, P. (2016c). PGC-1 Coactivators: Shepherding the Mitochondrial Biogenesis of Tumors. *Trends Cancer* 2, 619–631.
- Luo, W., Birkett, N.J., Ugnat, A.-M., and Mao, Y. (2004). Cancer incidence patterns among Chinese immigrant populations in Alberta. *J. Immigr. Health* 6, 41–48.
- Lustig, Y., Ruas, J.L., Estall, J.L., Lo, J.C., Devarakonda, S., Laznik, D., Choi, J.H., Ono, H., Olsen, J.V., and Spiegelman, B.M. (2011). Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1{alpha} through S6 kinase. *Genes Dev.* 25, 1232–1244.
- Lynch, S.M., Mahajan, R., Beane Freeman, L.E., Hoppin, J.A., and Alavanja, M.C.R. (2009). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to butylate in the Agricultural Health Study (AHS). *Environ. Res.* 109, 860–868.
- Lynen, F. (1953). [Mechanism of beta oxidation of fatty acids]. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 35, 1061–1083.
- MacLean, H.E., Chiu, W.S.M., Notini, A.J., Axell, A.-M., Davey, R.A., McManus, J.F., Ma, C., Plant, D.R., Lynch, G.S., and Zajac, J.D. (2008). Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 2676–2689.
- Mahajan, R., Blair, A., Lynch, C.F., Schroeder, P., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., and Alavanja, M.C.R. (2006). Fonofos exposure and cancer incidence in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* 114, 1838–1842.
- Maier, T., Jenni, S., and Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* 311, 1258–1262.
- Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahan, L.M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T.J., Golub, T.R., et al. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat. Med.* 10, 594–601.
- Malt, R.A., Kingsnorth, A.N., Lamuraglia, G.M., Lacaine, F., and Ross, J.S. (1985). Chemoprevention and chemotherapy by inhibition of ornithine decarboxylase activity and polyamine synthesis: colonic, pancreatic, mammary, and renal carcinomas. *Adv. Enzyme Regul.* 24, 93–102.
- Mamont, P.S., Duchesne, M.C., Grove, J., and Bey, P. (1978). Anti-proliferative properties of DL-alpha-difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 58–66.
- Mandair, D., Rossi, R.E., Pericleous, M., Whyand, T., and Caplin, M.E. (2014). Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. *Nutr. Metab.* 11, 30.
- Mangold, U. (2005). The antizyme family: polyamines and beyond. *IUBMB Life* 57, 671–676.

- Manni, A., Grove, R., Kunselman, S., and Aldaz, C.M. (1995). Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett.* *92*, 49–57.
- Manni, A., Mauger, D., Gimotty, P., and Badger, B. (1996). Prognostic influence on survival of increased ornithine decarboxylase activity in human breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *2*, 1901–1906.
- Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T., and Simon, M.C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab.* *1*, 393–399.
- Márquez, J., Sánchez-Jiménez, F., Medina, M.A., Quesada, A.R., and Núñez de Castro, I. (1989). Nitrogen metabolism in tumor bearing mice. *Arch. Biochem. Biophys.* *268*, 667–675.
- Márquez, J., Alonso, F.J., Matés, J.M., Segura, J.A., Martín-Rufián, M., and Campos-Sandoval, J.A. (2017). Glutamine Addiction In Gliomas. *Neurochem. Res.* *42*, 1735–1746.
- Martinez, M.E., O'Brien, T.G., Fultz, K.E., Babbar, N., Yerushalmi, H., Qu, N., Guo, Y., Boorman, D., Einspahr, J., Alberts, D.S., et al. (2003). Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7859–7864.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 11–31.
- Mashima, T., Seimiya, H., and Tsuruo, T. (2009). De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br. J. Cancer* *100*, 1369–1372.
- Masson, J., Darmon, M., Conjard, A., Chuhma, N., Ropert, N., Thoby-Brisson, M., Foutz, A.S., Parrot, S., Miller, G.M., Jorisch, R., et al. (2006). Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 4660–4671.
- Matés, J.M., Segura, J.A., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.J., and Márquez, J. (2013). Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr. Mol. Med.* *13*, 514–534.
- Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H., and Benno, Y. (2011). Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One* *6*, e23652.
- Mazaheri, Y., Hricak, H., Fine, S.W., Akin, O., Shukla-Dave, A., Ishill, N.M., Moskowitz, C.S., Grater, J.E., Reuter, V.E., Zakian, K.L., et al. (2009). Prostate tumor volume measurement with combined T2-weighted imaging and diffusion-weighted MR: correlation with pathologic tumor volume. *Radiology* *252*, 449–457.
- Mazeron, J.-J. (2013). [Hormonotherapy of locally advanced cancer of the prostate: what determines the duration of hormone therapy?]. *Bull. Cancer (Paris)* *100*, 1069–1070.
- McCracken, M., Olsen, M., Chen, M.S., Jemal, A., Thun, M., Cokkinides, V., Deapen, D., and Ward, E. (2007). Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA. Cancer J. Clin.* *57*, 190–205.

- McGuirk, S., Gravel, S.-P., Deblois, G., Papadopoli, D.J., Faubert, B., Wegner, A., Hiller, K., Avizonis, D., Akavia, U.D., Jones, R.G., et al. (2013). PGC-1 α supports glutamine metabolism in breast cancer. *Cancer Metab.* *1*, 22.
- McNeal, J.E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *Am. J. Clin. Pathol.* *49*, 347–357.
- McNeal, J.E. (1972). The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J. Urol.* *107*, 1008–1016.
- McNeal, J.E. (1980). The anatomic heterogeneity of the prostate. *Prog. Clin. Biol. Res.* *37*, 149–160.
- McNeal, J.E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* *2*, 35–49.
- McNeal, J.E. (1984). Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog. Clin. Biol. Res.* *145*, 27–53.
- McNeal, J.E. (1988). Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* *12*, 619–633.
- McNeal, J.E., Redwine, E.A., Freiha, F.S., and Stamey, T.A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am. J. Surg. Pathol.* *12*, 897–906.
- Mechulam, A., Chernov, K.G., Mucher, E., Hamon, L., Curmi, P.A., and Pastré, D. (2009). Polyamine sharing between tubulin dimers favours microtubule nucleation and elongation via facilitated diffusion. *PLoS Comput. Biol.* *5*, e1000255.
- Medes, G., Thomas, A., and Weinhouse, S. (1953). Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res.* *13*, 27–29.
- Menendez, J.A., and Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 763–777.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* *481*, 380–384.
- Meyer, M.S., Penney, K.L., Stark, J.R., Schumacher, F.R., Sesso, H.D., Loda, M., Fiorentino, M., Finn, S., Flavin, R.J., Kurth, T., et al. (2010). Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression. *Carcinogenesis* *31*, 1597–1603.
- Meyskens, F.L., and Gerner, E.W. (1995). Development of difluoromethylornithine as a chemoprevention agent for the management of colon cancer. *J. Cell. Biochem. Suppl.* *22*, 126–131.
- Meyskens, F.L., and Gerner, E.W. (1999). Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 945–951.
- Meyskens, F.L., Kingsley, E.M., Glattke, T., Loeschner, L., and Booth, A. (1986). A phase II study of alpha-difluoromethylornithine (DFMO) for the treatment of metastatic melanoma. *Invest. New Drugs* *4*, 257–262.
- Meyskens, F.L., McLaren, C.E., Pelot, D., Fujikawa-Brooks, S., Carpenter, P.M., Hawk, E., Kelloff, G., Lawson, M.J., Kidao, J., McCracken, J., et al. (2008). Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *1*, 32–38.

- Meyskens, F.L., Simoneau, A.R., and Gerner, E.W. (2014). Chemoprevention of prostate cancer with the polyamine synthesis inhibitor difluoromethylornithine. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* 202, 115–120.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3820–3825.
- Michalak, K.P., Maćkowska-Kędziora, A., Sobolewski, B., and Woźniak, P. (2015). Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 964321.
- Michelakis, E.D., Webster, L., and Mackey, J.R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br. J. Cancer* 99, 989–994.
- Mickey, D.D., Carvalho, L., and Foulkes, K. (1989). Conventional chemotherapeutic agents combined with DMSO or DFMO in treatment of rat prostate carcinoma. *The Prostate* 15, 221–232.
- Migita, T., Ruiz, S., Fornari, A., Fiorentino, M., Priolo, C., Zadra, G., Inazuka, F., Grisanzio, C., Palescandolo, E., Shin, E., et al. (2009). Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 519–532.
- Mihich, E. (1963). CURRENT STUDIES WITH METHYLGLYOXAL-BIS(GUANYLHYDRAZONE). *Cancer Res.* 23, 1375–1389.
- Miller, B.A., Chu, K.C., Hankey, B.F., and Ries, L.A.G. (2008). Cancer incidence and mortality patterns among specific Asian and Pacific Islander populations in the U.S. *Cancer Causes Control CCC* 19, 227–256.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., and Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 5546–5553.
- Millikan, R.E., Wen, S., Pagliaro, L.C., Brown, M.A., Moomey, B., Do, K.-A., and Logothetis, C.J. (2008). Phase III trial of androgen ablation with or without three cycles of systemic chemotherapy for advanced prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5936–5942.
- Milovic, V. (2001). Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 1021–1025.
- Milovic, V., Turchanowa, L., Stein, J., and Caspary, W.F. (2001). Transepithelial transport of putrescine across monolayers of the human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *World J. Gastroenterol.* 7, 193–197.
- Misawa, A., and Inoue, S. (2015). Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Front. Endocrinol.* 6, 83.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 41, 445–502.
- Mohamed, A., Deng, X., Khuri, F.R., and Owonikoko, T.K. (2014). Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* 15, 7–15.

- Mohammed, A., Janakiram, N.B., Madka, V., Ritchie, R.L., Brewer, M., Biddick, L., Patlolla, J.M.R., Sadeghi, M., Lightfoot, S., Steele, V.E., et al. (2014). Eflornithine (DFMO) prevents progression of pancreatic cancer by modulating ornithine decarboxylase signaling. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 7, 1198–1209.
- Moinard, C., Cynober, L., and de Bandt, J.-P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 24, 184–197.
- Mole, D.R., Blancher, C., Copley, R.R., Pollard, P.J., Gleadle, J.M., Ragoussis, J., and Ratcliffe, P.J. (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J. Biol. Chem.* 284, 16767–16775.
- Moncada, S., Higgs, E.A., and Colombo, S.L. (2012). Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem. J.* 446, 1–7.
- Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., and Spiegelman, B.M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* 6, 307–316.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273.
- Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., et al. (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6570–6575.
- Mortensen, O.H., Frandsen, L., Schjerling, P., Nishimura, E., and Grunnet, N. (2006). PGC-1alpha and PGC-1beta have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E807-816.
- Mottet, N., Prayer-Galetti, T., Hammerer, P., Kattan, M.W., and Tunn, U. (2006). Optimizing outcomes and quality of life in the hormonal treatment of prostate cancer. *BJU Int.* 98, 20–27.
- Moulinoux, J.P., Quemener, V., Cipolla, B., Guillé, F., Havouis, R., Martin, C., Lobel, B., and Seiler, N. (1991). The growth of MAT-LyLu rat prostatic adenocarcinoma can be prevented in vivo by polyamine deprivation. *J. Urol.* 146, 1408–1412.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481, 385–388.
- Multigner, L. Le cancer de la prostate aux Antilles françaises : état des lieux. 6.
- Multigner, L., Ndong, J.R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jégou, B., Thome, J.P., and Blanchet, P. (2010). Chlordecone Exposure and Risk of Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 3457–3462.
- Murray-Stewart, T., Wang, Y., Goodwin, A., Hacker, A., Meeker, A., and Casero, R.A. (2008). Nuclear localization of human spermine oxidase isoforms - possible implications in drug response and disease etiology. *FEBS J.* 275, 2795–2806.

Muth, A., Madan, M., Archer, J.J., Ocampo, N., Rodriguez, L., and Phanstiel, O. (2014). Polyamine transport inhibitors: design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine. *J. Med. Chem.* *57*, 348–363.

Nadler, R.B., Humphrey, P.A., Smith, D.S., Catalona, W.J., and Ratliff, T.L. (1995). Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J. Urol.* *154*, 407–413.

Nakamoto, R.K., Baylis Scanlon, J.A., and Al-Shawi, M.K. (2008). The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* *476*, 43–50.

Napal, L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2005). An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. *J. Mol. Biol.* *354*, 751–759.

Nass, M.M. (1984). Analysis of methylglyoxal bis(guanyldrazone)-induced alterations of hamster tumor mitochondria by correlated studies of selective rhodamine binding, ultrastructural damage, DNA replication, and reversibility. *Cancer Res.* *44*, 2677–2688.

Nass, S., and Nass, M.M. (1963). INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. II. ENZYMATIC AND OTHER HYDROLYTIC TREATMENTS. *J. Cell Biol.* *19*, 613–629.

Neckelmann, N., Li, K., Wade, R.P., Shuster, R., and Wallace, D.C. (1987). cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7580–7584.

Nelson, W.G., Demarzo, A.M., and Yegnasubramanian, S. (2014). The diet as a cause of human prostate cancer. *Cancer Treat. Res.* *159*, 51–68.

Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 863–917.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* *136*, 521–534.

Nilsson, J.A., Maclean, K.H., Keller, U.B., Pendeville, H., Baudino, T.A., and Cleveland, J.L. (2004). Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 1560–1569.

Nilsson, J.A., Keller, U.B., Baudino, T.A., Yang, C., Norton, S., Old, J.A., Nilsson, L.M., Neale, G., Kramer, D.L., Porter, C.W., et al. (2005). Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell* *7*, 433–444.

Noordzij, M.A., van Steenbrugge, G.J., van der Kwast, T.H., and Schröder, F.H. (1995). Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urol. Res.* *22*, 333–341.

Nowotarski, S.L., Woster, P.M., and Casero, R.A. (2013). Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev. Mol. Med.* *15*, e3.

Nuhn, P., De Bono, J.S., Fizazi, K., Freedland, S.J., Grilli, M., Kantoff, P.W., Sonpavde, G., Sternberg, C.N., Yegnasubramanian, S., and Antonarakis, E.S. (2018). Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology. *Eur. Urol.*

- Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145–1159.
- Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2003). Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem. J.* 371, 89–96.
- O'Dwyer, P.J., Alonso, M.T., and Leyland-Jones, B. (1984). Acivicin: a new glutamine antagonist in clinical trials. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2, 1064–1071.
- Olson, B.L., Hock, M.B., Ekholm-Reed, S., Wohlschlegel, J.A., Dev, K.K., Kralli, A., and Reed, S.I. (2008). SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1alpha transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes Dev.* 22, 252–264.
- Onnis, B., Rapisarda, A., and Melillo, G. (2009). Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2780–2786.
- Oredsson, S.M. (2003). Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 366–370.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–21800.
- Ouameur, A.A., and Tajmir-Riahi, H.-A. (2004). Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 279, 42041–42054.
- Ouameur, A.A., Bourassa, P., and Tajmir-Riahi, H.-A. (2010). Probing tRNA interaction with biogenic polyamines. *RNA N. Y. N* 16, 1968–1979.
- Ousset, M., Van Keymeulen, A., Bouvencourt, G., Sharma, N., Achouri, Y., Simons, B.D., and Blanpain, C. (2012). Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 14, 1131–1138.
- Packer, J.R., and Maitland, N.J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1238–1260.
- Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114, 427–451.
- Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 1, 188–211.
- Pan, T., Gao, L., Wu, G., Shen, G., Xie, S., Wen, H., Yang, J., Zhou, Y., Tu, Z., and Qian, W. (2015). Elevated expression of glutaminase confers glucose utilization via glutaminolysis in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 452–458.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197.
- Paridaens, R., Uges, D.R., Barbet, N., Choi, L., Seeghers, M., van der Graaf, W.T., Groen, H.J., Dumez, H., Buuren, I.V., Muskiet, F., et al. (2000). A phase I study of a new polyamine biosynthesis inhibitor, SAM486A, in cancer patients with solid tumours. *Br. J. Cancer* 83, 594–601.
- Parimi, V., Goyal, R., Poropatich, K., and Yang, X.J. (2014). Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 2, 273–285.

- Parisi, M.A., and Clayton, D.A. (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252, 965–969.
- Park, M.H. (2006). The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 161–169.
- Park, M.H., Nishimura, K., Zanelli, C.F., and Valentini, S.R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38, 491–500.
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J.G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., et al. (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25, 1696–1708.
- Paumen, M.B., Ishida, Y., Han, H., Muramatsu, M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., and Honjo, T. (1997). Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 523–525.
- Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47.
- Pegg, A.E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234, 249–262.
- Pegg, A.E. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48, 759–774.
- Pegg, A.E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 281, 14529–14532.
- Pegg, A.E. (2008). Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E995-1010.
- Pegg, A.E. (2009a). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61, 880–894.
- Pegg, A.E. (2009b). S-Adenosylmethionine decarboxylase. *Essays Biochem.* 46, 25–45.
- Pegg, A.E., and McCann, P.P. (1982). Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243, C212-221.
- Pegg, A.E., and Michael, A.J. (2010). Spermine synthase. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 113–121.
- Pegg, A.E., Tang, K.C., and Coward, J.K. (1982). Effects of S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane on polyamine metabolism. *Biochemistry (Mosc.)* 21, 5082–5089.
- Pegg, A.E., Wechter, R., Poulin, R., Woster, P.M., and Coward, J.K. (1989). Effect of S-adenosyl-1,12-diamino-3-thio-9-azadodecane, a multisubstrate adduct inhibitor of spermine synthase, on polyamine metabolism in mammalian cells. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 8446–8453.
- Pegg, A.E., Xiong, H., Feith, D.J., and Shantz, L.M. (1998). S-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 580–586.
- Peisch, S.F., Van Blarigan, E.L., Chan, J.M., Stampfer, M.J., and Kenfield, S.A. (2017). Prostate cancer progression and mortality: a review of diet and lifestyle factors. *World J. Urol.* 35, 867–874.
- Pemble, C.W., Johnson, L.C., Kridel, S.J., and Lowther, W.T. (2007). Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 704–709.

- Pérez-Cano, F.J., González-Castro, A., Castellote, C., Franch, A., and Castell, M. (2010). Influence of breast milk polyamines on suckling rat immune system maturation. *Dev. Comp. Immunol.* *34*, 210–218.
- Persson, L., Wallström, E.L., Nasizadeh, S., Dartsch, C., Jeppsson, A., Wendt, A., and Holmgren, J. (1998). Regulation of mammalian ornithine decarboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* *26*, 575–579.
- Peters, J.M., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 181–195.
- Petros, L.M., Howard, M.T., Gesteland, R.F., and Atkins, J.F. (2005). Polyamine sensing during antizyme mRNA programmed frameshifting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 1478–1489.
- Pflug, B.R., Pecher, S.M., Brink, A.W., Nelson, J.B., and Foster, B.A. (2003). Increased fatty acid synthase expression and activity during progression of prostate cancer in the TRAMP model. *The Prostate* *57*, 245–254.
- Pinaquy, J.-B., De Clermont-Galleran, H., Pasticier, G., Rigou, G., Alberti, N., Hindie, E., Mokrane, Y., and Fernandez, P. (2015). Comparative effectiveness of [(18) F]-fluorocholine PET-CT and pelvic MRI with diffusion-weighted imaging for staging in patients with high-risk prostate cancer. *The Prostate* *75*, 323–331.
- Pirinen, E., Kuulasmaa, T., Pietilä, M., Heikkinen, S., Tusa, M., Itkonen, P., Boman, S., Skommer, J., Virkamäki, A., Hohtola, E., et al. (2007). Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 4953–4967.
- Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M.M., Hu, Z., Huddlestun, S.E., Zhao, Z., Leitch, A.M., Johnson, T.M., DeBerardinis, R.J., and Morrison, S.J. (2015). Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* *527*, 186–191.
- Pizer, E.S., Pflug, B.R., Bova, G.S., Han, W.F., Udan, M.S., and Nelson, J.B. (2001). Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *The Prostate* *47*, 102–110.
- Plas, D.R., and Thompson, C.B. (2005). Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* *24*, 7435–7442.
- Plas, D.R., Talapatra, S., Edinger, A.L., Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2001). Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J. Biol. Chem.* *276*, 12041–12048.
- Pless, M., Belhadj, K., Menssen, H.D., Kern, W., Coiffier, B., Wolf, J., Herrmann, R., Thiel, E., Bootle, D., Sklenar, I., et al. (2004). Clinical efficacy, tolerability, and safety of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 1299–1305.
- Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., and Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front. Chem.* *2*, 61.
- Poorthuis, M.H.F., Vernooij, R.W.M., van Moorselaar, R.J.A., and de Reijke, T.M. (2017). Second-line therapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with progression after or under docetaxel: A systematic review of nine randomized controlled trials. *Semin. Oncol.* *44*, 358–371.

- Porter, C.W., and Bergeron, R.J. (1983). Spermidine requirement for cell proliferation in eukaryotic cells: structural specificity and quantitation. *Science* 219, 1083–1085.
- Poulin, R., Casero, R.A., and Soulet, D. (2012). Recent advances in the molecular biology of metazoan polyamine transport. *Amino Acids* 42, 711–723.
- Powrozniak, B., Gharbi, M., Dandrifosse, G., and Peulen, O. (2004). Enhancement of lysozyme stability and activity by polyamines. *Biochimie* 86, 651–656.
- Prakash, N.J., Schechter, P.J., Grove, J., and Koch-Weser, J. (1978). Effect of alpha-difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on L1210 leukemia in mice. *Cancer Res.* 38, 3059–3062.
- Priest, R., Garzotto, M., and Kaufman, J. (2012). Benign prostatic hyperplasia: a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Tech. Vasc. Interv. Radiol.* 15, 261–264.
- Pucci, S., Zonetti, M.J., Fisco, T., Polidoro, C., Bocchinfuso, G., Palleschi, A., Novelli, G., Spagnoli, L.G., and Mazzarelli, P. (2016). Carnitine palmitoyl transferase-1A (CPT1A): a new tumor specific target in human breast cancer. *Oncotarget* 7, 19982–19996.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24, 78–90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998a). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Puigserver, P., Ribot, J., Serra, F., Gianotti, M., Bonet, M.L., Nadal-Ginard, B., and Palou, A. (1998b). Involvement of the retinoblastoma protein in brown and white adipocyte cell differentiation: functional and physical association with the adipogenic transcription factor C/EBPalpha. *Eur. J. Cell Biol.* 77, 117–123.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B.M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368–1371.
- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol. Cell* 8, 971–982.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423, 550–555.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2005). Alternative splicing facilitates internal ribosome entry on the ornithine decarboxylase mRNA. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 1267–1274.
- Quinn, B.J., Kitagawa, H., Memmott, R.M., Gills, J.J., and Dennis, P.A. (2013). Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 24, 469–480.
- Rajeeve, V., Pearce, W., Cascante, M., Vanhaesebroeck, B., and Cutillas, P.R. (2013). Polyamine production is downstream and upstream of oncogenic PI3K signalling and contributes to tumour cell growth. *Biochem. J.* 450, 619–628.
- Ramanathan, A., and Schreiber, S.L. (2009). Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22229–22232.

- Ramanathan, A., Wang, C., and Schreiber, S.L. (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5992–5997.
- Raney, A., Law, G.L., Mize, G.J., and Morris, D.R. (2002). Regulated translation termination at the upstream open reading frame in s-adenosylmethionine decarboxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* *277*, 5988–5994.
- Rao, A.R., Motiwala, H.G., and Karim, O.M.A. (2008). The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int.* *101*, 5–10.
- Rashid, A., Pizer, E.S., Moga, M., Milgraum, L.Z., Zahurak, M., Pasternack, G.R., Kuhajda, F.P., and Hamilton, S.R. (1997). Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am. J. Pathol.* *150*, 201–208.
- Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., and Thompson, C.B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7315–7328.
- Ravanko, K., Järvinen, K., Paasinen-Sohns, A., and Hölttä, E. (2000). Loss of p27Kip1 from cyclin E/cyclin-dependent kinase (CDK) 2 but not from cyclin D1/CDK4 complexes in cells transformed by polyamine biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* *60*, 5244–5253.
- Ray, R.M., Zimmerman, B.J., McCormack, S.A., Patel, T.B., and Johnson, L.R. (1999). Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* *276*, C684-691.
- Ray, R.M., Viar, M.J., Yuan, Q., and Johnson, L.R. (2000). Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *278*, C480-489.
- Ray, R.M., Bhattacharya, S., and Johnson, L.R. (2007). EGFR plays a pivotal role in the regulation of polyamine-dependent apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell. Signal.* *19*, 2519–2527.
- Raychaudhuri, B., and Cahill, D. (2008). Pelvic fasciae in urology. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* *90*, 633–637.
- Rebelo, A.P., Dillon, L.M., and Moraes, C.T. (2011). Mitochondrial DNA transcription regulation and nucleoid organization. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 941–951.
- Regenass, U., Mett, H., Stanek, J., Mueller, M., Kramer, D., and Porter, C.W. (1994). CGP 48664, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res.* *54*, 3210–3217.
- Reitzer, L.J., Wice, B.M., and Kennell, D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* *254*, 2669–2676.
- Remacle, C., Barbieri, M.R., Cardol, P., and Hamel, P.P. (2008). Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process. *Mol. Genet. Genomics* *280*, 93–110.
- Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J.C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2003). Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4012–4017.
- Rial, N.S., Meyskens, F.L., and Gerner, E.W. (2009). Polyamines as mediators of APC-dependent intestinal carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Essays Biochem.* *46*, 111–124.

- Ricciardi, M.R., Mirabilii, S., Allegretti, M., Licchetta, R., Calarco, A., Torrasi, M.R., Foà, R., Nicolai, R., Peluso, G., and Tafuri, A. (2015). Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional preclinical effects in leukemias. *Blood* 126, 1925–1929.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J., and Collins, A.T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J. Cell Sci.* 117, 3539–3545.
- Riker, A.I., Enkemann, S.A., Fodstad, O., Liu, S., Ren, S., Morris, C., Xi, Y., Howell, P., Metge, B., Samant, R.S., et al. (2008). The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *BMC Med. Genomics* 1, 13.
- Rivera, S., Azcón-Bieto, J., López-Soriano, F.J., Miralpeix, M., and Argilés, J.M. (1988). Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *Biochem. J.* 249, 443–449.
- Roberts, E., and Frankel, S. (1949). Free amino acids in normal and neoplastic tissues of mice as studied by paper chromatography. *Cancer Res.* 9, 645–648, 3 pl.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2009). Is Akt the “Warburg kinase”?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19, 25–31.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.
- Roehrborn, C.G. (2005). Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Rev. Urol.* 7 *Suppl* 9, S3–S14.
- Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Körbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E., et al. (2013). Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 23, 811–825.
- Rökman, A., Ikonen, T., Mononen, N., Autio, V., Matikainen, M.P., Koivisto, P.A., Tammela, T.L., Kallioniemi, O.P., and Schleutker, J. (2001). ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 6038–6041.
- Rolfe, D.F., and Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731–758.
- Ronai, Z. (2013). The masters talk: the PGC-1 α -MITF axis as a melanoma energizer. *Pigment Cell Melanoma Res.*
- Roos, S., Jansson, N., Palmberg, I., Säljö, K., Powell, T.L., and Jansson, T. (2007). Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J. Physiol.* 582, 449–459.
- Rossi, S., Graner, E., Febbo, P., Weinstein, L., Bhattacharya, N., Onody, T., Buble, G., Balk, S., and Loda, M. (2003). Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* 1, 707–715.
- Rossi, T., Coppi, A., Bruni, E., Ruberto, A., Giudice, S., and Baggio, G. (2008). Mepacrine antagonises tumour cell growth induced by natural polyamines. *Anticancer Res.* 28, 2765–2768.
- Rounbehler, R.J., Li, W., Hall, M.A., Yang, C., Fallahi, M., and Cleveland, J.L. (2009). Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer Res.* 69, 547–553.

- Roy, U.K.B., Rial, N.S., Kachel, K.L., and Gerner, E.W. (2008). Activated K-RAS increases polyamine uptake in human colon cancer cells through modulation of caveolar endocytosis. *Mol. Carcinog.* *47*, 538–553.
- Rozet, F., Hennequin, C., Beauval, J.-B., Beuzeboc, P., Cormier, L., Fromont, G., Mongiat-Artus, P., Ouzzane, A., Ploussard, G., Azria, D., et al. (2016). [CCAFU french national guidelines 2016-2018 on prostate cancer]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *27 Suppl 1*, S95–S143.
- Rusiecki, J.A., Patel, R., Koutros, S., Beane-Freeman, L., Landgren, O., Bonner, M.R., Coble, J., Lubin, J., Blair, A., Hoppin, J.A., et al. (2009). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. *Environ. Health Perspect.* *117*, 581–586.
- Russell, D., and Snyder, S.H. (1968). Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *60*, 1420–1427.
- Russell, L.K., Mansfield, C.M., Lehman, J.J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., Valencik, M.L., McDonald, J.A., and Kelly, D.P. (2004). Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ. Res.* *94*, 525–533.
- Ryan, S., Jenkins, M.A., and Win, A.K. (2014). Risk of prostate cancer in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *23*, 437–449.
- Rybak, A.P., Bristow, R.G., and Kapoor, A. (2015). Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget* *6*, 1900–1919.
- Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P.P., Waltregny, D., Daniëls, V.W., Machiels, J., et al. (2010). De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* *70*, 8117–8126.
- Sadeghi, R.N., Karami-Tehrani, F., and Salami, S. (2015). Targeting prostate cancer cell metabolism: impact of hexokinase and CPT-1 enzymes. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 2893–2905.
- Safdar, A., Little, J.P., Stokl, A.J., Hettinga, B.P., Akhtar, M., and Tarnopolsky, M.A. (2011). Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J. Biol. Chem.* *286*, 10605–10617.
- Salomon, L., Bastide, C., Beuzeboc, P., Cormier, L., Fromont, G., Hennequin, C., Mongiat-Artus, P., Peyromaure, M., Ploussard, G., Renard-Penna, R., et al. (2013). [CCAFU Recommendations 2013: Prostate cancer]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *23 Suppl 2*, S69-101.
- Samal, K., Zhao, P., Kendzicky, A., Yco, L.P., McClung, H., Gerner, E., Burns, M., Bachmann, A.S., and Sholler, G. (2013). AMXT-1501, a novel polyamine transport inhibitor, synergizes with DFMO in inhibiting neuroblastoma cell proliferation by targeting both ornithine decarboxylase and polyamine transport. *Int. J. Cancer* *133*, 1323–1333.

- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Graña, O., et al. (2015). MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* 22, 590–605.
- Sandhu, J., and Tu, H.Y.V. (2017). Recent advances in managing chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *F1000Research* 6.
- Sarkar, T., Petrov, A.S., Vitko, J.R., Santai, C.T., Harvey, S.C., Mukerji, I., and Hud, N.V. (2009). Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 667–675.
- Sauer, L.A., Stayman, J.W., and Dauchy, R.T. (1982). Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. *Cancer Res.* 42, 4090–4097.
- Saulnier Sholler, G.L., Gerner, E.W., Bergendahl, G., MacArthur, R.B., VanderWerff, A., Ashikaga, T., Bond, J.P., Ferguson, W., Roberts, W., Wada, R.K., et al. (2015). A Phase I Trial of DFMO Targeting Polyamine Addiction in Patients with Relapsed/Refractory Neuroblastoma. *PloS One* 10, e0127246.
- Sauvanet, C., Arnauné-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P., and Rojo, M. (2010a). [Mitochondrial morphology and dynamics: actors, mechanisms and functions]. *Med. Sci.* MS 26, 823–829.
- Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P., and Rojo, M. (2010b). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 558–565.
- Savarin, P., Barbet, A., Delga, S., Joshi, V., Hamon, L., Lefevre, J., Nakib, S., De Bandt, J.-P., Moinard, C., Curmi, P.A., et al. (2010). A central role for polyamines in microtubule assembly in cells. *Biochem. J.* 430, 151–159.
- Scarpulla, R.C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 1–14.
- Scarpulla, R.C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 97, 673–683.
- Scarpulla, R.C. (2008a). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 321–334.
- Scarpulla, R.C. (2008b). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88, 611–638.
- Schieke, S.M., Phillips, D., McCoy, J.P., Aponte, A.M., Shen, R.-F., Balaban, R.S., and Finkel, T. (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* 281, 27643–27652.
- Schipper, R.G., Penning, L.C., and Verhofstad, A.A. (2000). Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin. Cancer Biol.* 10, 55–68.
- Schlaepfer, I.R., Rider, L., Rodrigues, L.U., Gijón, M.A., Pac, C.T., Romero, L., Cimic, A., Sirintrapun, S.J., Glodé, L.M., Eckel, R.H., et al. (2014). Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* 13, 2361–2371.
- Schlaepfer, I.R., Glodé, L.M., Hitz, C.A., Pac, C.T., Boyle, K.E., Maroni, P., Deep, G., Agarwal, R., Lucia, S.M., Cramer, S.D., et al. (2015). Inhibition of Lipid Oxidation Increases Glucose Metabolism and

Enhances 2-Deoxy-2-[(18)F]Fluoro-D-Glucose Uptake in Prostate Cancer Mouse Xenografts. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* *17*, 529–538.

Schleyer, M., Schmidt, B., and Neupert, W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.* *125*, 109–116.

Schöder, H., and Larson, S.M. (2004). Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer. *Semin. Nucl. Med.* *34*, 274–292.

Schoeb, D.S., Schlager, D., Boeker, M., Wetterauer, U., Schoenthaler, M., Herrmann, T.R.W., and Miernik, A. (2017). Surgical therapy of prostatitis: a systematic review. *World J. Urol.* *35*, 1659–1668.

Schrecengost, R., and Knudsen, K.E. (2013). Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin. Oncol.* *40*, 244–258.

Schreiber, R.C., Boeshore, K.L., Laube, G., Veh, R.W., and Zigmond, R.E. (2004a). Polyamines increase in sympathetic neurons and non-neuronal cells after axotomy and enhance neurite outgrowth in nerve growth factor-primed PC12 cells. *Neuroscience* *128*, 741–749.

Schreiber, S.N., Knutti, D., Brogli, K., Uhlmann, T., and Kralli, A. (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.* *278*, 9013–9018.

Schreiber, S.N., Emter, R., Hock, M.B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E.J., and Kralli, A. (2004b). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6472–6477.

Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L.J., Zappa, M., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Määttänen, L., Lilja, H., et al. (2014). Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet Lond. Engl.* *384*, 2027–2035.

Schuber, F. (1989). Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.* *260*, 1–10.

Secrist, J.A., Montgomery, J.A., Shealy, Y.F., O'Dell, C.A., and Clayton, S.J. (1987). Resolution of racemic carbocyclic analogues of purine nucleosides through the action of adenosine deaminase. Antiviral activity of the carbocyclic 2'-deoxyguanosine enantiomers. *J. Med. Chem.* *30*, 746–749.

Sedoris, K.C., Thomas, S.D., and Miller, D.M. (2010). Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer* *10*, 157.

Seidenfeld, J., and Komar, K.A. (1985). Chemosensitization of cultured human carcinoma cells to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by difluoromethylornithine-induced polyamine depletion. *Cancer Res.* *45*, 2132–2138.

Seidenfeld, J., Samson, D.J., Hasselblad, V., Aronson, N., Albertsen, P.C., Bennett, C.L., and Wilt, T.J. (2000). Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* *132*, 566–577.

Seiler, N. (2004). Catabolism of polyamines. *Amino Acids* *26*, 217–233.

Seiler, N., and Raul, F. (2007). Polyamines and the intestinal tract. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *44*, 365–411.

Seiler, N., Delcros, J.G., and Moulinoux, J.P. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *28*, 843–861.

- Seisen, T., Rouprêt, M., Faix, A., and Droupy, S. (2012). [The prostate gland: a crossroad between the urinary and the seminal tracts]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* *22 Suppl 1*, S2-6.
- Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* *7*, 77–85.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 721–732.
- Semenza, G.L. (2010a). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* *29*, 625–634.
- Semenza, G.L. (2010b). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 51–56.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., and Wang, G.L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* *269*, 23757–23763.
- Seppälä, E.H., Ikonen, T., Autio, V., Rökman, A., Mononen, N., Matikainen, M.P., Tammela, T.L.J., and Schleutker, J. (2003). Germ-line alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 5252–5256.
- Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 563–575.
- Shantz, L.M., and Levin, V.A. (2007). Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino Acids* *33*, 213–223.
- Shen, G., Deng, H., Hu, S., and Jia, Z. (2014). Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Skeletal Radiol.* *43*, 1503–1513.
- Sherwood, E.R., Berg, L.A., Mitchell, N.J., McNeal, J.E., Kozlowski, J.M., and Lee, C. (1990). Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J. Urol.* *143*, 167–171.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6658–6663.
- Shimogori, T., Suzuki, T., Kashiwagi, K., Kakinuma, Y., and Igarashi, K. (1996a). Enhancement of helicase activity and increase of eIF-4E phosphorylation in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *222*, 748–752.
- Shimogori, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (1996b). Spermidine regulation of protein synthesis at the level of initiation complex formation of Met-tRNA_i, mRNA and ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *223*, 544–548.
- Shin, S.-W., Yun, S.-H., Park, E.-S., Jeong, J.-S., Kwak, J.-Y., and Park, J.-I. (2015). Overexpression of PGC-1 α enhances cell proliferation and tumorigenesis of HEK293 cells through the upregulation of Sp1 and Acyl-CoA binding protein. *Int. J. Oncol.* *46*, 1328–1342.
- Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T., Fujimoto, N., Seki, N., and Naito, S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α

interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **24**, 114–127.

Shou, Y., Martelli, M.L., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L.A., Roschke, A., Dewald, G., Kirsch, I.R., Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2000). Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 228–233.

Shukla-Dave, A., Castillo-Martin, M., Chen, M., Lobo, J., Gladoun, N., Collazo-Lorduy, A., Khan, F.M., Ponomarev, V., Yi, Z., Zhang, W., et al. (2016). Ornithine Decarboxylase Is Sufficient for Prostate Tumorigenesis via Androgen Receptor Signaling. *Am. J. Pathol.* **186**, 3131–3145.

Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., Yang, A., Montironi, R., McKeon, F., and Loda, M. (2000). p63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development. *Am. J. Pathol.* **157**, 1769–1775.

Simoneau, A.R., Gerner, E.W., Nagle, R., Ziogas, A., Fujikawa-Brooks, S., Yerushalmi, H., Ahlering, T.E., Lieberman, R., McLaren, C.E., Anton-Culver, H., et al. (2008). The effect of difluoromethylornithine on decreasing prostate size and polyamines in men: results of a year-long phase IIb randomized placebo-controlled chemoprevention trial. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **17**, 292–299.

Sinibaldi, F., Howes, B.D., Piro, M.C., Polticelli, F., Bombelli, C., Ferri, T., Coletta, M., Smulevich, G., and Santucci, R. (2010). Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 689–700.

Siu, L.L., Rowinsky, E.K., Hammond, L.A., Weiss, G.R., Hidalgo, M., Clark, G.M., Moczygemba, J., Choi, L., Linnartz, R., Barbet, N.C., et al. (2002). A phase I and pharmacokinetic study of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, administered on a daily-times-five every-three-week schedule in patients with Advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 2157–2166.

Slaga, T.J. (1984). Multistage skin carcinogenesis: a useful model for the study of the chemoprevention of cancer. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* **55 Suppl 2**, 107–124.

Slotkin, T.A., and Bartolome, J. (1986). Role of ornithine decarboxylase and the polyamines in nervous system development: a review. *Brain Res. Bull.* **17**, 307–320.

Soulet, D., and Rivest, S. (2003). Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J. Cell Biol.* **162**, 257–268.

Soulet, D., Gagnon, B., Rivest, S., Audette, M., and Poulin, R. (2004). A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 49355–49366.

Spiegelman, B.M., and Heinrich, R. (2004). Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* **119**, 157–167.

Staerman, F., Peyromaure, M., Irani, J., Gaschignard, N., Mottet, N., Soulié, M., Salomon, L., and CCAFU (2011). [Active surveillance for localized prostate cancer]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* **21**, 448–454.

Stanfield, P.R., and Sutcliffe, M.J. (2003). Spermine is fit to block inward rectifier (Kir) channels. *J. Gen. Physiol.* **122**, 481–484.

- ter Steege, J.C., Buurman, W.A., and Forget, P.P. (1997). Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *25*, 332–340.
- Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* *89*, 1025–1078.
- Stobbe, M.D., Houten, S.M., van Kampen, A.H.C., Wanders, R.J.A., and Moerland, P.D. (2012). Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 3625–3636.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., et al. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* *127*, 397–408.
- Sun, J., Hsu, F.-C., Turner, A.R., Zheng, S.L., Chang, B.-L., Liu, W., Isaacs, W.B., and Xu, J. (2006). Meta-analysis of association of rare mutations and common sequence variants in the MSR1 gene and prostate cancer risk. *The Prostate* *66*, 728–737.
- Suwa, M., Nakano, H., and Kumagai, S. (2003). Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *95*, 960–968.
- Sweeney, C.J., Chen, Y.-H., Carducci, M., Liu, G., Jarrard, D.F., Eisenberger, M., Wong, Y.-N., Hahn, N., Kohli, M., Cooney, M.M., et al. (2015). Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* *373*, 737–746.
- Swinnen, J.V., Vanderhoydonc, F., Elgamal, A.A., Eelen, M., Vercaeren, I., Joniau, S., Van Poppel, H., Baert, L., Goossens, K., Heyns, W., et al. (2000). Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int. J. Cancer* *88*, 176–179.
- Swinnen, J.V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., and Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int. J. Cancer* *98*, 19–22.
- Swinnen, J.V., Brusselmans, K., and Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *9*, 358–365.
- Szabadkai, G., Simoni, A.M., and Rizzuto, R. (2003). Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *278*, 15153–15161.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* *54*, 101–127.
- Tabib, A., and Bachrach, U. (1994). Activation of the proto-oncogene c-myc and c-fos by c-ras: involvement of polyamines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *202*, 720–727.
- Taguchi, A., Delgado, O., Celiktaş, M., Katayama, H., Wang, H., Gazdar, A.F., and Hanash, S.M. (2014). Proteomic signatures associated with p53 mutational status in lung adenocarcinoma. *Proteomics* *14*, 2750–2759.
- Takao, K., Shibata, S., Ozawa, T., Wada, M., Sugitani, Y., Samejima, K., and Shirahata, A. (2009). A conceptual model of the polyamine binding site of N1-acetyl polyamine oxidase developed from a study of polyamine derivatives. *Amino Acids* *37*, 401–405.
- Takeuchi, J., Chen, H., Hoyt, M.A., and Coffino, P. (2008). Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* *410*, 401–407.

- Tamada, T., Sone, T., Jo, Y., Yamamoto, A., Yamashita, T., Egashira, N., Imai, S., and Fukunaga, M. (2008). Prostate cancer: relationships between postbiopsy hemorrhage and tumor detectability at MR diagnosis. *Radiology* 248, 531–539.
- Tan, A.S., Baty, J.W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., et al. (2015). Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* 21, 81–94.
- Tang, H., Ariki, K., Ohkido, M., Murakami, Y., Matsufuji, S., Li, Z., and Yamamura, K. (2009). Role of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in vivo. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 14, 79–87.
- Tang, X., Kim, A.L., Feith, D.J., Pegg, A.E., Russo, J., Zhang, H., Aszterbaum, M., Kopelovich, L., Epstein, E.H., Bickers, D.R., et al. (2004). Ornithine decarboxylase is a target for chemoprevention of basal and squamous cell carcinomas in Ptch1+/- mice. *J. Clin. Invest.* 113, 867–875.
- Tannock, I.F., de Wit, R., Berry, W.R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K.N., Oudard, S., Théodore, C., James, N.D., Turesson, I., et al. (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 1502–1512.
- Taylor, R.A., Fraser, M., Livingstone, J., Espiritu, S.M.G., Thorne, H., Huang, V., Lo, W., Shiah, Y.-J., Yamaguchi, T.N., Sliwinski, A., et al. (2017). Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nat. Commun.* 8, 13671.
- Tcherepanova, I., Puigserver, P., Norris, J.D., Spiegelman, B.M., and McDonnell, D.P. (2000). Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J. Biol. Chem.* 275, 16302–16308.
- Tempero, M.A., Nishioka, K., Knott, K., and Zetterman, R.K. (1989). Chemoprevention of mouse colon tumors with difluoromethylornithine during and after carcinogen treatment. *Cancer Res.* 49, 5793–5797.
- Tennakoon, J.B., Shi, Y., Han, J.J., Tsouko, E., White, M.A., Burns, A.R., Zhang, A., Xia, X., Ilkayeva, O.R., Xin, L., et al. (2014). Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1 α -mediated metabolic switch. *Oncogene* 33, 5251–5261.
- Testa, C., Pultrone, C., Manners, D.N., Schiavina, R., and Lodi, R. (2016). Metabolic Imaging in Prostate Cancer: Where We Are. *Front. Oncol.* 6, 225.
- Teysier, C., Ma, H., Emter, R., Kralli, A., and Stallcup, M.R. (2005). Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation. *Genes Dev.* 19, 1466–1473.
- Thomas, T., and Thomas, T.J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 244–258.
- Thomas, T.J., and Thomas, T. (2018). Cellular and Animal Model Studies on the Growth Inhibitory Effects of Polyamine Analogues on Breast Cancer. *Med. Sci. Basel Switz.* 6.
- 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 \leq 4.0 ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* 350, 2239–2246.
- Tjabringa, G.S., Zandieh-Doulabi, B., Helder, M.N., Knippenberg, M., Wuisman, P.I.J.M., and Klein-Nulend, J. (2008). The polyamine spermine regulates osteogenic differentiation in adipose stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1710–1717.

- Torrano, V., Valcarcel-Jimenez, L., Cortazar, A.R., Liu, X., Urosevic, J., Castillo-Martin, M., Fernández-Ruiz, S., Morciano, G., Caro-Maldonado, A., Guiu, M., et al. (2016). The metabolic co-regulator PGC1 α suppresses prostate cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 18, 645–656.
- Trézéguet, V., Pélosi, L., Lauquin, G.J.M., and Brandolin, G. (2008). The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 435–443.
- Tryggvadóttir, L., Vidarsdóttir, L., Thorgeirsson, T., Jonasson, J.G., Olafsdóttir, E.J., Olafsdóttir, G.H., Rafnar, T., Thorlacius, S., Jonsson, E., Eyfjord, J.E., et al. (2007). Prostate cancer progression and survival in BRCA2 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 929–935.
- Tung, S., Shi, Y., Wong, K., Zhu, F., Gorczynski, R., Laister, R.C., Minden, M., Blechert, A.-K., Genzel, Y., Reichl, U., et al. (2013). PPAR α and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 122, 969–980.
- Turkbey, B., Shah, V.P., Pang, Y., Bernardo, M., Xu, S., Kruecker, J., Locklin, J., Baccala, A.A., Rastinehad, A.R., Merino, M.J., et al. (2011). Is apparent diffusion coefficient associated with clinical risk scores for prostate cancers that are visible on 3-T MR images? *Radiology* 258, 488–495.
- Turner, N., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., and Bruce, C.R. (2014). Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J. Endocrinol.* 220, T61-79.
- Twum-Ampofo, J., Fu, D.-X., Passaniti, A., Hussain, A., and Siddiqui, M.M. (2016). Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics. *Curr. Opin. Oncol.* 28, 241–247.
- Uemura, T., Yerushalmi, H.F., Tsapralis, G., Stringer, D.E., Pastorian, K.E., Hawel, L., Byus, C.V., and Gerner, E.W. (2008). Identification and characterization of a diamine exporter in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 26428–26435.
- Uemura, T., Stringer, D.E., Blohm-Mangone, K.A., and Gerner, E.W. (2010). Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G517-522.
- Uzzo, R.G., Leavis, P., Hatch, W., Gabai, V.L., Dulin, N., Zvartau, N., and Kolenko, V.M. (2002). Zinc inhibits nuclear factor-kappa B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 3579–3583.
- Vag, T., Heck, M.M., Beer, A.J., Souvatzoglou, M., Weirich, G., Holzapfel, K., Rummeny, E.J., Schwaiger, M., Krause, B.J., and Eiber, M. (2014). Preoperative lymph node staging in patients with primary prostate cancer: comparison and correlation of quantitative imaging parameters in diffusion-weighted imaging and 11C-choline PET/CT. *Eur. Radiol.* 24, 1821–1826.
- Vaidya, R.J., Ray, R.M., and Johnson, L.R. (2006). Akt-mediated GSK-3 β inhibition prevents migration of polyamine-depleted intestinal epithelial cells via Rac1. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 2871–2879.
- Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., and Monsalve, M. (2005). PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 66, 562–573.
- Van Maele-Fabry, G., and Willems, J.L. (2004). Prostate cancer among pesticide applicators: a meta-analysis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77, 559–570.

- Van Maele-Fabry, G., Libotte, V., Willems, J., and Lison, D. (2006). Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Causes Control* *17*, 353–373.
- Vander Heiden, M.G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 671–684.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist* *9 Suppl 5*, 10–17.
- Vazquez, F., Lim, J.-H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M., et al. (2013). PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* *23*, 287–301.
- Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1868–1876.
- Vellinga, T.T., Borovski, T., de Boer, V.C.J., Fatrai, S., van Schelven, S., Trumpi, K., Verheem, A., Snoeren, N., Emmink, B.L., Koster, J., et al. (2015). SIRT1/PGC1 α -Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 2870–2879.
- Velonas, V.M., Woo, H.H., dos Remedios, C.G., and Assinder, S.J. (2013). Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 11034–11060.
- Venneti, S., Dunphy, M.P., Zhang, H., Pitter, K.L., Zanzonico, P., Campos, C., Carlin, S.D., La Rocca, G., Lyashchenko, S., Ploessl, K., et al. (2015). Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. *Sci. Transl. Med.* *7*, 274ra17.
- Villena, J.A., Hock, M.B., Chang, W.Y., Barcas, J.E., Giguère, V., and Kralli, A. (2007). Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1418–1423.
- Villers, A., Steg, A., and Boccon-Gibod, L. (1991). Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur. Urol.* *20*, 261–268.
- Virbasius, J.V., and Scarpulla, R.C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 1309–1313.
- Vyas, S., Zaganjor, E., and Haigis, M.C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell* *166*, 555–566.
- Wagner, O.I., Lifshitz, J., Janmey, P.A., Linden, M., McIntosh, T.K., and Leterrier, J.-F. (2003). Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9046–9058.
- Walker, J.E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 1–16.
- Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 685–698.

- Wallace, H.M., Fraser, A.V., and Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* *376*, 1–14.
- Wallberg, A.E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B.M., and Roeder, R.G. (2003). Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol. Cell* *12*, 1137–1149.
- Wallström, E.L., Wendt, A., Holmgren, J., and Persson, L. (1998). Feedback regulation of ornithine decarboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* *26*, S373.
- Walsh, P.C., and Donker, P.J. (2017). Impotence Following Radical Prostatectomy: Insight into Etiology and Prevention. *J. Urol.* *197*, S165–S170.
- Wang, J.-Y. (2005). Polyamines regulate expression of E-cadherin and play an important role in control of intestinal epithelial barrier function. *Inflammopharmacology* *13*, 91–101.
- Wang, J.-Y. (2007). Polyamines and mRNA stability in regulation of intestinal mucosal growth. *Amino Acids* *33*, 241–252.
- Wang, W., and Guan, K.-L. (2009). AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* *196*, 55–63.
- Wang, Y., and Casero, R.A. (2006). Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? *J. Biochem. (Tokyo)* *139*, 17–25.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5510–5514.
- Wang, K., Ruan, H., Xu, T., Liu, L., Liu, D., Yang, H., Zhang, X., and Chen, K. (2018). Recent advances on the progressive mechanism and therapy in castration-resistant prostate cancer. *OncoTargets Ther.* *11*, 3167–3178.
- Wang, L., McDonnell, S.K., Elkins, D.A., Slager, S.L., Christensen, E., Marks, A.F., Cunningham, J.M., Peterson, B.J., Jacobsen, S.J., Cerhan, J.R., et al. (2001a). Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer. *Cancer Res.* *61*, 6494–6499.
- Wang, Q., Hardie, R.-A., Hoy, A.J., van Geldermalsen, M., Gao, D., Fazli, L., Sadowski, M.C., Balaban, S., Schreuder, M., Nagarajah, R., et al. (2015). Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J. Pathol.* *236*, 278–289.
- Wang, R., Dillon, C.P., Shi, L.Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., et al. (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* *35*, 871–882.
- Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., and Cunha, G. (2001b). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differ. Res. Biol. Divers.* *68*, 270–279.
- Wang, Y., Hacker, A., Murray-Stewart, T., Frydman, B., Valasinas, A., Fraser, A.V., Woster, P.M., and Casero, R.A. (2005). Properties of recombinant human N1-acetylpolyamine oxidase (hPAO): potential role in determining drug sensitivity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *56*, 83–90.
- Wang, Y.-X., Lee, C.-H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* *113*, 159–170.

- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.
- Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.
- Watmough, N.J., and Frerman, F.E. (2010). The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1910–1916.
- Weeks, C.E., Herrmann, A.L., Nelson, F.R., and Slaga, T.J. (1982). alpha-Difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits tumor promoter-induced polyamine accumulation and carcinogenesis in mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6028–6032.
- Wei, G., Hobbs, C.A., Defeo, K., Hayes, C.S., and Gilmour, S.K. (2007). Polyamine-mediated regulation of protein acetylation in murine skin and tumors. *Mol. Carcinog.* 46, 611–617.
- Wein, A.J., Kavoussi, L.R., Partin, A.W., and Peters, C.A. (2015). *Campbell-Walsh Urology E-Book* (Elsevier Health Sciences).
- Welch, H.G., Gorski, D.H., and Albertsen, P.C. (2015). Trends in Metastatic Breast and Prostate Cancer -Lessons in Cancer Dynamics. *N. Engl. J. Med.* 373, 1685–1687.
- Welch, J.E., Bengtson, P., Svensson, K., Wittrup, A., Jenniskens, G.J., Ten Dam, G.B., Van Kuppevelt, T.H., and Belting, M. (2008). Single chain fragment anti-heparan sulfate antibody targets the polyamine transport system and attenuates polyamine-dependent cell proliferation. *Int. J. Oncol.* 32, 749–756.
- Wende, A.R., Huss, J.M., Schaeffer, P.J., Giguère, V., and Kelly, D.P. (2005). PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10684–10694.
- Wende, A.R., Schaeffer, P.J., Parker, G.J., Zechner, C., Han, D.-H., Chen, M.M., Hancock, C.R., Lehman, J.J., Huss, J.M., McClain, D.A., et al. (2007). A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J. Biol. Chem.* 282, 36642–36651.
- Wieman, H.L., Wofford, J.A., and Rathmell, J.C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol. Biol. Cell* 18, 1437–1446.
- Williams-Ashman, H.G., and Schenone, A. (1972). Methyl glyoxal bis(guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 288–295.
- Wilt, T.J., Jones, K.M., Barry, M.J., Andriole, G.L., Culkin, D., Wheeler, T., Aronson, W.J., and Brawer, M.K. (2017). Follow-up of Prostatectomy versus Observation for Early Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 377, 132–142.
- Wingo, S.N., Gallardo, T.D., Akbay, E.A., Liang, M.-C., Contreras, C.M., Boren, T., Shimamura, T., Miller, D.S., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., et al. (2009). Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS One* 4, e5137.
- Wise, D.R., and Thompson, C.B. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 35, 427–433.

- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18782–18787.
- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E.S., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19611–19616.
- Wong, K.-K., Engelman, J.A., and Cantley, L.C. (2010). Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 87–90.
- Wong, M.C.S., Goggins, W.B., Wang, H.H.X., Fung, F.D.H., Leung, C., Wong, S.Y.S., Ng, C.F., and Sung, J.J.Y. (2016). Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *Eur. Urol.* *70*, 862–874.
- Wu, Y., and Woster, P.M. (1992). S-(5'-deoxy-5'-adenosyl)-1-ammonio-4-(methylsulfonio)-2-cyclopentene: A potent, enzyme-activated irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Med. Chem.* *35*, 3196–3201.
- Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2002a). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* *296*, 349–352.
- Wu, H., Min, J., Zeng, H., McCloskey, D.E., Ikeguchi, Y., Loppnau, P., Michael, A.J., Pegg, A.E., and Plotnikov, A.N. (2008). Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* *283*, 16135–16146.
- Wu, K., Spiegelman, D., Hou, T., Albanes, D., Allen, N.E., Berndt, S.I., van den Brandt, P.A., Giles, G.G., Giovannucci, E., Alexandra Goldbohm, R., et al. (2016). Associations between unprocessed red and processed meat, poultry, seafood and egg intake and the risk of prostate cancer: A pooled analysis of 15 prospective cohort studies. *Int. J. Cancer* *138*, 2368–2382.
- Wu, T., Ling, K.-Q., Sayre, L.M., and McIntire, W.S. (2005). Inhibition of murine N1-acetylated polyamine oxidase by an acetylenic amine and the allenic amine, MDL 72527. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *326*, 483–490.
- Wu, X., Daniels, G., Lee, P., and Monaco, M.E. (2014). Lipid metabolism in prostate cancer. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* *2*, 111–120.
- Wu, Y., Delerive, P., Chin, W.W., and Burris, T.P. (2002b). Requirement of helix 1 and the AF-2 domain of the thyroid hormone receptor for coactivation by PGC-1. *J. Biol. Chem.* *277*, 8898–8905.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* *98*, 115–124.
- Xia, X., Lemieux, M.E., Li, W., Carroll, J.S., Brown, M., Liu, X.S., and Kung, A.L. (2009). Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4260–4265.
- Xiang, Y., Wang, Z., Murakami, J., Plummer, S., Klein, E.A., Carpten, J.D., Trent, J.M., Isaacs, W.B., Casey, G., and Silverman, R.H. (2003). Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates. *Cancer Res.* *63*, 6795–6801.

- Xiang, Y., Stine, Z.E., Xia, J., Lu, Y., O'Connor, R.S., Altman, B.J., Hsieh, A.L., Gouw, A.M., Thomas, A.G., Gao, P., et al. (2015). Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *125*, 2293–2306.
- Xiao, L., Rao, J.N., Zou, T., Liu, L., Marasa, B.S., Chen, J., Turner, D.J., Zhou, H., Gorospe, M., and Wang, J.-Y. (2007a). Polyamines regulate the stability of activating transcription factor-2 mRNA through RNA-binding protein HuR in intestinal epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4579–4590.
- Xiao, L., Rao, J.N., Zou, T., Liu, L., Marasa, B.S., Chen, J., Turner, D.J., Passaniti, A., and Wang, J.-Y. (2007b). Induced JunD in intestinal epithelial cells represses CDK4 transcription through its proximal promoter region following polyamine depletion. *Biochem. J.* *403*, 573–581.
- Xu, R.-H., Pelicano, H., Zhang, H., Giles, F.J., Keating, M.J., and Huang, P. (2005). Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia* *19*, 2153–2158.
- Xue, Y., Smedts, F., Debruyne, F.M., de la Rosette, J.J., and Schalken, J.A. (1998). Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. *The Prostate* *34*, 292–301.
- Yan, D.-H., Nishimura, K., Yoshida, K., Nakahira, K., Ehara, T., Igarashi, K., and Ishihara, K. (2005). Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K(+) currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J. Physiol.* *563*, 713–724.
- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., et al. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* *1514*, 291–302.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* *2*, 305–316.
- Yang, L., Venneti, S., and Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *19*, 163–194.
- Yerlikaya, A., and Stanley, B.A. (2004). S-adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26 S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination. *J. Biol. Chem.* *279*, 12469–12478.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., et al. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* *413*, 131–138.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., and Shimada, H. (2006). Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* *1757*, 1110–1116.
- Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 657–663.
- Yu, D., Shi, X., Meng, G., Chen, J., Yan, C., Jiang, Y., Wei, J., and Ding, Y. (2015a). Kidney-type glutaminase (GLS1) is a biomarker for pathologic diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *6*, 7619–7631.

- Yu, W., Cao, D., Zhou, H., Hu, Y., and Guo, T. (2015b). PGC-1 α is responsible for survival of multiple myeloma cells under hyperglycemia and chemotherapy. *Oncol. Rep.* *33*, 2086–2092.
- Yuan, Q., Ray, R.M., Viar, M.J., and Johnson, L.R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *280*, G130-138.
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* *178*, 93–105.
- Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., et al. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* *15*, 157–170.
- Zabala-Letona, A., Arruabarrena-Aristorena, A., Martín-Martín, N., Fernandez-Ruiz, S., Sutherland, J.D., Clasquin, M., Tomas-Cortazar, J., Jimenez, J., Torres, I., Quang, P., et al. (2017). mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. *Nature* *547*, 109–113.
- Zadra, G., Photopoulos, C., and Loda, M. (2013). The fat side of prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 1518–1532.
- Zaidi, N., Royaux, I., Swinnen, J.V., and Smans, K. (2012). ATP citrate lyase knockdown induces growth arrest and apoptosis through different cell- and environment-dependent mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1925–1935.
- Zamora, M., and Villena, J.A. (2014). Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 5527–5557.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssière, J.L., Petit, P.X., and Kroemer, G. (1995a). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* *181*, 1661–1672.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995b). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* *182*, 367–377.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gómez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* *183*, 1533–1544.
- Zaorsky, N.G., Doyle, L.A., Yamoah, K., Andrel, J.A., Trabulsi, E.J., Hurwitz, M.D., Dicker, A.P., and Den, R.B. (2014). High dose rate brachytherapy boost for prostate cancer: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* *40*, 414–425.
- Zha, S., Ferdinandusse, S., Hicks, J.L., Denis, S., Dunn, T.A., Wanders, R.J., Luo, J., De Marzo, A.M., and Isaacs, W.B. (2005). Peroxisomal branched chain fatty acid beta-oxidation pathway is upregulated in prostate cancer. *The Prostate* *63*, 316–323.
- Zhang, G., Frederick, D.T., Wu, L., Wei, Z., Krepler, C., Srinivasan, S., Chae, Y.C., Xu, X., Choi, H., Dimwamwa, E., et al. (2016). Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J. Clin. Invest.* *126*, 1834–1856.
- Zhang, M., Wang, H., and Tracey, K.J. (2000). Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit. Care Med.* *28*, N60-66.

- Zhang, Y., Ma, K., Song, S., Elam, M.B., Cook, G.A., and Park, E.A. (2004a). Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). *J. Biol. Chem.* *279*, 53963–53971.
- Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J., and Edwards, P.A. (2004b). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* *18*, 157–169.
- Zhang, Y., Ba, Y., Liu, C., Sun, G., Ding, L., Gao, S., Hao, J., Yu, Z., Zhang, J., Zen, K., et al. (2007). PGC-1alpha induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARgamma-dependent pathway. *Cell Res.* *17*, 363–373.
- Zhang, Y., Huypens, P., Adamson, A.W., Chang, J.S., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Burk, D., Klein, J., Perwitz, N., et al. (2009). Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.* *284*, 32813–32826.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V.V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E.N., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 21–30.
- Zhao, Y.-C., Chi, Y.-J., Yu, Y.-S., Liu, J.-L., Su, R.-W., Ma, X.-H., Shan, C.-H., and Yang, Z.-M. (2008). Polyamines are essential in embryo implantation: expression and function of polyamine-related genes in mouse uterus during peri-implantation period. *Endocrinology* *149*, 2325–2332.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* *60*, 1541–1545.
- Zhou, H., Choi, L., Lau, H., Bruntsch, U., Vries, E.E., Eckhardt, G., Oosterom, A.T., Verweij, J., Schran, H., Barbet, N., et al. (2000). Population pharmacokinetics/toxicodynamics (PK/TD) relationship of SAM486A in phase I studies in patients with advanced cancers. *J. Clin. Pharmacol.* *40*, 275–283.
- Zhou, W., Han, W.F., Landree, L.E., Thupari, J.N., Pinn, M.L., Bililign, T., Kim, E.K., Vadlamudi, A., Medghalchi, S.M., El Meskini, R., et al. (2007). Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* *67*, 2964–2971.
- Zöller, B., Li, X., Sundquist, J., and Sundquist, K. (2014). Familial transmission of prostate, breast and colorectal cancer in adoptees is related to cancer in biological but not in adoptive parents: a nationwide family study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* *50*, 2319–2327.
- Zou, T., Liu, L., Rao, J.N., Marasa, B.S., Chen, J., Xiao, L., Zhou, H., Gorospe, M., and Wang, J.-Y. (2008). Polyamines modulate the subcellular localization of RNA-binding protein HuR through AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1. *Biochem. J.* *409*, 389–398.
- Zoumas-Morse, C., Rock, C.L., Quintana, E.L., Neuhausser, M.L., Gerner, E.W., and Meyskens, F.L. (2007). Development of a polyamine database for assessing dietary intake. *J. Am. Diet. Assoc.* *107*, 1024–1027.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., et al. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* *14*, 391–396.