



**HAL**  
open science

# Hyperplasie bénigne de la prostate: de la caractérisation du modèle probasine-prolactine par analyse transcriptomique sur cellule unique à la thérapie antioxydante

Leïla dos Santos

## ► To cite this version:

Leïla dos Santos. Hyperplasie bénigne de la prostate: de la caractérisation du modèle probasine-prolactine par analyse transcriptomique sur cellule unique à la thérapie antioxydante. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5099 . tel-04916497

**HAL Id: tel-04916497**

**<https://theses.hal.science/tel-04916497v1>**

Submitted on 28 Jan 2025

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

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

**Université Paris Cité**

**École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)**

**Institut Necker-Enfants Malades (INSERM U1151 / CNRS UMRM8253)**

**Équipe : Physiopathologie des hormones PRL/GH : approches translationnelles**

# **Hyperplasie bénigne de la prostate : de la caractérisation du modèle probasine-prolactine par analyse transcriptomique sur cellule unique à la thérapie antioxydante**

**Leïla DOS SANTOS**

Thèse de doctorat de Physiologie et physiopathologie

Soutenue publiquement le 16 octobre 2023

Dirigée par Vincent GOFFIN, PhD

**Membres du jury :**

<b>Marie-Aimée PERROUIN-VERBE</b> , PUPH, Université de Nantes	Rapportrice
<b>Olivier CUVILLIER</b> , DR, Université de Toulouse	Rapporteur
<b>Mathilde SIBONY</b> , MCU-PH, Université Paris Cité	Examinatrice
<b>Jocelyn CERALINE</b> , MCU-PH, HDR, Université de Strasbourg	Examineur
<b>Morgan GALLAZZINI</b> , CR, HDR, Université Paris Cité	Examineur
<b>Vincent GOFFIN</b> , DR, Université Paris Cité	Directeur de thèse
<b>Olivier PETITJEAN</b> , Zion Pharma	Membre invité







## RESUMES

- **Hyperplasie bénigne de la prostate : de la caractérisation du modèle probasine-prolactine par analyse transcriptomique sur cellule unique à la thérapie antioxydante**

L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est une pathologie liée à l'âge. Elle affecte 50% des hommes de 50 ans et jusqu'à 90% des hommes à 80 ans. L'HBP se caractérise par une hypertrophie de la zone transitionnelle de la prostate, ce qui peut engendrer des symptômes du bas appareil urinaire (liés au rétrécissement du calibre de l'urètre prostatique) affectant la qualité de vie des patients.

L'HBP résulte d'une hyperplasie des compartiments cellulaires épithélial et/ou stromal, d'un fort tonus fibromusculaire et d'une inflammation prostatique. Son étiologie reste très mal comprise, et les traitements actuels, qu'il s'agisse des inhibiteurs de la 5 $\alpha$ -réductase (5-ARI, bloquant la signalisation androgénique *in situ*) ou des  $\alpha$ -bloquants (diminuant le tonus musculaire de la prostate), ne peuvent traiter efficacement tous les patients. En cas d'échec thérapeutique, un traitement chirurgical est indiqué. Ces traitements entraînant parfois des complications, il est donc primordial de mieux connaître l'étiologie de cette pathologie afin de proposer des alternatives thérapeutiques efficaces.

La corrélation entre les marqueurs de stress oxydant (sériques et *in situ*) et le volume prostatique est admise. C'est pourquoi le partenaire industriel de cette thèse CIFRE (Zion Pharma) a souhaité repositionner comme traitement de l'HBP une molécule antioxydante déjà utilisée en clinique pour d'autres pathologies : l'anethole tritione (ATT), qui réduit la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) mitochondriaux. Pour ce projet, j'ai utilisé un modèle animal d'HBP étudié de longue date dans mon laboratoire d'accueil : la souris transgénique Pb-PRL, qui exprime la prolactine (PRL) dans les cellules luminales sous contrôle du promoteur probasine. La prostate hyperplasique de ces souris présente des phénotypes histologiques rappelant ceux de la pathologie humaine, et se caractérise par l'amplification d'une population de progéniteurs luminaux résistants à la castration.

Mes objectifs de thèse ont donc été de caractériser la prostate des souris Pb-PRL par séquençage d'ARN sur cellules uniques (scRNAseq), et d'évaluer les effets cellulaires et moléculaires de l'ATT sur la prostate de ces souris, ainsi que sur des lignées cellulaires prostatiques humaines.

La caractérisation des différents compartiments cellulaires par scRNAseq nous a permis de mettre en évidence que l'épithélium prostatique des souris Pb-PRL présentait un appauvrissement en cellules luminales androgéno-dépendantes au profit de diverses populations cellulaires moins différenciées, intermédiaires entre les cellules basales et luminales. Ces cellules présentent des analogies avec les cellules Club/Hillock récemment identifiées dans la prostate humaine par scRNAseq, et dont le rôle dans l'étiologie de l'HBP et la résistance aux 5-ARI a été fortement suspecté. Nos analyses bio-informatiques suggèrent que ce remodelage épithélial résulte d'une plasticité cellulaire potentiellement orchestrée par la baisse de la signalisation androgénique et l'augmentation de la signalisation STAT5.

L'altération des paramètres urodynamiques des souris Pb-PRL, mise en évidence dans ce travail, s'accompagne également de la baisse d'expression prostatique des enzymes antioxydantes. Un mois de traitement par l'ATT a conduit à l'amélioration des paramètres urodynamiques des souris Pb-PRL, accompagnée par la réduction du poids de leurs prostates. L'ATT altère les capacités progénitrices des cellules épithéliales de ces souris, et diminue la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial des cellules prostatiques humaines BPH-1. Au niveau stromal, l'ATT diminue la proportion de myofibroblastes dans les prostates de Pb-PRL et améliore les capacités antioxydantes de la lignée myofibroblastique humaine WPMY-1.

En conclusion, ces résultats confirment la pertinence des souris Pb-PRL comme modèle préclinique de l'HBP, et suggèrent l'approche antioxydante comme une alternative potentielle aux thérapies actuelles de cette pathologie.

**Mots clefs :** HBP, stress oxydant, anethole tritone, souris Pb-PRL, BPH-1, WPMY-1, plasticité cellulaire, signalisation androgénique, Stat5.

- **Benign prostatic hyperplasia: from characterisation of the probasin-prolactin model by single-cell transcriptomic analysis to antioxidant therapy**

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is an age-related disease. It affects 50% of men over the age of 50, rising to 90% by the age of 80. BPH is characterised by hypertrophy of the transitional zone of the prostate, which can lead to lower urinary tract symptoms (linked to the narrowing of the diameter of the prostatic urethra) affecting the quality of life of patients.

BPH is characterised by hyperplasia of epithelial and/or stromal cell compartments, high fibromuscular tone, and inflammation of the gland. BPH etiology remains poorly understood. Current treatments including 5 $\alpha$ -reductase inhibitors (5-ARI) to block intraprostatic androgen signalling, and  $\alpha$ -blockers to reduce muscle tone, are not efficient in all BPH patients, or face exhaustion of effect after some years. Surgical interventions are ultimately proposed to patients in case of therapeutic failure. Medication and surgery can both lead to complications, therefore it is important to better understand the causes of this pathology in order to propose efficient therapeutic alternatives.

The correlation between prostate volume and oxidative stress hallmarks (in serum or within the prostate tissue) is approved. Based on this rationale, our CIFRE partner (Zion Pharma) proposed the repositioning of an antioxidant drug already used in the clinics for other pathologies, for the treatment of BPH: Anethole trititione (ATT), which reduces mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production. For this project, I used a mouse model of BPH long-studied in my host lab: the Pb-PRL transgenic mouse in which prolactin (PRL) expression in prostatic luminal cells is driven by the probasin promoter. The hypertrophic prostate of these mice exhibits histological phenotypes reminiscent of human BPH and is further characterized by the amplification of a population of castration-resistant luminal progenitor cells.

The aims of my PhD project were to characterise the hyperplastic prostates of Pb-PRL mice by single cell RNA sequencing (scRNAseq), and to evaluate the molecular and cellular effects of ATT treatment in the prostates of these mice as well as in human prostatic cell lines.

The characterisation of the different cell compartments of Pb-PRL mouse prostates using scRNAseq revealed that their epithelium is depleted in differentiated luminal cells to the benefit of less differentiated cells presenting an intermediate phenotype between luminal and basal cells. Some of these cell clusters are transcriptionally similar to Club/Hillock cells that were recently identified in the human prostate by scRNAseq. Strikingly, Club cells have been proposed to contribute to BPH etiology and resistance to 5-ARI treatment. Our bioinformatic analyses suggest that the epithelial remodelling of Pb-PRL mouse prostates may be orchestrated by the decrease in androgen signalling and the increase in STAT5 signalling.

The alteration of urodynamic parameters of Pb-PRL mice that was demonstrated in the course of this project paralleled the reduced expression of antioxidant stress enzymes in the prostate. Thirty-day ATT treatment of these mice had a beneficial therapeutic effect as it reduced the weight of their prostates, and more importantly, it improved the urodynamic parameters. ATT impaired the progenitor capacity of prostate epithelial cells isolated from Pb-PRL mice and reduced the proliferation and mitochondrial metabolism of the human epithelial cell line BPH-1. In the stromal compartment, ATT reduced the proportion of myofibroblasts in Pb-PRL mouse prostates and improved the antioxidant capacity of the human myofibroblastic cell line WPMY-1.

Taken together, these results support Pb-PRL mice as a relevant preclinical model of BPH and suggest antioxidative therapy as a potential alternative to current BPH treatments.

**Keys words:** BPH, oxidative stress, anethole trititione, Pb-PRL mouse model, BPH-1, WPMY-1, cell plasticity, androgen signalling, Stat5.

*A mi abuelita, para siempre...*



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes deux rapporteurs, Madame Marie-Aimée Perrouin-Verbe et Monsieur Olivier Cuvillier, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je suis d'ores et déjà impatiente d'avoir vos retours quant à ce manuscrit. Je suis également reconnaissante d'avoir la chance de profiter de vos expertises respectives qui enrichiront, j'en suis sûre, le manuscrit ainsi que nos échanges lors de ma soutenance.

Je voudrais également remercier mes examinateurs, Madame Mathilde Sibony, Messieurs Jocelyn Ceraline et Morgan Gallazzini, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à vous, Mme. Sibony d'avoir accepté d'évaluer mes recherches. Merci M. Ceraline d'avoir été curieux et bienveillant lors de mes présentations de poster aux différents congrès annuels de l'ATRP ; je vous suis reconnaissante d'avoir accepté également d'évaluer mon travail. Enfin, merci Morgan d'avoir été enthousiaste à l'idée de prendre place parmi mon jury. Je te suis reconnaissante pour tes conseils, ton aide et tes encouragements. Ils m'ont permis de faire mûrir mon projet et ma réflexion scientifiques. Je suis honorée de vous compter chacun parmi mon jury de thèse, c'est une chance de pouvoir être évaluée par des pairs de tous horizons scientifiques.

Merci Vincent, de m'avoir proposé de monter ce projet de thèse CIFRE à tes côtés. C'était un travail ambitieux qui s'annonçait alors et je te remercie pour la confiance que tu m'as témoignée en me le confiant. Durant ces quatre ans, j'ai pu apprendre lors de nos réunions en tête à tête, lors de nos labmeetings, avec nos collaborateurs, mais également en dehors, dans la vie de tous les jours, au sein de ton équipe qui m'a si bien accueillie, formée et avec qui j'ai pris plaisir à travailler. Je te remercie pour ta franchise, ton aide pour le papier et le manuscrit, ainsi que pour tes coachings sur la prise de parole en public lors de mes différentes préparations de topos. J'apporterai dans mes valises un peu de ton esprit de synthèse (mais pas trop, on ne se refait pas), et certaines de tes expressions belges qui m'ont fait sourire. Merci pour ces opportunités d'apprentissages, mais également de m'avoir permis de terminer cette thèse plus sereinement avec un prolongement d'un an.

Je tiens également à remercier l'entreprise Zion Pharma, son président M. Guillaume Petitjean, son directeur général M. Marc Childs, ainsi que son co-fondateur M. Olivier Petitjean de m'avoir fait confiance afin de valoriser par la recherche leur brevet de repositionnement de l'ATT ainsi que pour avoir financé par le biais d'un contrat CIFRE les trois premières années de ma thèse. Je tiens tout particulièrement à remercier M. Olivier Petitjean pour son enthousiasme lors de nos réunions. Je suis très heureuse de vous compter également parmi mon jury.

Je souhaite chaleureusement remercier mes deux parrains scientifiques, Jacques-Emmanuel Guidotti et Ahmed Hamäi. Merci d'avoir été deux épaules scientifiques et humaines sur lesquelles j'ai pu m'appuyer. Vous avez grandement contribué à ma culture scientifique ainsi qu'à la maturation de mes idées. J'ai adoré discuter avec vous, de mon projet, de science en général, et bien d'autres sujets. Ces quelques lignes ne permettront pas de vous témoigner ici toute ma gratitude et ma reconnaissance, mais je suis sûre que vous saurez lire au-delà de ces quelques mots. Mille fois merci.

Merci Nicolas, pour ton éclairage de spécialiste de l'HBP. Tes conseils et avis auront beaucoup apporté à ce projet et à mes différentes présentations. Merci pour tes commentaires sur ce manuscrit ainsi que tes nombreux encouragements tout au long de ma thèse.

Manon, Emeline, Emma, vous savez déjà tout et il resterait tellement à dire encore ! Qu'elles ont été folles ces quatre années passées ensemble ! Nous étions si différentes et pourtant ce fut le début d'une très belle aventure. Vous m'avez tant apportée durant ce long périple jonché de péripéties plus ou moins agréables. Vous m'avez fait rire, réconfortée, soutenue et parfois remotivée. J'ai aimé grouper nos expériences pour pouvoir profiter les unes des autres aussi bien techniquement que socialement parlant. Je retiens aussi nos psychanalyses du soir, nos tunnels de conversations, nos soirées jeux de société et nos petits restos. C'est tellement agréable d'avoir tous les jours des amies pour collègues ! Merci pour votre légèreté et votre soutien, ça aurait été franchement moins drôle sans vous.

Merci Florence, pour ta patience, pour ton écoute et soutien pendant ma formation souris et pas que. Tu as toujours été de bons conseils ! Déçue que tu sois partie si vite, mais chanceuse de t'avoir eu sur ma route !

Emilie, j'ai été ravie d'avoir l'opportunité de travailler avec toi. J'ai également beaucoup appris à tes côtés. Bonne chance pour la suite de tes études et le début de ta carrière, tu as toutes les ressources pour y arriver alors fonce. N'hésite pas à me donner de tes nouvelles de temps en temps.

Je tiens à remercier également à remercier nos médecins et co-thésards Dr<sup>2</sup> Charles Dariane et Dr Julien Anract. Merci à vous deux pour votre bonne humeur, et votre aide. Merci Charles d'être une personne si humaine et entière. Je te souhaite bonne chance pour le futur ! Bon courage Julien pour ta thèse, tiens-moi au courant de l'avancée de ton projet, je veux savoir ce qu'il advient de Stat5, chez l'homme ahah !!

Je remercie également le reste de l'équipe permanents ou de passage, Rima, Thierry et Natascha, Laura C, Laura GC, Robin, Emilie C, Romane, Olivier, Léa, Delphine et Charlotte... vous m'avez au moins tous appris quelque chose sur divers sujets, sur le monde, sur moi-même ou appris à le développer. Je ne peux ressortir du labo qu'enrichie et davantage sûre de moi. Anne Sophie et Clémence je suis très heureuse d'avoir pu rencontrer de jeunes femmes si pétillantes et talentueuses. Vous êtes la relève et vous nous rendez déjà fiers ! Même si je ne me fais aucun souci pour vous, je vous souhaite bonne chance pour vos thèses !

Je souhaiterai également remercier les membres des équipes Sermet, Ezine et Venteclefs et plus particulièrement Elise, Danielle, Agathe, Emmanuel, Mairied, Aude, Elena et Amélie pour avoir participé à donner à notre étage cette ambiance joyeuse, qui va me manquer.

Merci aussi à toi Amandine. J'ai beaucoup pleuré de rire en ta présence qui m'a fait un bien fou. Ton amour de la science, ton humour et ta combativité m'ont beaucoup appris. Je suis très chanceuse de te connaître, et tellement contente pour tes futurs projets, c'est si inspirant ! Vie tes rêves et envoie moi des photos de ton chat et toi aux States !

Merci aux autres membres de l'INEM appartenant aux différentes plateformes, et plus particulièrement à Corinne et Jérôme de la plateforme de Cytométrie, Yan et Dan de l'animalerie ainsi que Nicolas G de la plateforme d'analyse d'image pour leur aide et leur soutien. Un grand merci aussi à Céline, Lili et Benoit, Jamel, Paul-Olivier, Léa, Josiane de l'administration, de la réception et de la laverie.

Comment aurais-je pu arriver ici sans le soutien sans faille de mes proches. Je remercie par ces quelques lignes ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue dans tous mes projets et particulièrement celui-ci. Merci à mes amis de m'avoir offert ces échappées hors du temps, j'apprécie chacune d'entre elles. Merci de vous être intéressés à ce projet, de m'avoir encouragée ainsi que d'avoir pris de mes nouvelles pendant les moments de rush. Merci à ma grande famille dont je ne peux citer ici tous les membres. Merci d'avoir toujours crus en moi, notre amour et notre cohésion m'ont toujours beaucoup donné de forces. Merci à mes parents qui m'ont élevée avec amour et empathie envers moi-même mais aussi le reste du vivant. C'est auprès de vous que j'ai posé mes premières questions scientifiques ! Cette thèse est aussi la vôtre, alors merci. Merci à mon petit frère, Jaime d'être un pilier, un juge parfois, un allier toujours. Merci pour tes conseils déguisés en punchlines qui m'ont permis d'avoir quelques déclics.

Federico, merci de m'avoir soutenue tout au long de ma thèse, de croire en moi et de me donner les ressources pour aller plus loin encore. Merci d'avoir entièrement organisé nos vacances, pour que je puisse déconnecter de temps en temps afin de mieux revenir. Il me tarde d'être réunis et de commencer un nouveau chapitre ensemble.

Sur une note humoristique je tiens également à saluer les auteurs de l'application Petit BamBou pour ce formidable outil de gestion du stress. Au terme de ces quatre années de thèse, j'ai pratiquement réalisé tous les programmes. Enfin, comment ne pas terminer ces remerciements sans citer Jean d'Ormesson qui se prête si bien au travail de recherche et à la thèse : « Merci pour les roses merci pour les épines ».

# TABLE DES MATIERES

Résumés .....	4
Remerciements .....	10
Liste des tableaux.....	16
Liste des illustrations.....	17
Liste des Abréviations.....	18
Introduction .....	20
I. La prostate.....	20
A. Anatomie, physiologie et histologie de la prostate.....	20
B. L'apport des études sur cellules uniques .....	25
C. Développement embryonnaire de la prostate .....	30
D. Signalisation androgénique dans la prostate adulte .....	35
E. Cellules épithéliales progénitrices prostatiques adultes .....	39
II. Les pathologies de la prostate humaine .....	47
A. Les pathologies bénignes .....	47
B. Le cancer de la prostate .....	50
III. L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) .....	53
A. Epidémiologie, symptômes et diagnostic de l'HBP .....	53
B. Facteurs de risque et comorbidités de l'HBP .....	56
C. Physiopathologie de l'HBP .....	59
D. Les traitements actuels de l'HBP.....	65
IV. Le stress oxydant dans l'HBP .....	71
A. Stress oxydant et ses acteurs .....	71

B.	Le stress oxydant et la signalisation cellulaire.....	78
C.	Stress oxydant et HBP .....	81
D.	Anethole trithione (ATT) ET intérêt pour l’HBP.....	84
V.	Les modèles animaux de l’HBP .....	87
A.	Les souris âgées .....	87
B.	Modèles inductibles.....	88
C.	Modèles de xénogreffes.....	91
D.	Modèles associés au syndrome métabolique .....	92
E.	Modèles d’obstruction mécanique .....	93
F.	Modèles transgéniques.....	94
VI.	Les modèles cellulaires de l’HBP.....	99
A.	Lignées cellulaires prostatique humaines .....	99
B.	Les cultures primaires .....	101
	Objectifs des travaux de thèse .....	104
	Résultats.....	105
I.	Manuscrit .....	106
A.	Résumé graphique .....	106
B.	Article scientifique .....	107
II.	Résultats complémentaires .....	186
A.	Matériels et méthodes.....	186
B.	Résultats .....	188
	Discussion.....	192
I.	La souris Pb-PRL, un modèle pertinent d’HBP .....	192
A.	signal androgénique et plasticité cellulaire dans l’HBP .....	192

B. La voie de signalisation PRL/STAT5 dans l'HBP .....	195
C. implication des cellules luminales progénitrices dans l'HBP .....	198
D. Interactions paracrines dans l'HBP.....	200
II. Stratégie thérapeutique antioxydante pour l'HBP .....	203
A. Effets symptomatiques de l'ATT sur la souris Pb-PRL.....	203
B. Effets de l'ATT sur les différents compartiments cellulaires.....	204
Conclusion générale .....	208
Perspectives .....	209
Le mot de la fin.....	212
Annexes.....	213
I. Article & Revues scientifiques .....	213
II. Intervention à des congrès et journées scientifiques .....	213
Bibliographie .....	214

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Principaux oxydants endogènes .....</i>	<i>72</i>
<i>Tableau 2 : Localisation des NOXs dans l'organisme .....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 3 : Localisations des principales GPx de l'organisme.....</i>	<i>76</i>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Le tractus génital masculin .....	20
Figure 2: Anatomie schématique de la prostate humaine .....	21
Figure 3: Histologie schématique d'une glande prostatique humaine.....	22
Figure 4: Anatomie comparées des prostates humaine et murine .....	24
Figure 5: Expression différentielle des marqueurs luminaux des lobes prostatiques de souris.....	26
Figure 6: Hétérogénéité cellulaire épithéliale et stromale de la prostate humaine.....	28
Figure 7: Les phases du développement embryonnaire des prostates humaines et murines .....	30
Figure 8: Testostéronémie chez le rat la souris et l'homme au cours de la vie .....	34
Figure 9: Axe hypothalamo-hypophysaire .....	35
Figure 10: Structure du gène et de la protéine AR .....	36
Figure 11 : Quantification de l'amplification des cellules $LSC^{med}$ après castration.....	41
Figure 12: Enrichissement de la signature $LSC^{med}$ au sein des cellules « $LSC^{med}$ -like » .....	42
Figure 13 : Planche d'évaluation du score de Gleason.....	51
Figure 14: Prévalence de l'HBP histologique par groupe d'âge.....	53
Figure 15: Coupes transversales de prostate humaines non hyperplasique et d'HBP.....	54
Figure 16: Les différents types d'HBP chez l'homme.....	59
Figure 17 : Chaîne respiratoire mitochondriale et sites préférentiels d'échappement d'électrons.....	74
Figure 18 : La diversité de modulation de la signalisation cellulaire par le stress oxydant.....	79
Figure 19 : Augmentation du stress oxydant dans les prostates de patients atteints d'HBP.....	81
Figure 20: Structure chimique de l'anéthole tritione.....	84
Figure 21: Système sexuel de souris Int-2.....	95
Figure 22: Morphologie des BPH-1.....	99
Figure 23: Morphologie des WPMY-1 .....	100
Figure 24: Organoïdes issus de cellules basales de souris.....	102
Figure 25: Evaluation de l'effet de l'ATT sur les lignées BPH-1 et WPMY-1 .....	189
Figure 26: Concentration des ROS dans les cellules prostatiques des souris WT et Pb-PRL.....	191
Figure 27: Expression des gènes activés et réprimés par AR dans les prostates de souris.....	194

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>5ARI</b>	Inhibiteur de 5 $\alpha$ -reductase	<b>DCN</b>	Décorine
<b>8oxoG</b>	8-Oxo-Guanine	<b>DHT</b>	Dihydrotestostérone
<b>ALDH1A3</b>	Aldehyde déhydrogénase 1A3	<b>DLL1</b>	Delta like canonical notch ligand 1
<b>Aqp3</b>	Aquaporine 3	<b>E(n)</b>	Nème jour post-coïtal
<b>AR</b>	Androgen receptor	<b>ECM</b>	Extracellular matrice
<b>ARE</b>	Androgen Responsive Element	<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>Areg</b>	Amphiregulin	<b>FGFR2</b>	Fibroblast growth factor receptor 2
<b>AREs</b>	Androgen responsive Elements	<b>FGFs</b>	Fibroblast growth factor
<b>ATT</b>	Anethole tritone	<b>FOXA1</b>	Forkhead box A1
<b>ATX</b>	4-Hydroxy-anethole tritone	<b>Foxi1</b>	Forkhead box1
<b>BIM-1</b>	Proto-Oncogene Polycom RING finger	<b>FOXO</b>	Forkhead box
<b>BMPs</b>	Bone morphogenic proteins	<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>BPH-1</b>	Benign prostatic hyperplasia-1	<b>GATAs</b>	GATA binding protein
<b>C3</b>	Complement 3	<b>GnrH/LHRH</b>	Gonadotropin releasing hormone
<b>C7</b>	Complement 7	<b>GPxs</b>	Glutathione peroxydases
<b>CaP</b>	Cancer de la prostate	<b>GSH</b>	Glutathione
<b>CARBs</b>	Castration resistant expressed-Bim-1	<b>Gsta4</b>	Glutathione S-transferase4
<b>CARNs</b>	Castration resistant expression Nkx3.1	<b>H2O2</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>CAT</b>	Catalase	<b>H2S</b>	Sulfure d'hydrogène
<b>CBP</b>	CREB-Binding protein	<b>HBP</b>	Hyperplasie bénigne de la prostate
<b>CD31/PCAM1</b>	Platelet endothelial adhesion molecule	<b>HIF1</b>	Hypoxia inducible factor
<b>CD45/PTPRC</b>	Protein tyrosine phosphatase receptor type C	<b>HO-</b>	Radical hydroxyle
<b>CD49f/ITGA6</b>	Integrin subunit alpha-6	<b>IHC</b>	Immunohistochemistry
<b>C-KIT</b>	Receptor tyrosin kinase protein KIT	<b>IL6</b>	Interleukine6
<b>Clu</b>	Clusterin	<b>IPDE</b>	Inhibiteur des phosphodiésterases
<b>CXCL12</b>	C-X-C Motif chemokine ligand 12	<b>IPSS</b>	International prostate score symptom
<b>CYP17</b>	Cytochrome P450 family 12 subfamily A member 1	<b>JAG1</b>	Jagged canonical notch ligand1
<b>Cyp2F2</b>	Cytochrome P450 family 2 subfamily F member 2	<b>JAK</b>	Janus kinase

<b>KRTs</b>	Keratins	<b>scRNAseq</b>	single cell RNA sequencing
<b>Lgr5</b>	Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor5	<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog
<b>LSCmed</b>	Lin-/Sca1+/CD49median	<b>SMRT/NCOR2</b>	Nuclear Receptor Corepressor2
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde	<b>SOCS3</b>	Supressor Of Cytokine Signaling 3
<b>NAC</b>	N-acetyl-cysteine	<b>SODs</b>	Superoxyde dysmutase
<b>NCoR</b>	Nuclear receptor co-repressor	<b>Sox10</b>	SRY-Box Transcription Factor 10
<b>Nfkb</b>	Forkhead box b	<b>SRCs</b>	SRC Proto-Oncogene, Non-receptor Tyrosine kinase
<b>NK</b>	Natural killer	<b>SRD5As</b>	5alphareductase gene
<b>Nkx3.1</b>	NK3 Homeobox1	<b>Stat5</b>	signal transducer and activator of transcription 5
<b>NOXs</b>	NADPH oxidases	<b>TACSTD2/TROP2</b>	Tumor associated calcium signal transducer 2
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor erythroid-2-related factor2	<b>Ter119/LY76</b>	Lymphocyte antigen 76
<b>O2°-</b>	Radical superoxyde	<b>TGFb</b>	Transforming growth factor b
<b>P300</b>	E1A Binding protein P300	<b>Thy1</b>	Thymus cell antigen 1
<b>Pb-PRL</b>	Probasin-Prolactin	<b>Trp63/P63</b>	Tumor protein P63
<b>Pbsn</b>	Probasin	<b>Trpv6</b>	Transient receptor potential cation chanel subfamily V member 6
<b>PPARg</b>	Peroxisome proliferator activated gamma	<b>Tspan8</b>	Tetraspanine 8
<b>PROM1</b>	Prominin1	<b>UGE</b>	Epithelium urogénital
<b>PSA</b>	Prostate secreted protein	<b>UGM</b>	Urogenital mesenchyme
<b>PSCA</b>	Proliferatin cell nuclear antigen	<b>UGS</b>	Urogenital sinus
<b>Qmax</b>	Débit urinaire maximal	<b>Wfdc2</b>	WAP Four-Disulfide Core Domain 2
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	<b>Wnt2</b>	Wnt family member 2
<b>RUNX1</b>	RUNX family transcription factor 1	<b>WT</b>	Wild type
<b>SBAU/LUTS</b>	Symptômes du bas appareil urinaire	<b>XCR1</b>	X-C Motif chemiokine recpetor 1
<b>Sbp</b>	Squamosa promotor biding protein		
<b>SCA-1</b>	Stem-cell antigen-1		

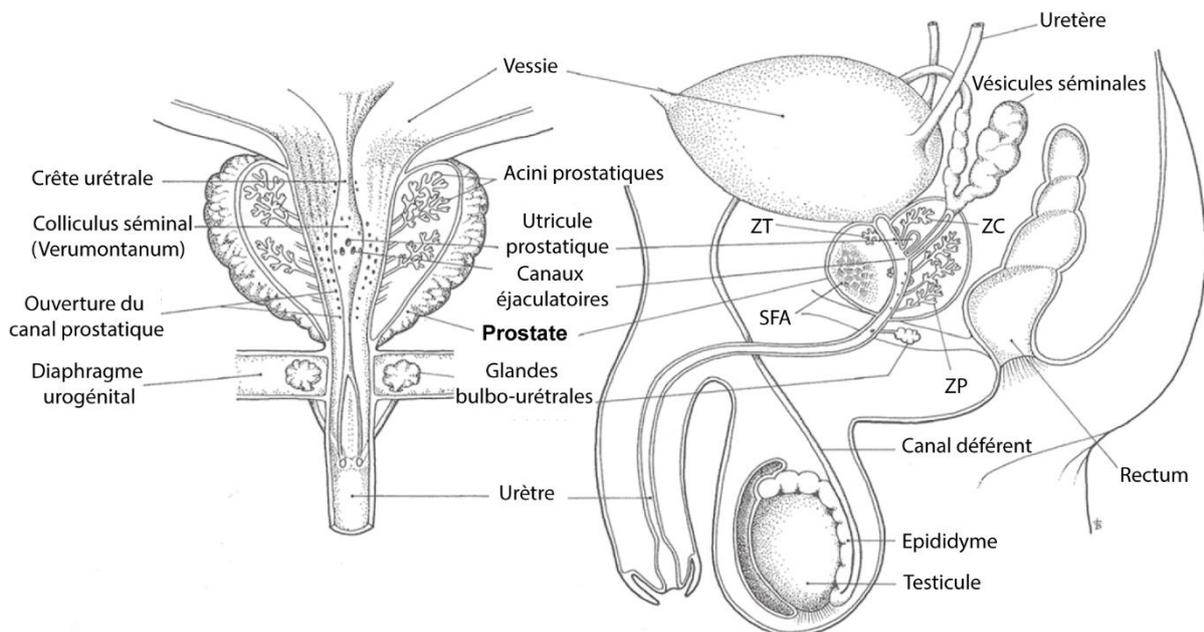
# INTRODUCTION

## I. La prostate

### A. ANATOMIE, PHYSIOLOGIE ET HISTOLOGIE DE LA PROSTATE

La prostate est une petite glande du tractus génital masculin de forme conique localisée sous la vessie et encerclant l'urètre (**Figure 1**). Chez un homme sain d'une vingtaine d'années, la prostate pèse en moyenne 20 grammes pour un volume de 20 cm<sup>3</sup>.

La contraction de la prostate permet l'expulsion du sperme contenant les spermatozoïdes, ainsi que l'obstruction du col de la vessie lors de l'éjaculation. Les spermatozoïdes et le liquide séminal rejoignent tous deux la prostate au niveau du canal éjaculateur dans lequel se déverse également un fluide clair produit par la prostate appelé liquide prostatique.

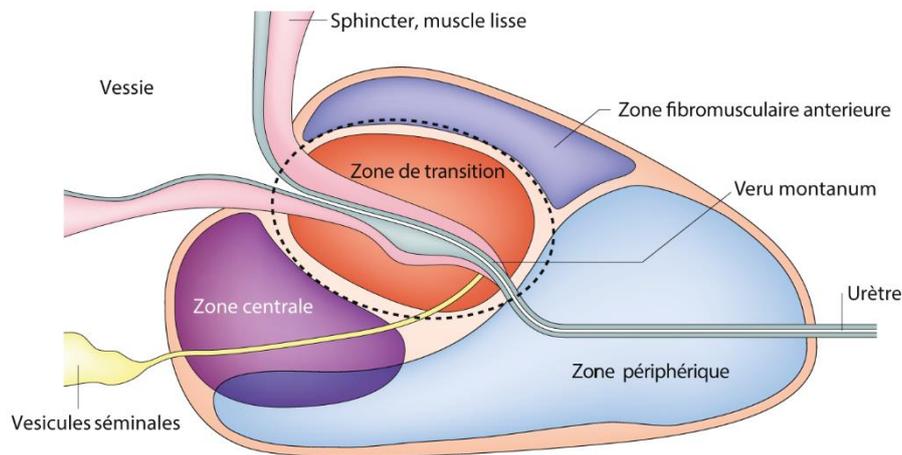


**Figure 1: Le tractus génital masculin**

La prostate est localisée sous la vessie. La zone de transition (ZT) prostatique est la zone en contact avec l'urètre traversant la prostate. Les vésicules séminales sont également reliées à la prostate via le canal éjaculateur qui rejoint l'urètre au niveau du *verumontanum*. ZT : zone de transition, ZC : zone centrale, ZP zone périphérique, SFA : stroma fibromusculaire antérieur. Modifié d'après (Timms and Hofkamp, 2011).

Le sperme ainsi formé, est composé à 1% de spermatozoïdes, 1/3 de liquide prostatique et 2/3 de liquide séminal. Lors de l'éjaculation, le sperme est expulsé du canal éjaculateur via le colliculus séminal (ou *verumontanum*) dans l'urètre. Le liquide prostatique est important pour la fertilité. En effet, son pH alcalin permet de neutraliser l'acidité des parois féminines favorisant ainsi la survie des spermatozoïdes. Il est composé de cations (Homonnai *et al.*, 1978), de protéines (Oliva, Martínez-Heredia and Estanyol, 2008), ainsi qu'une quantité importante de lipides, de cholestérol et d'enzymes contenues dans de petites vésicules extracellulaires appelées prostasomes (Burden *et al.*, 2006). Cette composition facilite la mobilité des spermatozoïdes, favorise la fécondation de l'ovocyte et confère au liquide prostatique des propriétés immunosuppressives, antibactériennes et antioxydantes.

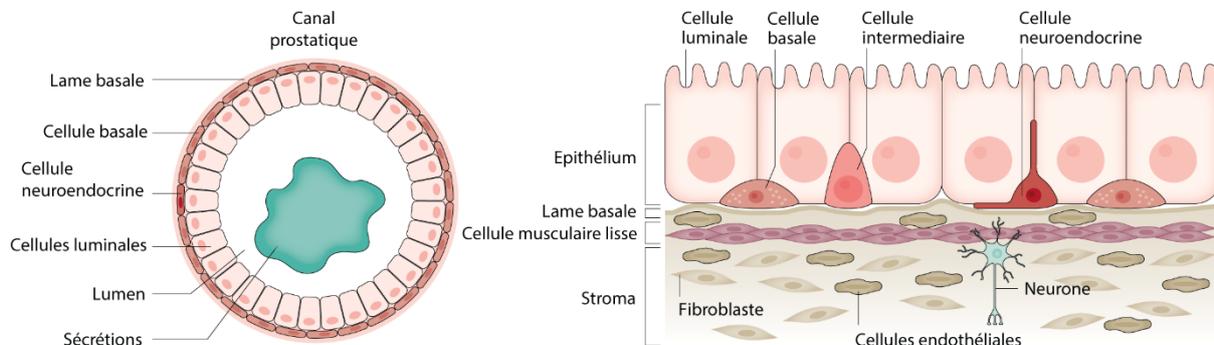
La prostate humaine est divisée en quatre zones (Mc Neal, 1972) ; la zone centrale positionnée en partie dorsale, la zone périphérique se trouvant au contact du rectum, la zone fibromusculaire positionnée en partie antérieure ainsi que la zone de transition encerclant l'urètre (**Figure 2**). Bien que de récentes études montrent des différences histologiques entre les zones péri-urétrales et plus distales, cette distinction anatomique n'est cependant que peu visible à l'œil nu. L'apport de ces études sur l'enrichissement des connaissances quant à la composition cellulaire de la prostate sera détaillé dans le chapitre **I.B**.



**Figure 2: Anatomie schématique de la prostate humaine**

Schéma de coupe sagittale de prostate humaine. La prostate humaine est divisée en plusieurs régions appelées zones. La zone de transition entourant l'urètre (rouge), la zone centrale (violette), la zone périphérique (bleu clair) et la zone fibromusculaire (bleu foncé) se trouvant en partie antérieure. Modifié d'après (Brennen and Isaacs, 2018).

La prostate humaine est composée de 25-30 glandes connectées au canal éjaculateur via des structures ductales (McNeal, 1968). Chaque glande est composée d'un épithélium stratifié formé de deux couches cellulaires (**Figure 3**).



**Figure 3: Histologie schématique d'une glande prostatique humaine**

L'épithélium glandulaire prostatique se compose de deux couches de cellules épithéliales ; une première couche de cellules luminales au contact de la lumière et une seconde couche continue chez l'homme et discontinue chez la souris, de cellules basales. L'épithélium prostatique est également composé de quelques rares cellules neuroendocrines. L'épithélium prostatique repose sur une lame basale, au sein d'un stroma composé de cellules fibroblastiques, de myofibroblastes, de cellules immunitaires résidentes et de cellules endothéliales. Modifié d'après (Rebello *et al.*, 2021).

La première couche qui est au contact de la lumière, est constituée de cellules luminales caractérisées par l'expression des cytokératines *KRT8* (CK8) et *KRT18* (CK18). Elles sécrètent le liquide prostatique. Ces cellules luminales reposent sur une seconde couche, composée de cellules basales exprimant les cytokératines *KRT5* (CK5), *KRT14* (CK14) et le marqueur *TRP63* (P63). Dans la couche basale se trouvent aussi des cellules dites intermédiaires qui expriment à la fois les marqueurs luminaux et basaux ainsi que des marqueurs additionnels comme *KRT19* (CK19) (De Marzo, Nelson and Coffey, 1998; Xue *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001). Au sein de cet épithélium, se trouvent également quelques rares cellules appelées neuroendocrines qui sont caractérisées par l'expression des marqueurs synaptophysine et chromogranine A (Abate-Shen and Shen, 2000). Les glandes prostatiques sont soutenues par une lame basale qui délimite le compartiment épithélial du compartiment stromal. Ce compartiment stromal est vascularisé, composé de cellules fibroblastiques et myofibroblastiques ainsi que de quelques cellules immunitaires. Bien que peu nombreuses au sein de la prostate saine, les cellules immunitaires résidentes sont très diverses. Il a été

identifié, des cellules B (naïves et « mémoires »), des plasmocytes, des cellules T (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, T helper et T régulateur), des macrophages, des cellules NK (Natural Killer) ainsi que des cellules dendritiques (E. Zhang *et al.*, 2020). Ces cellules immunitaires sont majoritairement retrouvées dans le stroma, cependant il est possible d'en détecter quelques-unes au sein de l'épithélium.

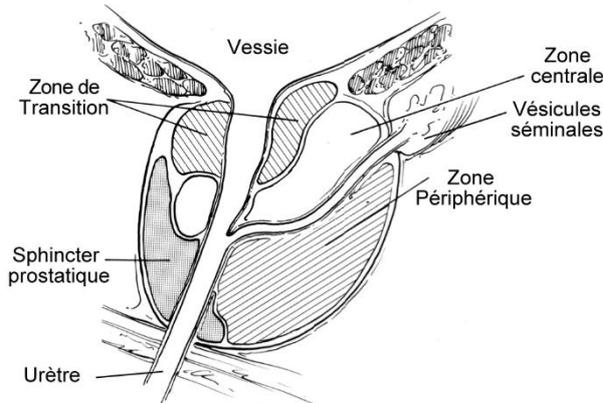
Une des difficultés dans l'amélioration des connaissances sur la composition cellulaire de la prostate est l'accès à des échantillons réellement sains, c'est-à-dire provenant d'hommes jeunes et sans pathologie urologique. En l'absence de tels échantillons, sont considérées comme saines des prostates provenant de patients âgés sans antécédent urologique identifié, ou des zones controlatérales à une tumeur cancéreuse. Ces deux types d'échantillons comportent des biais. En effet, les pathologies prostatiques étant très fréquentes chez les hommes âgés (voir chapitre II), il est difficile de garantir l'absence de toute pathologie qui ne puisse entraîner des erreurs d'interprétations et fausser les résultats. De plus, pour le second cas, de par la nature multifocale du cancer de la prostate, il n'est jamais possible d'exclure qu'une tumeur localisée puisse affecter la composition moléculaire et/ou cellulaire de zones considérées comme "normales" car identifiées comme non tumorales.

Il est possible d'enrichir la compréhension de l'histologie prostatique en étudiant la prostate des mammifères. Dans le cas des recherches histologiques et développementales (saines et pathologiques), la plupart des études sont faites chez la souris et le rat. C'est pourquoi, nous allons comparer ici l'anatomie et l'histologie des prostates humaine et murine.

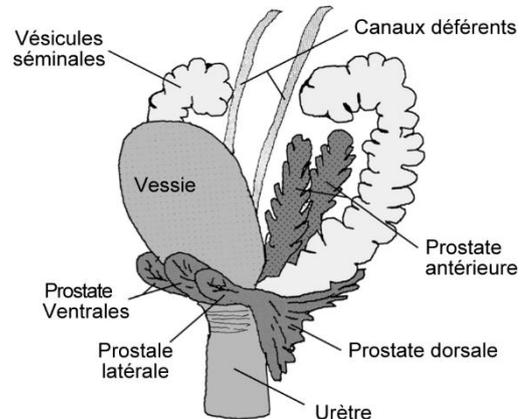
Contrairement à l'homme dont la prostate n'est composée que d'un seul lobe, les prostates de souris et de rat sont composées de quatre paires de lobes prenant naissance au niveau de l'urètre et disposés selon un plan de symétrie bilatéral (**Figure 4**). Ces lobes sont nommés en fonction de leurs localisations par rapport à l'axe de polarité dorso/ventral. Ainsi, les prostates murines possèdent une paire de lobes antérieurs, une paire de lobes dorsaux, une paire de lobes latéraux ainsi qu'une paire de lobes ventraux. Concernant la correspondance entre les lobes de la prostate murine avec la prostate humaine, il était généralement considéré que les lobes dorsaux et latéraux soient les plus similaires à la prostate humaine (Berquin *et al.*, 2005), cependant le consensus actuel entre les vétérinaires et les pathologistes est qu'il n'y a pas de

correspondance claire entre les lobes de prostates murines et les zones de la prostate humaine (Ittmann *et al.*, 2013; Shappell *et al.*, 2004).

**A** Prostate adulte humaine (Coupe sagittale)



**B** Prostate adulte de souris (Vue latérale)



**Figure 4: Anatomie comparées des prostates humaine et murine**

La prostate humaine est une glande entourant l'urètre, que l'on divise en plusieurs zones : la zone de transition entourant l'urètre, la zone centrale, la zone périphérique, et la zone fibromusculaire non représentée ici sur le schéma, qui se trouve en partie antérieure. Chez la souris et le rat, la prostate est composée de plusieurs lobes attachés à l'urètre : les lobes antérieurs, les lobes dorsaux, les lobes latéraux et les lobes ventraux. Modifié d'après (Toivanen and Shen, 2017).

Outre ces différences anatomiques, l'histologie des prostates murines est très similaire à celle décrite plus haut pour la prostate humaine. Cependant, il faut noter que l'épithélium est dit pseudostratifié puisque la couche de cellules basales qui le compose n'est pas continue, comme c'est le cas chez l'homme (Hayward *et al.*, 1995). C'est pourquoi, les ratios entre les cellules basales et luminales diffèrent entre l'homme et les muridés. En effet, il est de l'ordre de 1/1,1 chez l'homme contre seulement 1/3,9 chez la souris et de 1/7,6 chez le rat (El-Alfy *et al.*, 2000). De plus, le stroma de la prostate humaine est plus dense que celui des prostates murines. Chez l'homme, il est composé d'un riche réseau fibromusculaire alors que celui des prostates murines, à l'exception des zones proximales qui possèdent un stroma plus épais, est composé de fines couches de cellules musculaires lisses jointes par un tissu conjonctif (Shappell *et al.*, 2004; Ittmann *et al.*, 2013). Les ratios entre le stroma et l'épithélium sont donc également différents entre l'homme et les muridés. En effet, si on retrouve des proportions similaires de cellules épithéliales et stromales chez l'homme, chez le rat et la souris on observe un plus petit nombre de cellules stromales (Rohr and Bartsch, 1980).

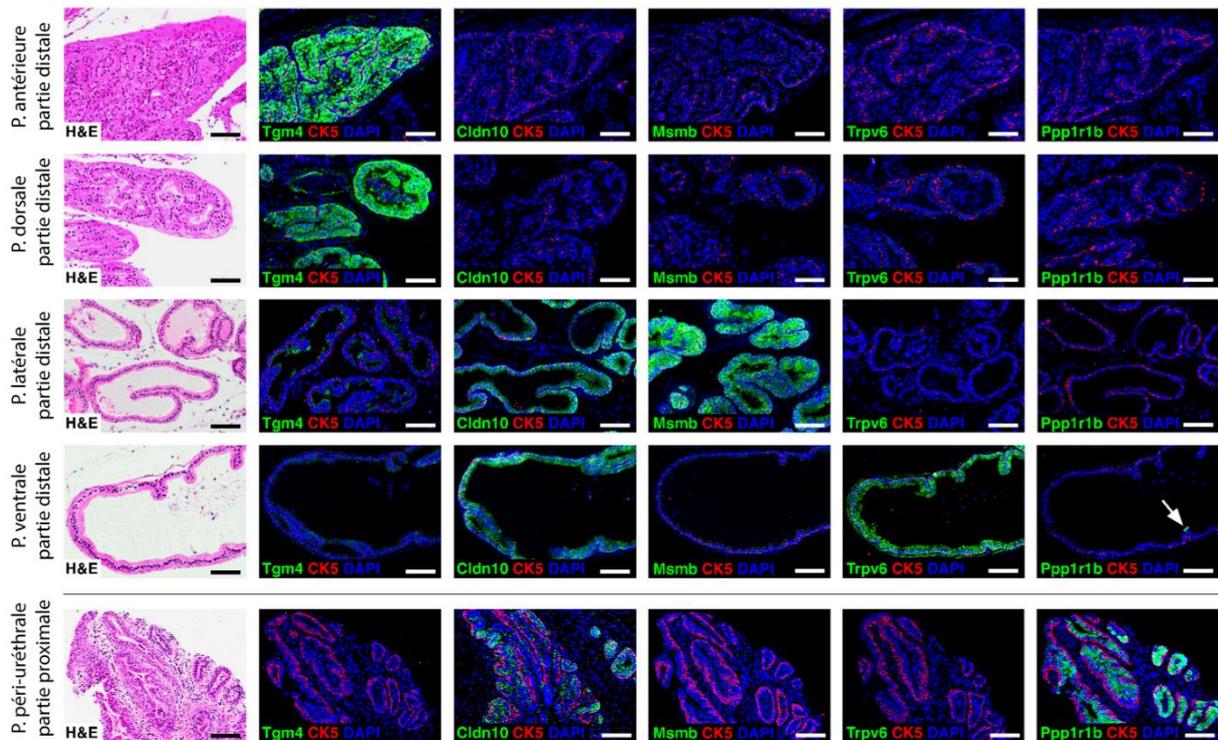
## B. L'APPORT DES ETUDES SUR CELLULES UNIQUES

La révolution technologique des études dites « sur cellules uniques » et notamment celle du séquençage d'ARN (scRNAseq), a permis d'enrichir les connaissances de la composition cellulaire prostatique. Depuis 2018, plusieurs articles ont permis de mettre en évidence la diversité cellulaire composant l'épithélium et le stroma prostatiques chez l'homme et la souris.

Le séquençage sur cellules uniques a permis d'enrichir les connaissances sur la diversité de l'épithélium prostatique, et notamment en ce qui concerne la composition de la couche luminale. En effet, ces cellules ne sont pas toutes strictement identiques au sein de la prostate. Chez la souris, plusieurs équipes distinguent trois à cinq sous-populations en fonction de leur protocole d'étude.

En se concentrant sur le lobe antérieur, le laboratoire de C. Sawyers en distingue trois, dénommées L1, L2 et L3 (Karthaus *et al.*, 2020). La majorité des cellules lumineales qu'ils trouvent (L1 96%) répondent aux androgènes puisqu'elles expriment la probasine (*Pbsn*), ainsi que d'autres de ses cibles transcriptionnelles à savoir *Nkx3.1*, *CD26*, *CD59a* et *CD133*. La deuxième sous-population représentant 3% (L2) des cellules lumineales, est indépendante des androgènes et exprime des marqueurs de cellules dites progénitrices, comme *Sca1/Ly6a*, *Tacstd2/Trop2*, *Pscn*, *Krt4* et *Claudin10*. Par ailleurs d'autres équipes ont aussi mis en évidence la présence de cellules indépendantes des androgènes et exprimant *Runx1* ou *Ppp1r1B*. Comme Karthaus et ses collègues, ces équipes retrouvent davantage ces cellules en partie proximale des lobes, c'est-à-dire proches de l'urètre, plutôt qu'en partie distale (Crowley *et al.*, 2020; Karthaus *et al.*, 2020; Mevel *et al.*, 2020). Pour le laboratoire de D. Strand, ces cellules ont une origine urétrale, c'est pourquoi il les nomme ainsi (Ur Lum). Les cellules progénitrices ont par définition la capacité de se différencier en plusieurs sous-types cellulaires. L'origine et l'implication de ces cellules dans le développement ainsi que dans l'homéostasie du tissu prostatique adulte seront abordées au cours des chapitres **I.C** et **I.E**. La dernière sous-population identifiée (L3) représente 1% des cellules lumineales. Elle exprime

spécifiquement *Foxi1*, tout comme une population de ionocytes résidente du poumon qui régule le transport des ions et l'équilibre des sels. Cette dernière population L3, pourrait être responsable de la régulation du pH du liquide prostatique puisque c'est une des fonctions des cellules luminales *Foxi1*<sup>+</sup> de l'épididyme (Blomqvist *et al.*, 2006).



**Figure 5: Expression différentielle des marqueurs luminaux des lobes prostatiques de souris**

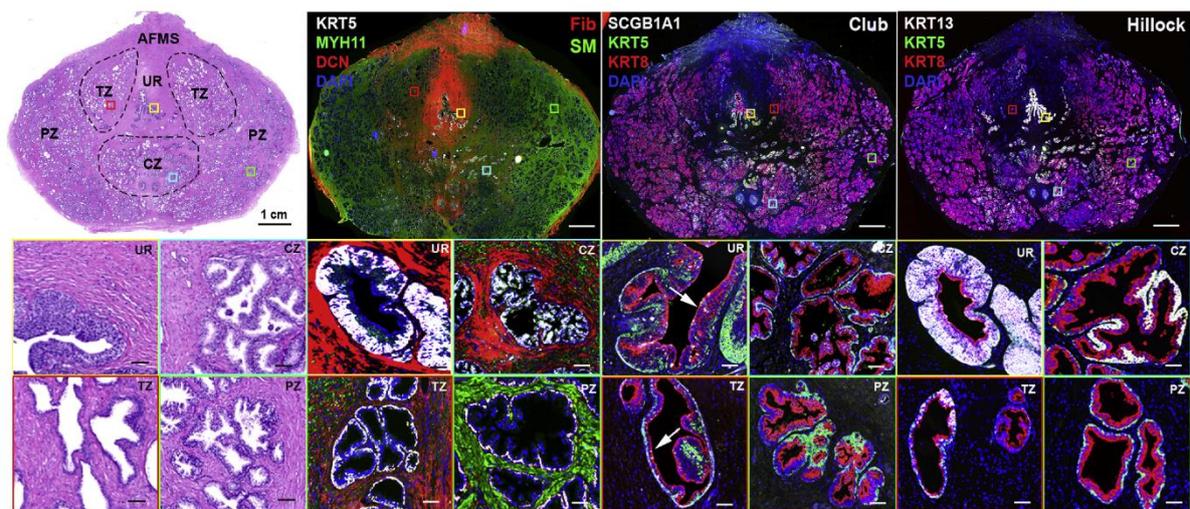
L'histologie des lobes prostatiques est observée avec une coloration hématoxyline et éosine. TGM4 est spécifiquement exprimé dans les lobes dorsaux et antérieurs, MSMB dans les lobes latéraux, TRPV6 dans les lobes ventraux et PPP1R1B en partie proximale et péri-urétrale. CK5 marque les cellules basales et le Dapi les noyaux. Modifiée d'après (Crowley *et al.*, 2020).

En plus de cette diversité au sein d'un même lobe, il a été montré que les cellules luminales expriment des marqueurs spécifiques en fonction du lobe prostatique auquel elles appartiennent. Une forte expression des gènes *Gsdma* (Gasdermine) et *Tgm4* (Transglutaminase 4) est retrouvée dans les cellules luminales appartenant aux lobes antérieurs et dorsaux. Les expressions de *Sbp* et de *Trpv6* sont quant à elles retrouvées dans les luminales appartenant aux lobes ventraux (**Figure 5**) (Crowley *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2020).

Chez l'homme, l'étude de référence est celle publiée en 2018 par l'équipe de D. Strand, qui a montré que l'épithélium prostatique se composait de quatre types cellulaires distincts (Henry *et al.*, 2018). En plus des cellules luminales et basales décrites de longue date par des approches histologiques classiques, deux populations supplémentaires ont pu être identifiées par l'approche scRNAseq. Celles-ci ont été appelées Club et Hillock du fait de leurs similarités transcriptomiques avec deux populations cellulaires précédemment décrites dans le poumon, et exprimant respectivement la sécrétoglobuline 1A1 (*Scgb1a1*) et *Krt13*. Bien que très proches l'une de l'autre, les cellules Club expriment la kératine luminaire *KRT8*, alors que les cellules Hillock expriment la kératine basale *KRT5*. Ces cellules Club et Hillock de la prostate humaine ont des similarités transcriptomiques avec les cellules progénitrices L2 décrites chez la souris (Joseph *et al.*, 2020). Chez l'homme, les études scRNAseq révèlent que la population luminaire majoritaire (équivalente à la population L1 chez la souris) possède une forte activité métabolique lipidique et stéroïdique, alors que les sous-populations Club et Hillock auraient plutôt une fonction immunomodulatrice. Comme chez la souris, les cellules Club et Hillock se trouvent davantage dans la zone péri-urétrale ou zone de transition (**Figure 6**) (Henry *et al.*, 2018; Joseph *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022).

En ce qui concerne la composition du stroma, plusieurs populations de cellules ont été identifiées aussi bien dans les lobes prostatiques de souris que dans la prostate humaine (Kwon *et al.*, 2019; Joseph *et al.*, 2021).

Chez la souris, on distingue les cellules musculaires lisses et myofibroblastes caractérisés par l'expression du gène *Acta2* (Actin- $\alpha$  2), les fibroblastes et les cellules endothéliales (vasculaires et lymphatiques) (Karthaus *et al.*, 2020). Pour les fibroblastes, il est possible de les diviser en sous-populations en fonction de l'expression différentielle de certains marqueurs ainsi que de leur localisation. Les fibroblastes ductaux sont localisés près des canaux prostatiques et expriment *Wnt2*, les fibroblastes prostatiques expriment *C3* et sont présents entre les glandes de tous les lobes. Enfin, les fibroblastes urothéliaux exprimant *Lgr5* sont eux localisés en grande partie dans la zone entourant l'urètre (Joseph *et al.*, 2021).



**Figure 6: Hétérogénéité cellulaire épithéliale et stromale de la prostate humaine**

Les panneaux supérieurs montrent une coupe transversale de prostate entière, et les carrés dans la partie inférieure de la figure représentent les agrandissements des zones urétrale (UR), centrale (CZ), transitionnelle (TZ) et périphérique (PZ). Les panneaux de gauche (A) sont colorés par hématoxyline et éosine, les parties B à D représentent les marquages en immunofluorescence permettant d'identifier et de localiser les cellules basales (*KRT5*), luminales (*KRT8*), Club (*SCGB1A1*) et Hillock (*KRT13*) ainsi que les fibroblastes (*DCN*) et les cellules musculaires lisses (*MYH11*). Le Dapi marque les noyaux. Modifié d'après (Henry *et al.*, 2018).

Chez l'homme, on distingue cette fois deux sous-populations de cellules musculaires lisses, deux sous-populations de fibroblastes ainsi qu'une population de cellules de soutien des capillaires sanguins : les péricytes. La population de cellules musculaires lisses comprend les cellules appartenant au compartiment vasculaire exprimant *MCAM* (*Melanoma cellular adhesion molecule*) et des cellules musculaires lisses appartenant au stroma prostatique exprimant *ACTA2* (*ACTIN- $\alpha$  2*). En ce qui concerne la population fibroblastique, Joseph et ses collègues distinguent les fibroblastes interstitiels exprimant *C7*, des fibroblastes péri-épithéliaux plus proches des glandes et qui expriment *Apod* (*Apolipoprotein*). De la même manière que pour l'épithélium, ils observent une localisation différente entre les cellules musculaires et les cellules fibroblastiques (Henry *et al.*, 2018; Joseph *et al.*, 2021) (**Figure 6**). En effet, le marquage de la chaîne lourde de la myosine 11 (*MYH11*) identifiant les cellules musculaires lisses se trouve davantage dans les zones périphériques de la prostate. En revanche, le marquage de la décorine (*DCN*) identifiant les fibroblastes se trouve dans la zone de transition entourant l'urètre.

Il existe des similarités de transcriptions entre certains fibroblastes présents chez la souris et une des sous-populations identifiées dans la prostate humaine. Joseph et ses collègues montrent ainsi que les fibroblastes ductaux et urothéliaux de la souris sont similaires aux fibroblastes interstitiels présents chez l'homme (Joseph *et al.*, 2021).

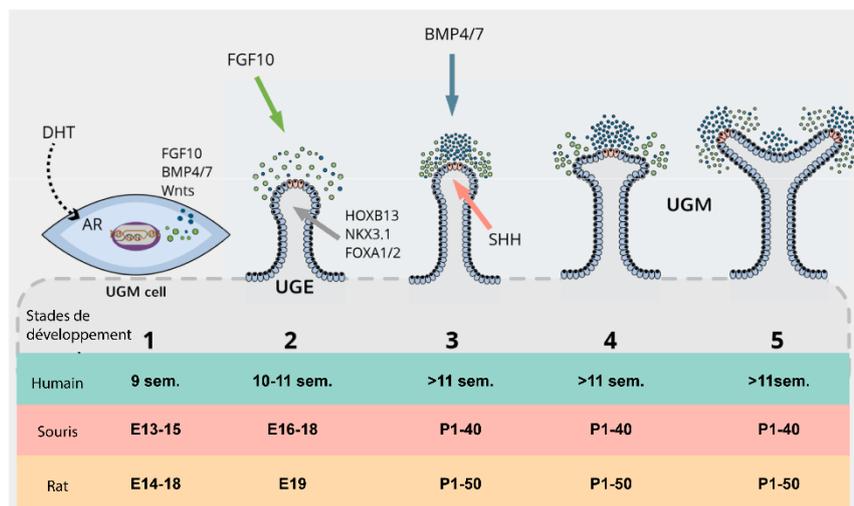
Les fibroblastes sécrètent les composants de la matrice extracellulaire comme des protéines fibreuses (collagène) qui forment un réseau structurel soutenant le stroma (Morrison, Thornhill and Gaffney, 2000). Ils sécrètent également des facteurs de croissance, comme IGF1, FGF2, FGF7, HGF, NRG1 et TGF $\beta$ 1, et communiquent ainsi avec l'épithélium et le compartiment immunitaire participant au développement et au maintien de l'homéostasie tissulaire (Joseph *et al.*, 2021). Les fibroblastes sont également supposés être impliqués dans l'étiologie des pathologies prostatiques. Ces notions seront abordées en détails dans les chapitres **I.C**, **I.O** et **III.C**.

La prostate saine contient peu de cellules immunitaires résidentes. Cependant, il existe une grande variété de types cellulaires retrouvés. Chez la souris, les populations immunitaires les plus abondantes sont les monocytes et les macrophages. La présence de leucocytes, de lymphocytes B et T, de cellules NK (Natural Killer), de cellules dendritiques (*Xcr1*) ainsi que de cellules gliales (*Sox10*) a également été publiée (Fox *et al.*, 2019; Karthaus *et al.*, 2020). Ces mêmes cellules immunitaires sont également retrouvées dans la prostate humaine saine (Fox *et al.*, 2019; Tuong *et al.*, 2021) .

## C. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PROSTATE

Le développement du tractus urogénital débute à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, du 13<sup>ème</sup> jour post-coïtal (E13) chez la souris et vers E15 pour le rat, par l'émergence du sinus urogénital primitif. A partir de ce dernier, se formeront les différentes structures du tractus urogénital. Il donnera naissance en partie rostrale à la vessie, en partie médiane au sinus urogénital (UGS pour *urogenital sinus*), et en partie caudale à l'urètre pénien. La prostate se développe à partir de l'UGS vers la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, autour de E17 chez la souris et à E19 chez le rat (Cunha *et al.*, 1987).

Ce sinus est composé d'un épithélium (UGE pour *urogenital epithelium*) et d'un mésenchyme (UGM pour *urogenital mesenchym*) (Kellokumpu-Lehtinen, Santti and Pelliniemi, 1980). Ce sont les cellules épithéliales qui vont entrer en prolifération et initier le développement de la prostate, sous l'action du mésenchyme et des androgènes (Chung and Cunha, 1981). Même s'il existe des différences en termes de régulations temporelles et spatiales, les étapes de l'organogénèse des prostatites humaines et murines sont relativement similaires. Elles se décomposent en plusieurs étapes comme illustré ci-dessous (**Figure 7**).



**Figure 7: Les phases du développement embryonnaire des prostatites humaines et murines**

Schéma décrivant les différents stades du développement embryonnaire chez l'homme, le rat et la souris. Stades de développement : 1 : pré-bourgeonnement, 2 : initiation du bourgeonnement, 3 : élongation du bourgeon, 4 : morphogénèse et ramification, 5 : allongement et canalisation. Les flèches pleines représentent la localisation des protéines indiquées. Modifié de (Buskin *et al.*, 2021)

**Le dimorphisme sexuel** induit la production de testostérone par les cellules testiculaires de Leydig à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme (Siiteri and Wilson, 1974), entre E13 et E14 chez la souris et entre E14 et E18 chez le rat (Pointis *et al.*, 1979; Tapanainen *et al.*, 1981; Cunha *et al.*, 2018). C'est cette étape qui va conduire au développement de la prostate chez les individus XY n'ayant pas d'anomalie de synthèse des androgènes ou d'expression du récepteur aux androgènes (AR).

**L'initiation du bourgeonnement de l'UGE** est induite par l'action des androgènes à E17.5 chez la souris, E19 chez le rat, et lors de la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme. A son arrivée au niveau de l'UGM, la testostérone est métabolisée par la 5 $\alpha$ -réductase en un métabolite plus affin pour l'AR, la dihydrotestostérone (DHT), qui va moduler la transcription de gènes cibles via ce récepteur (Wilson *et al.*, 1981). Contrairement à ce qui était connu, AR est tout d'abord exprimé faiblement par les cellules de l'UGE à partir de E12.5 avant d'être exprimé par les fibroblastes de l'UGM à E13.5 chez la souris (Lee *et al.*, 2020). L'expression de AR dans l'UGM suit une régulation spatiale. Il est exprimé fortement dans les cellules de l'UGM adjacentes à l'UGE et décroît dans les cellules plus éloignées, suggérant une action localisée du signal androgénique. Des expériences de recombinaisons tissulaires chez la souris ont montré que l'activité de AR dans l'UGM est nécessaire au développement prostatique contrairement à son expression dans l'UGE (Chung and Cunha, 1981; Lai *et al.*, 2012) dont on ne connaît pas le rôle. Afin d'identifier les acteurs moléculaires gouvernant l'initiation du bourgeonnement de l'UGE, Nash et ses collègues ont réalisé une comparaison des sites de fixations de AR avec une analyse transcriptomique différentielle des UGM de rats mâles et femelles. Contrairement à ce qui était attendu, ils ont constaté une diminution de la transcription de nombreux gènes dans les UGM de souris mâles (Nash *et al.*, 2019). Ils réalisent le même constat chez l'Homme, suggérant une modulation de différentes voies de signalisation, et non l'activation d'un facteur clef unique. L'analyse par scRNAseq réalisée par Lee et ses collègues à E17.5 confirme cette hypothèse chez la souris et met en évidence une activité plus importante des voies de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine, BMP7, Hedgehog et de l'acide rétinoïque dans les fibroblastes péri-épithéliaux. Ils identifient également des interactions paracrines potentielles entre l'épithélium et ces fibroblastes (Lee *et al.*, 2020). En parallèle de la métabolisation de la testostérone dans l'UGM, une augmentation de

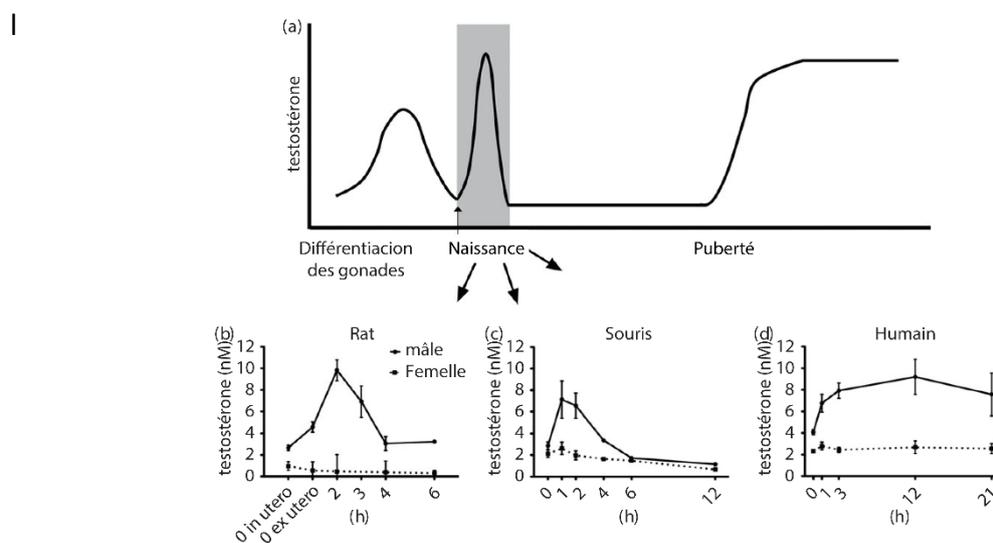
l'expression du facteur Sonic Hedgehog (SHH) est décrite dans les cellules épithéliales sans que l'on ne sache si cette expression est sous contrôle direct de AR dans ces mêmes cellules ou indirect via l'activité de AR dans les fibroblastes péri-épithéliaux (Wilhelm and Koopman, 2006).

**La morphogénèse** se caractérise par l'allongement et la ramification des bourgeons de l'UGE formant un réseau de cordons épithéliaux solides (Timms, Mohs and Didio, 1994). Chez l'Homme, la morphogénèse s'effectue principalement *in utero* à partir de la 11<sup>ème</sup> semaine de gestation (Pletcher and Shibata, 2022), et s'interrompt après la naissance pour ne reprendre que sous l'action des androgènes au moment de la puberté (Cunha *et al.*, 1987). A l'inverse chez la souris et le rat, elle est initiée à la naissance et se poursuit de manière continue jusqu'à la puberté (Sugimura, Cunha and Donjacour, 1986; Timms, Mohs and Didio, 1994; Timms and Hofkamp, 2011). Les cordons sont formés par la réplication des cellules épithéliales au niveau de leurs extrémités et de leurs ramifications (Sugimura, Cunha and Donjacour, 1986; Tika *et al.*, 2019). Ces processus d'allongement et de ramification sont finement régulés par différents acteurs (**Figure 7**). La croissance des cordons est favorisée d'une part, par l'expression de SHH dans les cellules épithéliales induisant l'expression du facteur de transcription *Nkx3.1*, et d'autre part, par l'expression des gènes à homéobox *HOXA13* et *HOXD13* au sein de l'UGM (Timms, Mohs and Didio, 1994). Le processus d'allongement est ensuite entretenu par la sécrétion des facteurs de croissances fibroblastiques *FGF7* et *FGF10* qui, se liant aux récepteurs FGFR2 exprimés par les cellules épithéliales, maintiennent l'expression de *SHH* dans ces dernières. L'allongement est contenu par l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négative réduisant l'expression des *FGFs* suite à l'activité de SHH (Wilhelm and Koopman, 2006). La ramification des structures est quant à elle inhibée par l'UGM, par les facteurs de signalisation BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) et BMP7 et stimulée par l'antagoniste des BMPs : Notch. La morphogénèse conduit ainsi à la formation des différentes zones de la prostate humaine, elles-mêmes composées de différentes structures ductales ramifiées. Chez la souris et le rat, elle aboutit à la formation des quatre paires de lobes prostatiques ayant des structures canalaire différentes (Sugimura, Cunha and Donjacour, 1986). A la naissance, le lobe ventral possède une à trois structures ductales déjà ramifiées, alors que les lobes dorsaux-latéraux possèdent neuf à douze structures ductales non ramifiées. La ramification

de ces derniers s'opère massivement dans les 15 jours après la naissance et s'achève au cours du premier mois de vie.

**La cytodifférenciation de l'épithélium** est le processus final du développement de la prostate aboutissant à la formation de canaux fonctionnels possédant une lumière et un épithélium différencié. Ce processus s'initie à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme (Kellokumpu-Lehtinen, Santti and Pelliniemi, 1980; Cunha *et al.*, 2018). A la 11<sup>ème</sup> semaine, la lumière des canaux apparaît, mais ce n'est qu'à la 13<sup>ème</sup> semaine que les cellules épithéliales se polarisent et qu'une activité sécrétoire est détectée. Chez la souris, la différenciation des cellules épithéliales est observable à partir du 15<sup>ème</sup> jour de vie. Auparavant, les cellules épithéliales expriment les marqueurs basaux (KRT5) et luminaux (KRT8) mais aussi KRT4, KRT19 et KRT13 (Wang *et al.*, 2001). La différenciation des cellules intermédiaires en cellules luminales KRT8<sup>+</sup> différenciées est sous contrôle du facteur de transcriptions NKX3.1 (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Kruithof-de Julio *et al.*, 2013) au niveau distal, et de RUNX1 (Mevel *et al.*, 2020) en partie proximale, et est indépendante des androgènes (Shibata *et al.*, 2020). La différenciation en cellules basales KRT5<sup>+</sup> est quant à elle gouvernée dans l'ensemble de la glande par P63 (Signoretti *et al.*, 2000). La régulation de ce processus n'est pas uniquement contrôlée par l'épithélium, l'action de protéines sécrétées par l'UGM participant aussi à l'acquisition de certaines particularités en fonction des lobes. Par exemple, des expériences de recombinaison tissulaire chez le rat ont montré que l'UGM du lobe ventral est le seul à pouvoir induire la différenciation de l'épithélium ventral caractérisé par la sécrétion de la protéine PSBP (pour *prostatic steroid binding protein*) (Takeda, Suematsu and Mizuno, 1990). La régulation exacte de la formation de la lumière aboutissant à la formation de canaux n'est pas connue mais possède sûrement des similarités avec celle des autres glandes comme le sein et les glandes salivaires (Mailleux, Overholtzer and Brugge, 2008) dans lesquelles les cellules situées au centre des cordons meurent par anoïkis. Aussi, il a été montré que les cellules épithéliales au centre des cordons mouraient par apoptose (Bruni-Cardoso and Carvalho, 2007). En ce qui concerne les cellules neuroendocrines dont l'origine n'est pas clairement établie, elles pourraient provenir soit des crêtes neurales, soit de la différenciation des cellules basales de l'UGS (Wang *et al.*, 2020).

Chez l'Homme, la maturation de la prostate reprend avec l'augmentation de la testostéronémie à l'adolescence (**Figure 8**). La croissance s'accélère due à une prolifération accrue des cellules luminales différenciées, et plus faiblement des cellules basales différenciées passant d'un ratio d'environ 1/1 avant la puberté à 10/1 après la puberté (Cunha *et al.*, 1987). Le taux de prolifération diminue ensuite lorsque la puberté s'achève. Après cette période, le taux de prolifération de l'épithélium prostatique est environ de 2% (Cunha *et al.*, 1987). Les cellules progénitrices basales et luminales unipotentes participent alors à l'homéostasie de leurs compartiments respectifs.

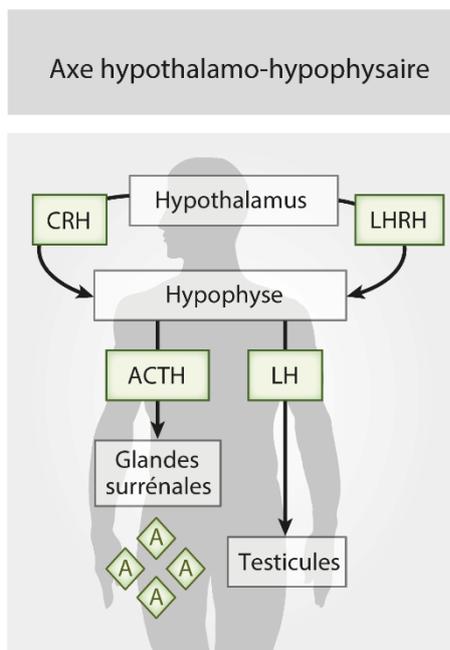


**Figure 8: Testostéronémie chez le rat la souris et l'homme au cours de la vie**

Schéma représentant les variations de concentration sérique de testostérone au cours de la vie (a), ainsi que les mesures de concentrations sanguines chez le rat (b), la souris (c) et chez l'homme (d) au cours des premières heures de vie. Modifiée d'après (Clarkson and Herbison, 2016).

## D. SIGNALISATION ANDROGENIQUE DANS LA PROSTATE ADULTE

La signalisation androgénique est nécessaire au développement et à la maturation de la prostate, mais elle est également importante pour l'homéostasie de l'épithélium prostatique adulte. Elle est contrôlée d'une part par la production d'androgènes ainsi que leur métabolisation, et d'autre part par l'activité du récepteur aux androgènes.

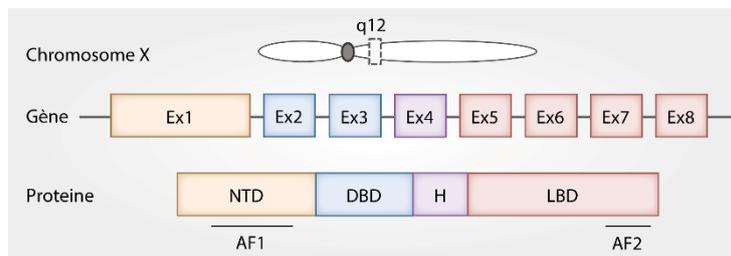


**Figure 9: Axe hypothalamo-hypophysaire**

La synthèse de la testostérone est sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 9 – modifiée d'après Westaby et al., 2022). La partie antérieure de l'hypophyse va, sous l'action de la LHRH (*Luteinizing Hormone-Releasing Hormone* appelée également GnRH (pour *Gonadotropin releasing hormone*) et de la CRH (*Corticotropin-Releasing Hormone*) produites par l'hypothalamus, sécréter deux hormones appelées LH (*Luteinizing Hormone*) et ACTH (*AdrenoCorticoTropic Hormone*). Ces hormones stimulent respectivement la production de testostérone par les cellules testiculaires de Leydig et les glandes surrénales (Westaby et al., 2022).

La DHT est le métabolite actif de la prostate, cependant la testostérone peut également se fixer à AR. Il existe trois types de  $5\alpha$ -réductase. Elles sont codées par le gène *Srd5a2* exprimé de manière prépondérante dans la prostate mais également par le *Srd5a1* et le *Srd5a3*. La SRD5A2 est exprimée par les cellules fibroblastiques et les cellules basales chez l'homme (Silver et al., 1994). Les SRD5A1 et SRD5A3 sont quant à elles exprimées préférentiellement par les cellules épithéliales prostatiques et plus faiblement par les fibroblastes prostatiques. Lorsque AR n'est lié à aucun ligand, il est complexé avec les HSPs (pour Heatshock Proteins), des protéines chaperonnes, et au cytosquelette. Ces protéines séquestrent AR dans le

cytoplasme, le maintiennent dans une conformation favorable à la liaison future d'un ligand et empêchent sa dégradation par le protéasome (Jenster *et al.*, 1991; Georget *et al.*, 2002; Prescott and Coetzee, 2006). Une fois le ligand lié à AR, ce dernier change de conformation, lui permettant de se dissocier du complexe formé par les HSPs et chaperonnes et de migrer dans le noyau. Au sein du noyau, il s'homodimérise et se fixe à l'ADN grâce à son domaine DBD (pour *DNA-binding domain*, voir **Figure 10**) sur des sites spécifiques appelés AREs (*Androgen responsive elements*) et module l'expression de ces gènes cibles (Nelson *et al.*, 2002).



**Figure 10: Structure du gène et de la protéine AR**

Le gène *AR* se situe sur la région q12 du chromosome X chez l'homme et code pour une protéine finale de 919 acides aminés. Le gène est composé de 8 exons. L'exon 1 code pour le domaine NTD (*intrinsically disordered N-terminal domain*) possédant un domaine d'activation AF1 (activation fonction 1). Les exons 2 et 3 codent pour le domaine DBD (*DNA binding domain*) contenant deux domaines à doigts de zinc permettant sa dimérisation ainsi que sa fixation à l'ADN. L'exon 4 code pour le domaine H flexible faisant office de charnière entre la partie N-terminale et la partie C-terminale. Enfin les exons 5 à 8 codent pour le domaine de fixation des ligands appelé LBD (*Ligand-binding domain*) contenant le second domaine d'activation AF2. Modifiée d'après (Westaby *et al.*, 2022).

Le récepteur des androgènes réprime l'expression de certains gènes et en active d'autres. Une fois AR fixé sur ces sites AREs, les acteurs de la machinerie transcriptomique ainsi que les coactivateurs ayant une activité acétyltransférase comme SRC-1, SRC-3, P300 ou CBP, rejoignent le complexe (He *et al.*, 2002; Heinlein and Chang, 2002; Van De Wijngaart *et al.*, 2012). Ils facilitent la transcription de gènes cibles comme le *PSA* (*prostate specific antigen*) ou la *Pbsn* (Probasine) en décomplexifiant la chromatine, favorisant le passage de la machinerie transcriptomique, stabilisant la fixation de AR à l'ADN ainsi qu'en recrutant d'autres coactivateurs. D'autres acteurs clefs interviennent également comme GATA2 (*GATA binding protein 2*) et FOXA1 qui permettent l'ouverture de la chromatine, facilitant là encore la transcription des gènes cibles. Il existe également des corépresseurs qui inhibent la

transcription des gènes cibles de AR (Burd, Morey and Knudsen, 2006). Deux exemples bien caractérisés sont les NCoR et SMRT. Tous deux bloquent l'interaction des domaines N-terminal et C-terminal de AR et rentrent en compétition avec la fixation des coactivateurs (Liao *et al.*, 2003; Wang, Hsu and Chang, 2005). Ils recrutent aussi des histone-désacétylases qui compactent la chromatine, compromettant l'accessibilité aux promoteurs des gènes et empêchant la machinerie transcriptionnelle d'avancer sur l'ADN (Liao *et al.*, 2003). Ainsi la signalisation androgénique est finement régulée au sein de la prostate.

L'action de la signalisation androgénique sur l'épithélium prostatique mature diffère de celle sur l'épithélium en développement. Alors que la signalisation androgénique stimule la croissance de l'épithélium pendant le développement, elle maintient les cellules épithéliales différenciées en quiescence dans l'épithélium mature. De plus, des expériences de délétions sélectives chez la souris ont montré différents effets autonomes et non-autonomes du signal androgénique sur l'homéostasie de l'épithélium mature.

Lorsque le signal androgénique est totalement aboli à la suite d'une castration, le poids des prostates de souris diminue et une baisse de la prolifération de l'ensemble des compartiments prostatiques est constaté (Evans and Chandler, 1987). En revanche, si AR est délété uniquement dans l'épithélium prostatique, une hyperprolifération de celui-ci est constatée conjointement à une diminution de la proportion de cellules luminales différenciées (Nkx3.1, PSP-94, Pbsn) (Wu *et al.*, 2007), ainsi qu'une augmentation de la proportion de cellules intermédiaires exprimant KRT5 et KRT8 (Niu *et al.*, 2011). De manière comparable, la délétion spécifique de GATA2 et GATA3 dans les cellules luminales conduit à une augmentation de la prolifération épithéliale, une perte des cellules luminales différenciées au profit des cellules basales P63<sup>+</sup> (Xiao *et al.*, 2016). Zhang et ses collègues ont montré que l'absence d'AR dans les cellules luminales promeut l'augmentation de la production de cytokines par l'épithélium. Ces cytokines vont alors attirer des macrophages sécrétant de l'IL-1 (interleukine-1), stimulant la prolifération de l'épithélium (Zhang *et al.*, 2016). Plusieurs équipes constatent également une augmentation de l'infiltration immunitaire dans la prostate lorsque le signal androgénique décroît (Wu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016).

Cette diminution de la présence des cellules luminales différenciées lorsque AR est délété dans ces cellules n'est pas associée à une augmentation de la mort cellulaire du compartiment (Wu *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2017). Des expériences de traçage cellulaire dans le cadre de délétions spécifiques de AR dans les cellules basales ou luminales montrent que l'expression de AR dans les cellules basales n'est pas nécessaire à l'homéostasie et la prolifération de ces cellules, mais qu'elle est indispensable à la différenciation de rares cellules basales en cellules luminales (Xie *et al.*, 2017). Lorsque AR est délété dans les cellules luminales cette fois, les auteurs confirment l'augmentation de la prolifération des cellules luminales, l'augmentation de l'expression des marqueurs basaux dans ces cellules luminales AR<sup>-</sup>, ainsi que la perte de leur polarité cellulaire caractéristique (Xie *et al.*, 2017). De plus, même si ces cellules sont résistantes à la castration, le signal androgénique leur est nécessaire pour se diviser et générer des cellules filles luminales différenciées (Wang *et al.*, 2009). Ces différentes études mettent en évidence l'existence de cellules progénitrices au sein de l'épithélium prostatique adulte.

## E. CELLULES EPITHELIALES PROGENITRICES PROSTATIQUES ADULTES

Lorsque le signal androgénique est aboli à la suite d'une castration, les prostates de souris rétrécissent suite à l'apoptose des cellules luminales différenciées (Evans and Chandler, 1987). Chez la souris et le rat, des cycles successifs de castration suivie d'injection de testostérone (appelés cycles de castrations-régénérations) montrent la capacité de l'épithélium prostatique à se régénérer perpétuellement, suggérant la présence de cellules progénitrices au sein de celui-ci (English, Santen and Isaacs, 1987; Wang *et al.*, 2009; Karthaus *et al.*, 2014, 2020).

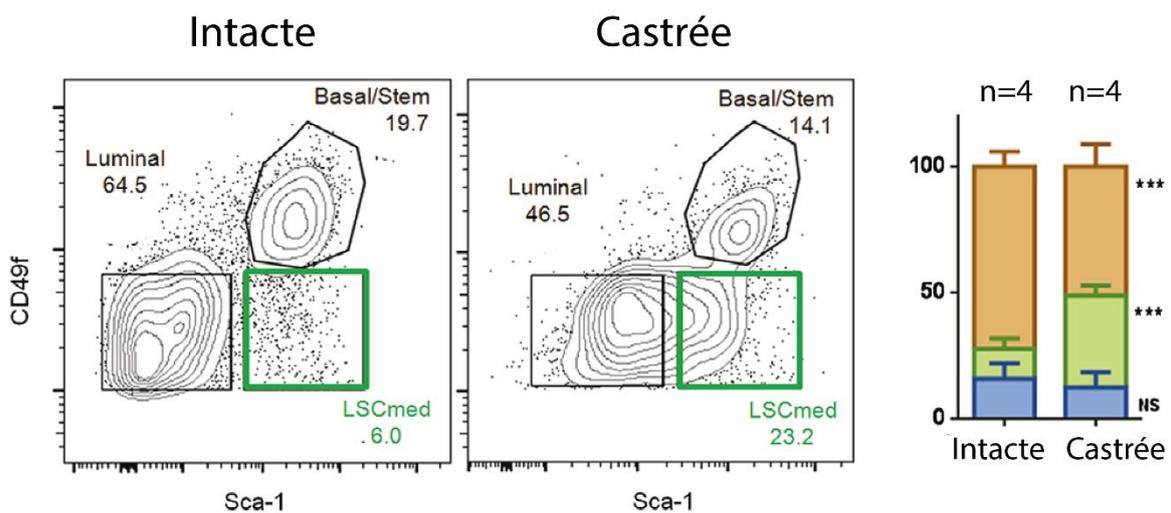
Le nombre et la capacité proliférative des cellules basales n'étant que peu affectés par ces épisodes de castrations-régénérations, il a premièrement été proposé que ces cellules pouvaient être à l'origine de la régénération de l'ensemble de l'épithélium prostatique (English, Santen and Isaacs, 1987). Par la suite plusieurs équipes dont la nôtre ont montré que des cellules intermédiaires (exprimant KRT8 et KRT5) résidentes du compartiment basal et triées par cytométrie en flux (FACS), ont la capacité de former également des sphéroïdes *ex vivo* (Xin *et al.*, 2007; Sackmann-Sala *et al.*, 2015). De plus ces cellules sont autant capables que les cellules basales, de générer des structures glandulaires comportant des cellules luminales et basales différenciées lorsqu'elles sont greffées à des souris hôtes (Xin *et al.*, 2007; Sackmann Sala *et al.*, 2017). Par ailleurs, lors de la phase de croissance intensive de l'épithélium à la puberté, plusieurs types de cellules basales progénitrices ont été identifiés. Des cellules basales unipotentes générant uniquement des cellules basales, des cellules bipotentes produisant des cellules basales et luminales, ainsi que des cellules multipotentes générant en plus des cellules neuroendocrines (Ousset *et al.*, 2012). L'étude de l'expression des marqueurs basaux et luminaux exprimés par les cellules différenciées issues d'une même cellule progénitrice (un clone), suggère que les cellules intermédiaires produisent préférentiellement des cellules luminales. En effets ces cellules n'étant pas retrouvées au sein des clones uniquement basaux, cela laisse à penser qu'elles ne se différencient qu'en cellules luminales. Toutefois, la présence de cellules intermédiaires au sein des clones composés à la fois de cellules luminales et basales étant de 25%, cela suggère soit que les cellules basales

possèdent la capacité de se différencier en cellules luminales sans passer par un état intermédiaire, soit que ce dernier n'est que transitoire (Ousset *et al.*, 2012).

Au sein de l'épithélium de souris adulte et mature ayant subi des cycles de castrations-régénérations, certaines cellules luminales sont également en division (English, Santen and Isaacs, 1987; Lawson *et al.*, 2007). Des expériences de traçage cellulaire ont montré que les compartiments luminal et basal de souris s'auto-renouvellent majoritairement de manière indépendante via la division asymétrique de cellules progénitrices unipotentes (Liu *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; Ousset *et al.*, 2012). En 2009, Wang et ses collègues découvrent par traçage cellulaire l'existence d'une population de cellules luminales progénitrices bipotentes dans l'épithélium de souris mature (Wang *et al.*, 2009). Ces cellules, qu'ils appellent CARNs (*castration-resistant Nkx3.1 expressing cells*) expriment le marqueur de cellules progénitrices *Nkx3.1*, sont résistantes à la castration *in vivo* et sont capables de régénérer des structures glandulaires complètes lors de leur implantation dans des souris hôtes. La présence de CARNs au sein de l'épithélium prostatique de souris adultes a été confirmée par d'autres chercheurs (Xie *et al.*, 2017). En revanche s'ils confirment l'indépendance de ces cellules aux androgènes pour leur survie et leur multiplication, leur étude souligne la nécessité du signal androgénique dans la différenciation des CARNs en cellules luminales différenciées.

En 2014, notre laboratoire a réussi à identifier et isoler une population de cellules luminales progénitrices par FACS à l'aide des marqueurs de cellules souche SCA-1 (*Stem cell antigen-1*) et des marqueurs CD49F (Intégrine  $\alpha 6$ ), et Lin (composé des marqueurs CD45, TER119 et CD31) (Sackmann-Sala *et al.*, 2014). Elles ont été appelées LSC<sup>med</sup> par rapport aux intensités des expressions des différents marqueurs Lin<sup>-</sup>, SCA-1<sup>High</sup>, et CD49<sup>med</sup> les distinguant à la fois des cellules luminales (SCA-1<sup>-</sup>/CD49<sup>high</sup>) et basales (SCA-1<sup>+</sup>/CD49<sup>High</sup>). Ces cellules expriment les marqueurs luminaux *Krt8*, *Krt18*, *Krt19*, *Tmprss2*, *Cd24*, mais pas les marqueurs basaux *Krt5*, *Krt14*, *P63* ni les gènes sécrétoires *Pbsn* et *Msmb*. De plus, ces cellules possèdent une signature spécifique composée de 110 gènes comportant notamment les marqueurs *Krt4*, *Psca*, *Wfdc2*, *Pparg*, *Tacstd2*, *Gsta4*, *Tspan8*, *Clu*, *Areg*, *Cyp2f2*, absente des cellules luminales et basales (Sackmann Sala *et al.*, 2017). Les cellules LSC<sup>med</sup> possèdent la capacité de générer des organoïdes *ex vivo* (Sackmann-Sala *et al.*, 2014) ainsi que des structures glandulaires

lorsqu'elles sont injectées dans des souris hôtes (Kwon, Zhang and Xin, 2016; Sackmann Sala *et al.*, 2017). Bien que ces cellules LSC<sup>med</sup> expriment AR, sa localisation est cytoplasmique et leur signalisation androgénique est altérée. Elles sont également androgéno-indépendantes (Kwon, Zhang and Xin, 2016; Sackmann Sala *et al.*, 2017). En effet si elles ne représentent qu'environ 5% de l'épithélium d'une souris sauvage (WT) intacte, cette proportion augmente jusqu'à plus de 20% chez une souris castrée (**Figure 11**) (Sackmann Sala *et al.*, 2017). Ces cellules se distinguent cependant des CARNs par leur absence d'expression de *Nkx3.1*.

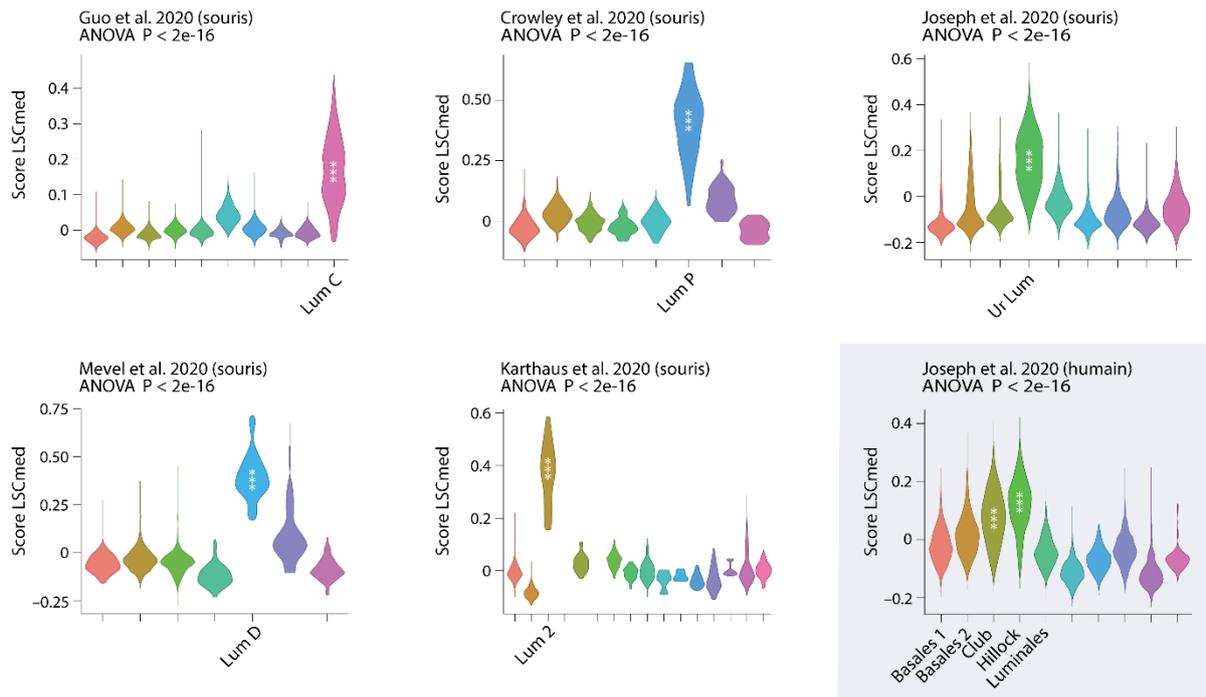


**Figure 11 : Quantification de l'amplification des cellules LSC<sup>med</sup> après castration**

Fenêtre de FACS montrant l'amplification des cellules LSC<sup>med</sup> par tri cellulaire à l'aide des marqueurs CD49f et Sca1 après castration chez la souris sauvage. Les cellules luminales sont CD49f/SCA1-, les cellules basales sont CD49+/SCA1+ et les cellules LSC<sup>med</sup> sont CD49f+/SCA1med. Modifiée de (Sackmann Sala *et al.*, 2017).

Comme décrit précédemment, la démocratisation du scRNAseq a permis à plusieurs équipes de mettre en évidence la diversité du compartiment luminal au sein des épithéliums prostatiques humain et souris, mais surtout de confirmer la présence de cellules luminales ayant des caractéristiques transcriptomiques suggérant leur potentiel progéniteur (Henry *et al.*, 2018; Crowley *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2020; Karthaus *et al.*, 2020; Mevel *et al.*, 2020). Cependant, l'utilisation de différents marqueurs cellulaires, ainsi que les diverses méthodes d'isolation et d'analyses (ensemble des cellules de la prostate, tris en amont des cellules épithéliales EPCAM<sup>+</sup> (*Epithelial Adhesion Molecule*), ou lobe spécifique) par les équipes empêchaient de déterminer s'il s'agissait d'une même population cellulaire et si

cette population pouvait être assimilée aux LSC<sup>med</sup> isolées par FACS. Pour répondre à cette problématique, notre laboratoire a récemment réalisé une étude comparative *in silico* des gènes spécifiquement exprimés par les différentes populations luminales progénitrices murines (Crowley *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2020; Karthaus *et al.*, 2020; Mevel *et al.*, 2020). La comparaison a révélé que la signature LSC<sup>med</sup> est enrichie au sein des différentes populations identifiées (**Figure 12**).



**Figure 12: Enrichissement de la signature LSC<sup>med</sup> au sein des cellules « LSC<sup>med</sup>-like »**

Diagrammes (*violin plots*) représentant l'enrichissement de la signature des cellules LSC<sup>med</sup> dans les sous-populations épithéliales identifiées par scRNAseq dans les prostates de souris et humaines par différentes équipes de recherches. Traduite de (Baures *et al.*, 2022).

De plus elles partagent toutes l'expression de 15 marqueurs, dont *Krt4*, *PscA*, *Cyp2f2*, *Tspan8*, *Gsta4*, *Tacstd2/Trop2* et *Wfdc2*, faisant également partie de la signature LSC<sup>med</sup> (Baures *et al.*, 2022). Ce résultat plaide en faveur de l'hypothèse qu'il s'agirait d'une seule et même population que nous appellerons par la suite "LSC<sup>med</sup>-like" dans un souci d'homogénéité et de simplicité afin de les distinguer des autres cellules luminales progénitrices identifiées par d'autres techniques.

En plus de ces études transcriptomiques sur cellules uniques, différentes équipes de recherche avaient auparavant confirmé chez la souris et le rat, la présence de cellules luminales progénitrices résistantes à la castration. Ces équipes ont indépendamment caractérisé ces cellules via l'expression de différents marqueurs par traçage cellulaire et immunofluorescence. Parmi ces marqueurs, sont recensés *BIM-1*, *TROP2*, *C-KIT*, et *LGR5*, *SCA-1* et *Prom1* (Goldstein *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Kwon, Zhang and Xin, 2016; Yoo *et al.*, 2016; Crowell *et al.*, 2019). L'identification de ces différentes populations n'étant réalisée à chaque fois que par un seul marqueur, les données actuelles ne permettent pas de déterminer avec exactitude s'il s'agit également de cellules LSC<sup>med</sup>-like. Cependant, pour certaines études, les expressions de certains marqueurs partagés avec les LSC<sup>med</sup>-like peuvent apporter des éléments de réponse et argumentent en faveur d'un possible chevauchement partiel entre ces populations. Par exemple les cellules CARBs (Castration-resistant -Bim-1 expressing) et les LSC<sup>med</sup> expriment toutes deux le marqueur *Sox2*, en revanche *Bim1* est moins exprimé dans les LSC<sup>med</sup>. De même, les cellules progénitrices exprimant *TROP2* (codé par le gène *Tasctd2*) expriment aussi *Krt4*, *PscA* et *Cyp2f2* tout comme les LSC<sup>med</sup>, ce qui suggèrent que ces deux populations sont au moins très similaires.

Dans la plupart des études citées, les chercheurs retrouvent principalement ces cellules luminales et basales progénitrices dans les zones péri-urétrales et les invaginations de l'épithélium (Sugimura, Cunha and Donjacour, 1986; Tsujimura *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2005; Xin, Lawson and Witte, 2005; Kwon, Zhang and Xin, 2016; Sackmann Sala *et al.*, 2017; Crowell *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2020). Au vu de la localisation préférentielle des cellules épithéliales progénitrices et des interactions épithélium-stroma observables durant l'embryogénèse, l'hypothèse d'une modulation des propriétés progénitrices de ces cellules par le stroma perdurant à l'âge adulte est plausible. La zone péri-urétrale est constituée d'un stroma plus dense avec une plus forte proportion de fibroblastes que les zones distales (Joseph *et al.*, 2021) maintenant les cellules progénitrices épithéliales en quiescence via l'action paracrine des voies de signalisation TGF $\beta$  et Wnt (Salm *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2019). De plus, des chercheurs ont mis en évidence *ex vivo*, une diminution de la bipotentialité des cellules basales progénitrices lors de la formation de structures sphériques lorsqu'elles

sont cultivées en présence de fibroblastes Sca-1<sup>+</sup>/CD906<sup>-/low</sup> (Kwon *et al.*, 2019), suggérant un rôle modulateur des propriétés progénitrices des cellules épithéliales par le stroma.

Le rôle pivot de la diminution de la signalisation androgénique dans l'émergence des cellules luminales progénitrices lors de la castration se dessine progressivement (Davies and Zoubeidi, 2016; Karthaus *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2022). L'apoptose des cellules androgéno-dépendantes ne peut expliquer totalement l'augmentation de la proportion des cellules luminales progénitrices androgéno-indépendantes dans les prostates de souris castrées. Karthaus et ses collègues montrent par scRNAseq et traçage cellulaire que la baisse du signal androgénique, suite à la castration, entraîne la dédifférenciation de certaines cellules luminales en luminales progénitrices par un phénomène de plasticité cellulaire réversible (Karthaus *et al.*, 2020). C'est-à-dire que ces cellules sont capables de changer d'identité afin de s'adapter aux conditions environnementales et en l'occurrence hormonales. Ces cellules luminales progénitrices sont alors capables de se différencier à nouveau lors d'une stimulation par les androgènes suggérant leur potentielle capacité de régénération de l'épithélium. Cette étude a abouti au renversement définitif du paradigme initial expliquant que la perte du signal androgénique entraîne la mort de toutes les cellules luminales différenciées (English, Santen and Isaacs, 1987).

Dans la prostate humaine adulte, les connaissances sur les cellules épithéliales progénitrices sont plus restreintes, notamment dû à la difficulté d'accès à des tissus sains ainsi qu'aux possibilités réduites de suivi du devenir cellulaire. Cependant plusieurs chercheurs ont réussi à identifier des cellules possédant certaines propriétés progénitrices au sein des compartiments luminaux et basaux. En 2016, une équipe américaine identifie une population luminale caractérisée par la faible expression du marqueur CD38, rappelant par certains aspects les cellules LSC<sup>med</sup>-like trouvées chez la souris (Liu *et al.*, 2016). Premièrement, les cellules CD38<sup>low</sup> ont une capacité plus importante que les cellules luminales CD38<sup>high</sup> à former des structures sphéroïdes. Les cellules CD38<sup>low</sup> isolées par FACS semblent bipotentes car capables de former des structures composées d'une couche de cellules basales et d'une couche de cellules luminales. Elles pourraient également être moins sensibles aux androgènes puisqu'elles expriment plus faiblement la protéine AR et certaines de ses cibles (*Psa*, *Kfbp5*, *et*

*Msmb*) en comparaison aux cellules luminales différenciées (Liu *et al.*, 2016). En ce qui concerne le compartiment basal, une équipe anglosaxonne a identifié en son sein une population progénitrice localisée majoritairement dans la zone de transition de la prostate (Moad *et al.*, 2017). Leur étude tire parti du suivi d'une mutation mitochondriale dans la descendance des cellules progénitrices afin de comprendre non seulement les caractéristiques des cellules mères mais également le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les patterns de transmission de cette mutation permettent de comprendre que l'ensemble des cellules luminales et basales des canaux prostatiques proviennent en grande majorité des cellules basales progénitrices situées dans la zone péri-urétrale. En effet, la division des cellules progénitrices engendre la migration des cellules filles via un flux unidirectionnel (de la zone proximale vers la zone distale) de manière analogue à celui caractérisé dans les cryptes intestinales (Moad *et al.*, 2017). Des cellules progénitrices luminales unipotentes situées le long des canaux comblent quant à elles ponctuellement les besoins de renouvellement de la couche luminale.

Une fois de plus, l'avènement du scRNAseq a permis de corroborer et d'approfondir les hypothèses quant aux équivalences des cellules progénitrices LSC<sup>med</sup>-like chez l'homme (Henry *et al.*, 2018; Crowley *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Karthaus *et al.*, 2020; Mevel *et al.*, 2020). En effet il a été montré que les deux populations luminales Club et Hillock humaines, qui sont préférentiellement localisées dans la zone de transition de la prostate, partagent avec les cellules LSC<sup>med</sup>-like murines (**Figure 12**), l'expression de certains marqueurs comme PSCA (Henry *et al.*, 2018; Baures *et al.*, 2022). Enfin, l'expression du marqueur KRT13, exprimé par les cellules Hillock, qui avait notamment été utilisé pour identifier des cellules ayant des capacités progénitrices dans la prostate humaine (Hu *et al.*, 2017), suggère que ces cellules ont bien des caractéristiques progénitrices.

De manière similaire à l'augmentation de la prévalence relative des cellules progénitrices luminales de souris âgées (Crowell *et al.*, 2019), ces cellules Club et Hillock sont plus abondantes dans des prostates de patients ayant des maladies prostatiques (Joseph *et al.*, 2020). De plus, tout comme l'augmentation de la proportion de cellules progénitrices luminales murines à la suite d'une castration, les cellules Club sont plus abondantes dans des

prostates de patients dont la signalisation androgénique est diminuée à la suite de traitements (Joseph *et al.*, 2021). Par ces analogies avec les cellules LSC<sup>med</sup>-like qui, au contraire des cellules Club et Hillock, ont pu être isolées et caractérisées fonctionnellement quant à leur enrichissement en propriétés progénitrices, les cellules Club et/ou Hillock apparaissent donc comme de potentielles cellules luminales progénitrices dans la prostate humaine.

Ainsi chez l'homme et la souris, il a été identifié différentes cellules basales et luminales progénitrices sans que leurs rôles respectifs au sein de l'homéostasie prostatique ne soient clairement établis. L'étude de ces cellules progénitrices est nécessaire à la compréhension des mécanismes de renouvellement de l'épithélium prostatique mais elle est surtout cruciale à la détermination de leur implication potentielle dans le développement des maladies prostatiques tel que l'hyperplasie bénigne (HBP) mais aussi le cancer de la prostate.

## II. Les pathologies de la prostate humaine

### A. LES PATHOLOGIES BENIGNES

Les symptômes du bas appareil urinaire (SBAU) sont fréquents et généralement associés à des pathologies bénignes non cancéreuses. Ces maladies bien que courantes au sein de la population masculine et affectant la qualité de vie des hommes demeurent un tabou dans notre société actuelle.

#### a) *Les prostatites*

La prostatite est une inflammation de la prostate entraînant l'augmentation transitoire de la glande pouvant provoquer des SBAU et des douleurs pelviennes. La cause est majoritairement infectieuse, et souvent associée à des épisodes fébriles (Litwin *et al.*, 1999). Elle affecte les hommes de tous âges et concerne 9% des hommes souffrant de SBAU (Roberts *et al.*, 1998). Il existe un classement des prostatites en fonction des spécificités cliniques observées chez les patients (*NIH Consensus définition and classification of prostatitis, 1999*).

**La prostatite bactérienne** peut être de deux types : aigüe ou chronique. La prostatite bactérienne aigüe, est une infection entraînant une inflammation soudaine et sévère de la glande qui s'accompagne de douleurs pelviennes et de SBAU (augmentation de la fréquence urinaire nommée pollakiurie, difficulté à la miction nommée dysurie, brûlures mictionnelles...) (uroweb.com). La prostatite aigüe représente 10% des diagnostics de prostatites, et est davantage fréquente chez des patients jeunes (20 à 40 ans) et dans une moindre mesure, chez des patients de moins de 70 ans (Roberts *et al.*, 1998). La prostatite bactérienne chronique se caractérise par des infections récurrentes, généralement par le même organisme (souvent *E.Coli*). Les hommes ayant déjà eu au moins un antécédent ont une probabilité cumulative plus importante subséquente au nombre d'épisodes de prostatites. Cette probabilité est respectivement 20%, 38% et 50% pour les hommes de 40, 60 et 80 ans (Krieger *et al.*, 2009). Elle est souvent associée à une douleur durant les rapports sexuels et à l'éjaculation due à l'infection des voies urogénitales (Krieger *et al.*, 2009). La prostatite chronique a aussi été

montrée comme impactant la fertilité suite à la dégradation de la qualité du sperme (Berg *et al.*, 2021).

**La prostatite chronique** non bactérienne désormais appelée syndrome de douleur pelvienne chronique, associe des inconforts génitaux et pelviens à des symptômes urinaires et des dysfonctions sexuelles. Les causes de cette inflammation ne sont pas connues à l'heure actuelle et elle affecte des hommes de moins de 50 ans (Collins and O'Leary, 1998). Le diagnostic de cette pathologie et l'évaluation du retentissement des symptômes sur la qualité de vie se réalise via un questionnaire d'auto-évaluation réalisé par le patient (*NIH chronic prostatitis symptoms index ou NIH-CPSI*) (Litwin *et al.*, 1999).

**La prostatite inflammatoire asymptomatique**, est par définition une prostatite n'engendrant pas de douleur pour l'homme et peut donc passer inaperçue. Elle est souvent causée par une infection à bas bruit, et est caractérisée par la présence de leucocytes dans les urines (Khan *et al.*, 2017). Elle est souvent diagnostiquée à la suite d'un examen des urines ou un bilan d'infertilité.

Il existe également d'autres types rares de prostatites, qui sont causées par des infections fongiques (Cherasse *et al.* 1997), virales (Doble, Harris and Taylor-Robinson, 1991; Benson and Smith, 1992; McKay *et al.*, 1994) ou à gonocoque (Danielsson *et al.* 1971). Elles se retrouvent généralement chez des patients avec une exposition à risque d'infections sexuellement transmissibles, ou des patients immunodéprimés (Fuse *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2017).

Parmi l'éventail de traitements actuels de la prostatite est choisie un traitement ou une combinaison de traitement ciblant l'agent pathogène et/ou les symptômes affectant le patient. Ces infections bien que bénignes peuvent se révéler dangereuses si elles ne sont pas traitées, car non soignées elles peuvent mener à un sepsis sévère.

b) *L'hyperplasie bénigne de la prostate*

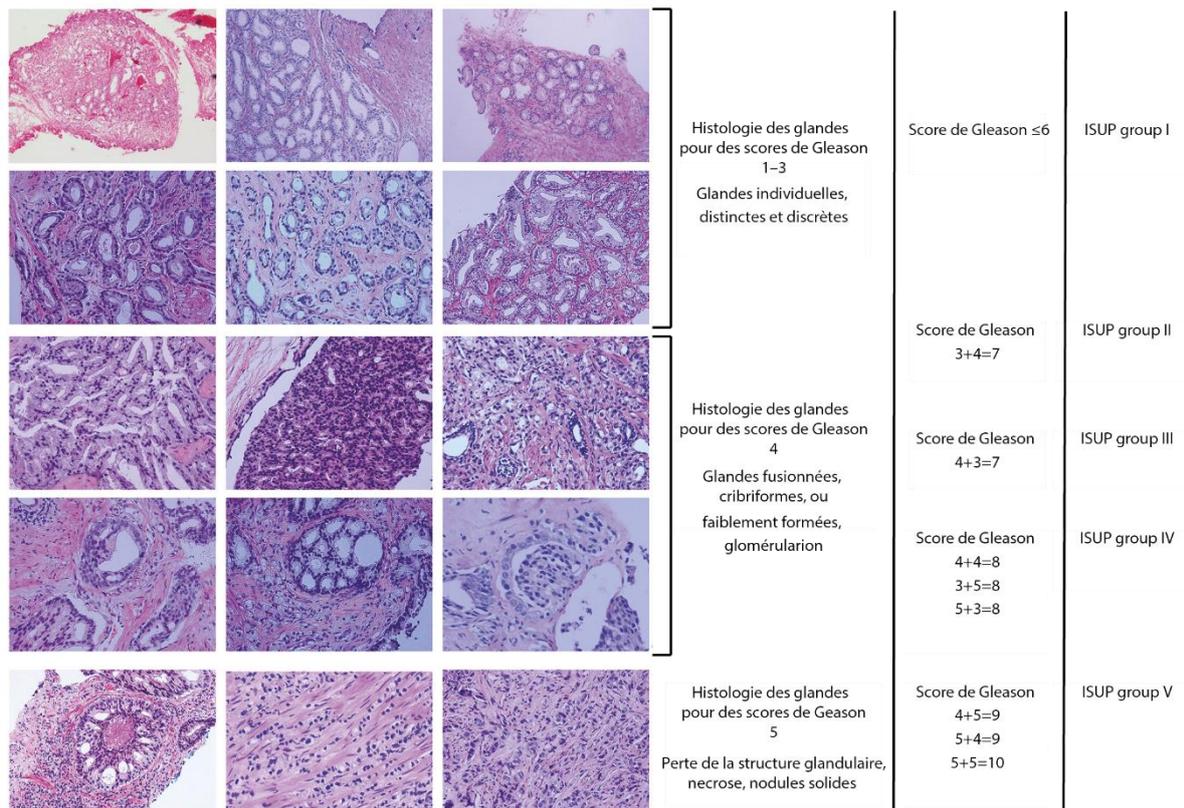
L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est une pathologie fréquente liée à l'âge et qui se caractérise par des SBAU engendrés par une hypertrophie de la zone proximale de la prostate. Cette hypertrophie engendre un rétrécissement du calibre de l'urètre et provoque des symptômes mictionnels conséquents à l'obstruction et à l'irritation de celui-ci. La plupart des mammifères possède une prostate, mais étonnamment seuls les hommes, les chimpanzés et les chiens sont connus pour développer de l'HBP en vieillissant (De Marzo, Nelson and Coffey, 1998 ; Untergasser, Madersbacher and Berger, 2005). Le chapitre III propose un état de l'art sur les connaissances scientifiques actuelles de cette maladie.

## B. LE CANCER DE LA PROSTATE

Le cancer de la prostate (CaP) est le deuxième cancer le plus diagnostiqué et la neuvième cause de mortalité par cancer chez les hommes dans les pays occidentaux (Bray *et al.*, 2018). Un homme sur sept développera un CaP au cours de sa vie (Siegel, Miller and Jemal, 2016). En 2018, l'incidence atteignait près de 1 300 000 nouveaux cas à travers le monde, et 350 000 décès. Le principal facteur de risque est l'âge puisque l'incidence de détection du CaP déterminée à partir d'une cohorte autopsique rétrospective est de 7,5% chez les moins de 55 ans et augmente graduellement jusqu'à atteindre 72,8% entre 55 et 75 ans (Cancer Stat Facts - NIH). Les autres facteurs de risque sont les antécédents familiaux, la prédisposition héréditaire et l'origine ethnique. Enfin, l'exposition à certains pesticides ainsi que le style de vie occidental et la sédentarisation favorisant l'apparition d'un syndrome métabolique sont également des facteurs de risque putatifs du CaP (Abate-Shen and Shen, 2000). En revanche, il n'y a pas d'évidence à ce jour que l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) puisse favoriser la survenue du cancer (Shah *et al.*, 2021).

Le CaP prend son origine par ailleurs principalement dans la zone périphérique, avec seulement 20% des cancers qui se développent dans la zone transitionnelle entourant l'urètre (Harry A., Guess 2001), qui est surtout le site de développement préférentiel de l'HBP. C'est pourquoi dans la majorité des cas, le CaP est asymptomatique dans les phases précoces de son développement, à la différence de l'HBP. L'histologie la plus fréquente est l'adénocarcinome, c'est-à-dire que la prolifération tumorale se développe à partir des cellules épithéliales des glandes prostatiques. Ce sont en général des cancers de bon pronostic puisque le taux de survie à 10 ans des formes localisées est de plus de 90% après traitement curatif. Durant ces phases précoces, le cancer est majoritairement détecté dans le cadre du dépistage. En France, le dépistage n'est pas généralisé mais consiste en une détection précoce individuelle par un dosage du PSA à partir de 50 ans, associé à un toucher rectal. Une augmentation du PSA ou la palpation d'un nodule motive la réalisation d'une IRM associée ou non à des biopsies permettant le diagnostic histologique.

Le diagnostic est confirmé par l'analyse histologique des biopsies (12 biopsies de cartographie réparties sur l'ensemble de la prostate, et au moins 3 biopsies ciblées dans la zone suspectée tumorale en cas de visualisation d'une image suspecte à l'IRM). Afin de prendre au mieux en charge le patient et d'adapter les traitements, une évaluation du grade tumoral histologique (score ISUP depuis 2014, anciennement score de Gleason) est réalisée par le pathologiste et elle permet de juger de l'agressivité du cancer (**Figure 13**) (Epstein *et al.*, 2016).



**Figure 13 : Planche d'évaluation du score de Gleason**

Le score ISUP actuel classe les cancers de 1 à 5 (ou *Grade Groups* de I à V). Plus le score est élevé plus le cancer sera considéré agressif et à risque de récurrence après traitement. Ce score reprend les paramètres du score de Gleason mais simplifie les grades. Les cancers de la prostate atteignant souvent plusieurs zones (multifocal), le score historique de Gleason est obtenu par l'addition des scores des 2 foyers tumoraux les plus représentés sur la biopsie (le premier chiffre indiqué correspond au contingent tumoral le plus représenté). Ainsi un score de Gleason 6 correspond à un cancer de grade 1 avec la nomenclature ISUP, un score 7 (3+4) à un grade 2, un score 7 (4+3) à un grade 3, un score 8 à un grade 4, et les scores 9 et 10 à un grade 5. Modifiée d'après (Ni Chen & Qiao Zhou 2016).

Dans la zone cancéreuse, les glandes prostatiques sont souvent fusionnées et de petite taille, leurs structures sont désorganisées et les glandes peuvent perdre leur lumière suite à la prolifération des cellules tumorales. La couche basale n'est plus détectée par les marquages immunohistochimiques spécifiques des cellules basales (KRT5 et P63).

L'extension de la maladie est évaluée par la classification TNM (*Tumor, Nodes & Metastasis*) qui tient compte de la dissémination des cellules cancéreuses. On distingue ainsi les tumeurs localisées et confinées à l'organe prostatique (avec atteinte d'un ou plusieurs lobes prostatiques) des tumeurs localement avancées (franchissement de la capsule prostatique, présence de cellules cancéreuses dans les ganglions du pelvis) ou métastatiques (atteintes d'organes extra-pelviens comme les os ou les viscères).

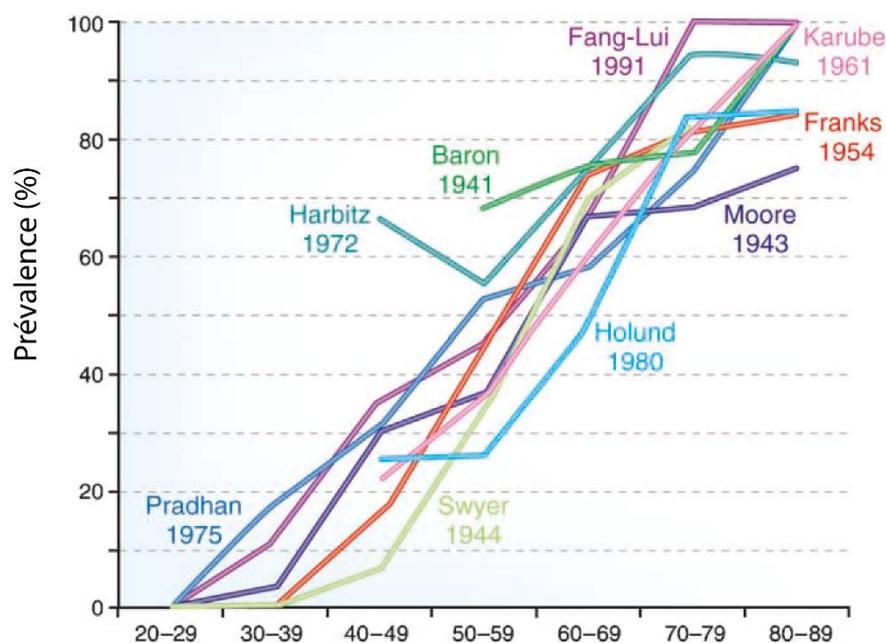
En fonction de la sévérité du cancer, du PSA sanguin, des fonctions urinaires et sexuelles du patient et de son âge et espérance de vie, une stratégie thérapeutique individualisée sera proposée au patient (Ploussard et al. 2022, recommandations françaises sur le CaP localisé). Il peut s'agir d'une hormonothérapie palliative en cas de forme étendue ou d'un traitement curatif radical au stade localisé comme la radiothérapie (irradiation de la prostate en place) ou l'ablation de la glande par prostatectomie radicale (Rebello *et al.*, 2021), avec chacune des conséquences fonctionnelles urinaires et sexuelles. Pour les cancers à faible risque de progression, une stratégie de surveillance active est proposée et consiste à doser régulièrement le PSA et à réévaluer le CaP par IRM, en différant au maximum un traitement radical. Dans les cas de cancer localisé à plus haut risque de progression, la prostatectomie radicale associée ou non à la radiothérapie complémentaire (pour éliminer les cellules cancéreuses restantes) peut être privilégiée chez les patients jeunes, alors qu'une radiothérapie avec hormonothérapie concomitante est proposée en alternative chez des patients plus âgés. Enfin l'hormonothérapie sans chirurgie locale est réservée aux patients avec un CaP métastatique.

L'hormonothérapie du CaP a pour objectif final d'empêcher l'activation de la voie de signalisation androgénique afin de réduire la croissance des cellules cancéreuses prostatiques ou métastatiques, qui sont dépendantes du récepteur aux androgènes et de la testostérone circulante (produite par les testicules et les surrénales).

### III. L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)

#### A. EPIDEMIOLOGIE, SYMPTOMES ET DIAGNOSTIC DE L'HBP

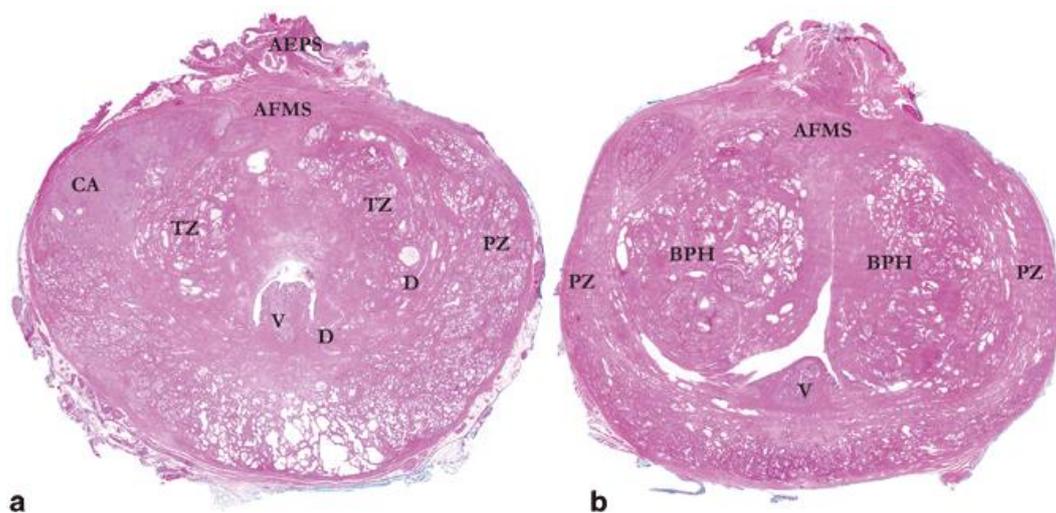
L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est une pathologie fréquente chez l'homme de plus de 50 ans. Elle affecte 50% des hommes à partir de 50 ans et jusqu'à 90% des hommes à l'âge de 90 ans (**Figure 14**). Elle se caractérise par une augmentation du volume de la glande au niveau de la zone de transition (**Figure 15**), ce qui comprime l'urètre et peut engendrer des SBAU. En effet si une prostate saine pèse moins de 30g à la puberté, la prostate grossit par contre au cours de la vie. Cependant, certains hommes ayant des troubles légers ne sont pas gênés entraînant de manière probable une sous-évaluation de la prévalence de cette pathologie, car ce sont en effet les répercussions de ses symptômes qui motivent les visites médicales.



**Figure 14: Prévalence de l'HBP histologique par groupe d'âge**

Représentation de la prévalence de l'HBP en fonction de l'âge des patients selon différentes études réalisées sur des autopsies entre 1941 et 1991. Figure Modifiée d'après (Roehrborn, 2008)

Les SBAU associés à l’HBP se manifestent suite à deux problématiques : l’obstruction de l’urètre entraînant un rétrécissement de son calibre, et son irritation causée par le passage plus difficile des urines au travers de celui-ci (voir **Figure 15**). Il existe des symptômes dit de la phase de remplissage et des symptômes de la phase de vidange. Les SBAU liés à la phase de vidange (syndrome dysurique) sont : la diminution du volume et la force du flux urinaire, le retard au démarrage de la miction, les jets intermittents, les gouttes retardataires, et la sensation de vessie non vidée. Les SBAU davantage liés la phase de remplissage sont : l’augmentation de la fréquence urinaire durant la journée (pollakiurie diurne), les besoins impérieux (ou urgenteries), et les besoins nocturnes (nycturie). En plus de ces SBAU, l’HBP engendre parfois des troubles sexuels comme des difficultés à l’éjaculation. Ces différents symptômes souvent tabous, ont un impact sur la vie sociale, sexuelle, ainsi que sur la qualité du sommeil, dégradant la qualité de vie générale des patients.



**Figure 15: Coupes transversales de prostate humaine non hyperplasique et d’HBP**

Coupes transversales de prostate humaine non hyperplasique (a) vs HBP (b) colorées à l’hématoxyline et à l’éosine. TZ : zone de transition, PZ : zone périphérique, V : *verumontanum*, D : canaux allongés, CA : nodule cancéreux, AFMS : zone antérieure fibromusculaire, AEPS : zone extra-prostatique, BPH : adénome d’hyperplasie bénigne. Modifiée d’après basicmedicalkey.com.

Ce sont généralement ces symptômes qui motivent les patients à se rendre chez un urologue pour poser un diagnostic et bénéficier d’un traitement. L’évaluation de l’importance des symptômes s’effectue par différentes approches. En premier lieu, un questionnaire d’auto-

évaluation des symptômes comme l'IPSS (*International Prostate Symptom Score*) est proposé aux patients afin de quantifier les symptômes, et suivre leur régression ou leur progression au cours du traitement. L'IPSS est composé de 7 questions dont les réponses donnent chacune une valeur comprise entre 0 et 5. Une fois les valeurs des réponses additionnées, un score est obtenu. Un score de 0 signifie que l'HBP est asymptomatique, un score compris entre 1 et 7 que les symptômes sont légers, 8 à 19 qu'ils sont modérés et de 20 à 35 qu'ils sont sévères. Il existe également d'autres tests d'auto-évaluations comme le AUA-SI (*American Urological Association Symptom Index*) (Barry et al., 1992), le DAN-PSS (*Danish Prostate Score*) ou encore le *Boyersky Symptom score* se basant sur des questions et une approche scorée similaire. L'IPSS est néanmoins le score le plus utilisé dans le monde, à la fois dans les soins courants, et pour la recherche clinique. L'urologue peut également réaliser une débitmétrie pour objectiver une dysurie. Une analyse très précise du rapport débit urinaire / pression intra-vésicale per-mictionnelle, nécessitant la pose d'une sonde, n'est que très peu réalisée due à son caractère invasif (diagramme d'Abraham-Griffit]. Le clinicien peut également évaluer le volume prostatique (entre 30 et 50 ans il est de 25mL +/- 19mL) et le volume résiduel post-mictionnel par échographie. Une fois collectés, l'ensemble de ces paramètres associés ou non à l'analyse des urines vont pouvoir permettre à l'urologue de suspecter une HBP et d'en faire le bilan initial. Le diagnostic d'une HBP repose donc sur un faisceau d'arguments cliniques et para-cliniques.

## B. FACTEURS DE RISQUE ET COMORBIDITES DE L'HBP

L'âge est le facteur de risque principal de développement de l'HBP mais il existe aussi d'autres facteurs secondaires, parmi lesquels figure en seconde place la présence des androgènes dans la circulation sanguine. Plus récemment, les scientifiques ont également mis en lumière la présence de diverses comorbidités associées l'HBP.

### a) *Les modifications hormonales*

Si les hommes castrés ne développent pas d'HBP en vieillissant (Wilson and Roehrborn, 1999), des taux sanguins élevés de testostérone sont en revanche associés à une diminution du risque de développer de l'HBP (Kristal, Schenk, *et al.*, 2008). La testostérone prostatique reste relativement identique entre des hommes atteints d'HBP et les hommes jeunes, cependant au cours du vieillissement physiologique, la testostérone plasmatique diminue progressivement à partir de 40 ans (Gray *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 2004), coïncidant avec la survenue des premiers cas d'HBP. La testostérone ayant un effet pro-prolifératif pendant les phases de développement de la prostate, mais antiprolifératif après la puberté, ces divergences d'effets expliquent certainement en partie les résultats discordants des effets androgéniques au cours de la vie.

Gary et ses collègues confirment la diminution de la testostérone au cours du temps entre 39 et 70 ans, mais constatent également celles des autres androgènes : androsténediolte (0.8%/an), l'androstane diolé glucuronide (0.6%/an), et l'androgène des glandes surrénales le dehydroepiandrosterone (3.1%/an). En ce qui concerne l'axe gonadotrope, ils montrent que la FSH (*Follicle stimulating hormone*) et la LH (*Luteinizing Hormone*) augmentent respectivement de 1.9% et 0.4% par an (Gray *et al.*, 1991) par effet rétro-contrôle, témoignant d'une diminution progressive de la production d'androgènes testiculaires, liée à l'âge. De plus, la dérégulation de la pulsativité de sécrétion de la glande pituitaire a été mise en évidence chez l'homme âgé, celle-ci présentant une fréquence de pulsation plus importante de LH, mais ses pulsations sont d'amplitude plus faible en comparaison à des jeunes hommes (Mulligan *et al.*,

1999). Cependant si la restauration de la pulsativité de la glande pituitaire, via l'infusion de GnRH/LHRH, n'augmente pas la concentration de testostérone chez les hommes âgés, ceci s'explique probablement par une fatigue des cellules testiculaires de Leydig. Plus récemment, des chercheurs ont également montré une dérégulation de l'activité de l'hypothalamus chez les hommes âgés. La sécrétion pulsatile de GnRH/LHRH augmente irrégulièrement en termes de fréquence puis diminue en amplitude au cours du vieillissement (Wang et al., 2021).

Concernant les œstrogènes, Roberts et ses collègues ont montré que le ratio œstradiol/testostérone augmente au cours du temps passant de 0.042 chez les hommes de moins de 60 ans à 0.044 de 60 à 69 ans à 0.050 chez les plus de 69 ans (Roberts *et al.*, 2004). De plus, ils ont montré une corrélation positive entre le niveau d'œstradiol et la taille de la prostate dépendante du niveau de testostérone sérique. Ainsi, lorsque le niveau de testostérone est au-dessus de la médiane, l'œstradiol est positivement corrélé avec la taille de la prostate. En revanche lorsque le niveau est plus bas, ils n'observent plus cette corrélation. Certaines équipes confirment l'augmentation de ce ratio malgré l'observation d'une diminution d'œstradiol sérique (Liao *et al.*, 2012).

#### b) *Le syndrome métabolique*

Le syndrome métabolique se caractérise par la présence d'un ensemble de signes cliniques (dyslipidémie, hypertension, cholestérol, surpoids...) qui accroissent le risque de développer des maladies cardiovasculaires, du diabète de type 2 et la survenue d'accidents vasculaires cérébraux. Le syndrome métabolique, étant lui-même associé à une forte composante inflammatoire, est un facteur de risque de développer de l'HBP. En effet, le volume prostatique des patients obèses et/ou diabétiques augmente plus rapidement que celui des patients sans trouble métabolique associé (Högstedt, 1999 ; Ozden *et al.*, 2007 ; Hammarsten and Peeker, 2011). De plus, les données montrent que les patients avec une évolution rapide de l'HBP quantifiée par l'augmentation du volume prostatique, ont une insulïnémie à jeun et une hypertension supérieure aux autres patients. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : une action directe de l'insuline sur les cellules prostatique induisant leur prolifération (Barnard et al., 2002), ou une action indirecte via la stimulation hépatique de la

sécrétion d'IGF, un facteur de croissance puissant (Giovannucci et al., 2003). La dérégulation des hormones sexuelles induite par le syndrome métabolique fait toujours débat mais pourrait participer également à la création d'un terrain hormonal propice au développement de l'HBP (Cannarella, 2021).

### c) *La génétique et le régime alimentaire*

Contrairement au cancer de la prostate, il n'y a pas de mutation génétique associée à l'HBP (Liu et al., 2020). En revanche en utilisant des données de l'étude HPFS (pour *Health Professionals Follow-up study*), des chercheurs ont identifié un polymorphisme de répétition au sein du gène *AR* qui est associé à un risque plus faible de développement d'HBP chez les hommes porteurs (Montgomery, Price and Figg, 2001; Mononen et al., 2002). La présence de répétition du nucléotide CAG au sein du premier exon de *AR* lui confère une activité de transcription plus élevée. Les hommes ayant 25 copies ou plus de ce nucléotide ont moins de risque de développer une HBP en comparaison à des hommes qui ont 19 copies ou moins (Giovannucci et al., 1999).

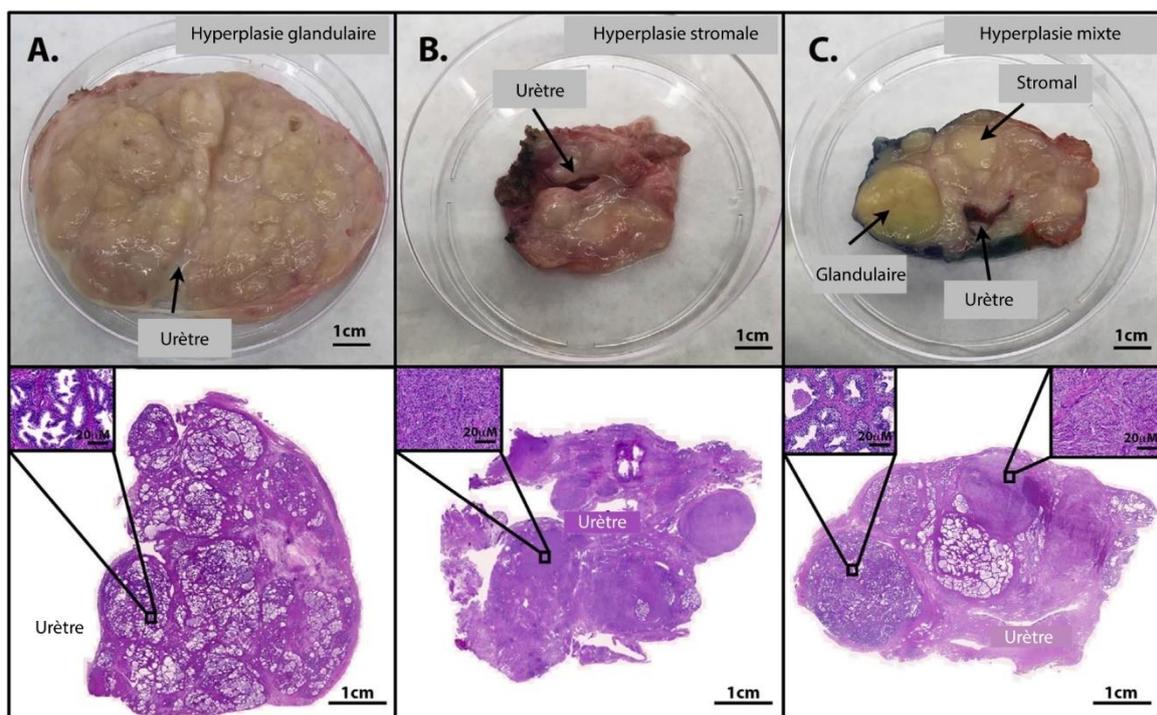
Il a été rapporté que l'appartenance à certaines ethnies était positivement ou négativement associé avec le risque d'avoir une HBP. En effet, la prévalence de l'HBP est plus élevée chez les populations africaines que chez les caucasiens, qui est elle-même plus élevée que chez les asiatiques (Kaplan et al., 1998; Fowler et al., 1999). Les prévalences de développement de l'HBP à travers ces différentes ethnies pourraient s'expliquer d'une part par l'implication de certains polymorphismes plus ou moins présents dans une population mais également par le style de vie et les habitudes alimentaires (Lim, 2017).

En effet un régime riche en gras, en produits laitiers ainsi qu'en viande rouge est suspecté d'augmenter la probabilité de développer une HBP. Au contraire, l'apport en légumes vert ainsi qu'une supplémentation en vitamine D serait eux associés à une plus faible probabilité de développement d'HBP (Kristal, Arnold, et al., 2008). En effet dans une récente étude clinique, une supplémentation en vitamine D de 6 mois est associée à un plus faible score IPSS ainsi qu'un plus petit volume prostatique comparé à un placebo (Zendehdel et al., 2021). Enfin

comme pour beaucoup de maladies inflammatoire et chroniques, la sédentarité est associé à un plus forte probabilité de développer une HBP (Kristal, Arnold, *et al.*, 2008; Lim, 2017).

### C. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HBP

L'HBP est premièrement caractérisée par une hypertrophie de la zone de transition encerclant l'urètre (Deming en 1939 and Moore en 1943). Cette hypertrophie est due à une prolifération accrue des cellules épithéliales et stromales composant la zone. Elle peut être soit due à la prolifération de l'épithélium (hypertrophie glandulaire), soit à la prolifération du stroma (hyperplasie stromale), ou bien elle peut également être mixte et comporter aussi bien des nodules glandulaires que des nodules stromaux (voir **Figure 16**) (Henry *et al.*, 2017).



**Figure 16: Les différents types d'HBP chez l'homme**

Prostates humaines comportant différents types d'hyperplasie (photos en lumière blanche) et sections de celles-ci colorées en hématoxyline et éosine (A-C). A) hyperplasie glandulaire caractérisée par une prolifération accrue des cellules épithéliales, B) hyperplasie stromale caractérisée par une prolifération des cellules fibroblastiques, et C) hyperplasie mixte comportant des nodules d'hyperplasie glandulaire ainsi que des nodules d'hyperplasie stromale. Traduite de (Strand *et al.*, 2017).

Plusieurs équipes reportent également dans 8% des HBP, la présence de quelques foyers hyperplasiques uniquement dues à une prolifération accrue des cellules basales (Cleary, 1983; Thorson *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2017). Ces foyers sont constitués d'amas de petites cellules avec un compartiment cytoplasmique réduit et un noyau ovoïde dont la chromatine est finement dispersée. Ils peuvent représenter 10% à 60% de la surface analysée. En étudiant ces foyers par RNAseq, Henry et ses collègues montrent que ces cellules possèdent un enrichissement dans l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes dont les cytokératines KRT1, KRT4, KRT6A et KRT6B.

Ce remodelage tissulaire est accompagné d'une calcification des sécrétions glandulaires, de l'inflammation, une infiltration immunitaire, ainsi qu'un plus fort tonus musculaire. Nous allons aborder au cours de ce chapitre les différentes caractéristiques de cette pathologie dont l'étiologie est, malgré les nombreux efforts de la communauté scientifique, toujours mal comprise. Les différents types histologiques d'HBP complexifient également davantage les difficultés de recherche de cette pathologie déjà multifactorielle. Nous évaluerons également comment les modulations tissulaires des prostates vieillissantes humaines et souris peuvent éclairer quant aux changements pouvant contribuer à la mise en place progressive d'un environnement propice au développement de l'HBP et des SBAU.

#### a) *Hyperprolifération de l'épithélium luminal*

Les épithéliums prostatiques des souris âgées arborent une expansion des cellules luminales progénitrices (Crowell *et al.*, 2019). Ces cellules sont non seulement plus nombreuses, mais gardent également toutes leurs facultés prolifératives et de différenciation. En effet, ces cellules marquées par l'expression de TROP2<sup>+</sup> forment davantage de structures sphéroïdes que leurs contreparties TROP2<sup>-</sup>. De plus, les structures formées sont plus grosses traduisant une capacité proliférative plus importante (Crowell *et al.*, 2019). De manière intéressante, Crowell et ses collègues retrouvent également des cellules TROP2<sup>+</sup> en plus grand nombre dans des prostates d'hommes souffrant d'HBP. D'autres études retrouvent également davantage de cellules Club et Hillock (partageant des similarités avec les TROP2<sup>+</sup>) au sein des prostates d'hommes âgés ou de patients souffrant d'HBP (Crowell *et al.*, 2019; Joseph *et al.*, 2020; Yan

*et al.*, 2022). De plus, dans le cas de patients HBP traités par des inhibiteurs de 5 $\alpha$ -réductases (5ARI) diminuant le signal androgénique dans la prostate, la proportion de ces cellules est encore plus importante (Joseph *al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022). Par ailleurs, une analyse GSVA (pour *Gene set variation analysis*) montre un enrichissement des voies de signalisation Notch et WNT impliquées dans le développement embryonnaire prostatique au sein des populations Club et Hillock présentes dans les prostates d'hommes âgés pouvant traduire une implication dans le développement de l'HBP (Yan *et al.*, 2022).

Dans les prostates d'hommes âgés, des chercheurs constatent une plus forte hétérogénéité cellulaire que chez des prostates d'hommes jeunes. Ils retrouvent également une proportion de cellules luminales plus importante et à l'inverse moins de cellules basales (Yan *et al.*, 2022). Parmi ces cellules luminales, Yan et ses collègues montrent qu'il existe quatre sous-populations identifiées par l'expression spécifique de différents marqueurs et qui sont réparties préférentiellement au sein des zones de la prostate. Ces quatre sous-populations sont les luminales KLK3<sup>+</sup> (*Kallikrein related peptidase 3*) ayant une forte activité androgénique et sécrétoires, les TFF3<sup>+</sup> caractérisées par leur réponse aux œstrogènes et l'enrichissement de la voie de signalisation MYC, les cellules IDH1<sup>+</sup> (*Isocitrate dehydrogenase*) et LTF<sup>+</sup> (*Lactotransferin*) dans lesquelles ils retrouvent certains marqueurs de cellules souches ainsi que des acteurs pro-inflammatoires. De manière intéressante, même si la sous-population KLK3<sup>+</sup> est davantage retrouvée en zone périphérique, les gènes associés à la réponse aux œstrogènes, à l'inflammation et aux capacités progénitrices sont davantage exprimés dans la zone de transition. En revanche les gènes associés à la réparation de l'ADN, à la voie de signalisation androgénique sont davantage exprimés dans la zone périphérique.

Si les proportions des différentes cellules épithéliales varient avec l'âge, leurs signatures transcriptomiques aussi. Au cours du vieillissement, l'épithélium de souris (cellules basales, luminales et luminales progénitrices) partage une signature commune particulière. En effet, comparées à des cellules issues de souris jeunes, les cellules épithéliales prostatiques de souris âgées surexpriment certains gènes. Ils sont notamment impliqués dans le métabolisme du glutathion et dans la réponse au stress oxydant, ainsi que dans le métabolisme glycolytique. Par ailleurs, l'expression des gènes associés au métabolisme lipidique est au contraire

diminuée (Crowell *et al.*, 2020). Ces mêmes chercheurs retrouvent, chez l'homme, l'expression de certains gènes surexprimés dans l'épithélium de souris âgée, également amplifiés dans des tumeurs prostatiques, traduisant une association entre l'expression d'une signature du vieillissement et les maladies liées au vieillissement. Ces changements transcriptionnels traduisent de nouveaux besoins cellulaires dues aux changements environnementaux, notamment une augmentation du stress oxydant. L'augmentation du stress oxydant dans l'HBP fera l'objet d'un chapitre dédié (Chapitre **IV**).

La proportion plus importante des cellules Club et Hillock au sein de l'HBP qui ont comme caractéristiques d'être indépendantes aux androgènes (Joseph *et al.*, 2021) et d'exprimer des gènes de cellules progénitrices (Yan *et al.*, 2022) soutient la théorie de Mc Neal (Mc Neal, 1978) sur le réveil des processus de développement prostatique pour expliquer l'HBP (Selman, 2011). L'apparition d'une signature du vieillissement pro-inflammatoire combinée à une diminution de la testostérone circulante favorise certainement la prolifération épithéliale dans cette zone, participant à l'hyperplasie prostatique.

#### *b) Hyperprolifération du stroma*

Le stroma composant les prostates de souris âgées est plus dense cellulièrement que celui des souris jeunes (Bianchi-Frias *et al.*, 2010; Crowell *et al.*, 2019). Chez l'homme le stroma prostatique est composé majoritairement de deux types de fibroblastes : les fibroblastes interstitiels et les myofibroblastes (Henry *et al.*, 2018; Joseph *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022). Des analyses d'expressions géniques différentielles révèlent un enrichissement des voies de signalisation modulant l'inflammation dans les deux populations de fibroblastes, comme la voie interféron (Bianchi-Frias *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2022). De plus, ils constatent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire (ECM) ainsi que des facteurs de croissances par les fibroblastes interstitiels (Yan *et al.*, 2022). Au sein des myofibroblastes, chez les hommes âgés, les voies de signalisation associée à la formation de fibres sont activées. Dans la zone de transition, le stroma y est plus dense et l'expression de certaines interleukines et chimiokines y est plus importante (CXCL12, IL6, SOCS3) (Crowell *et al.*, 2020). Les chercheurs constatent également une augmentation des

facteurs pro-prolifératifs comme NRP1, NRP2 (*Neurolipins*) et FGF10 ainsi qu'une expression plus forte des ligands spécifiques de la voie de signalisation NOTCH (impliquée dans le développement embryonnaire), comme DLL1 et JAG1 dans les fibroblastes de la zone de transition comparée à la zone périphérique (Yan *et al.*, 2022).

L'inflammation des glandes de la prostate augmente la production de FGF et de TGF- $\beta$ 1 par les cellules de l'épithélium, participant à la prolifération des cellules stromales, leur transdifférenciation ainsi que la surproduction de matrice extracellulaire. En retour, le stroma activé émet également quelques cytokines pro-proliférantes stimulant l'épithélium prostatique (Schauer, Ressler and Rowley, 2009; Schauer and Rowley, 2011; Joseph *et al.*, 2021).

#### c) *Calcification des sécrétions prostatiques*

Le remodelage tissulaire observé dans l'HBP est également caractérisé par la présence de granules sécrétoires amyéliniques et de calculs prostatiques contenant des sels de phosphates de calcium, de magnésium et de potassium (Fox, 1963; Vilches *et al.*, 1982). La calcification des corps amyloïdes ou la précipitation peuvent obstruer les canaux provoquer l'inflammation des glandes. Des recherches complémentaires sont nécessaires à l'amélioration des connaissances de la composition du liquide prostatique, de la calcification des sécrétions ainsi que sur les processus inflammatoires chroniques liés à ces problématiques.

#### d) *Inflammation de la prostate*

La prostate saine possède de rares cellules immunitaires résidentes (Fox *et al.*, 2019; Crowley *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Karthaus *et al.*, 2020; Tuong *et al.*, 2021) et cette population se retrouve renforcée dans l'HBP via notamment une infiltration de lymphocytes T, de cellules NK et de macrophages dans le stroma et l'épithélium prostatique (Di Silverio *et al.*, 2003; Nickel *et al.*, 2008; Robert *et al.*, 2009; Crowell *et al.*, 2019). Des chercheurs ont noté une corrélation entre l'importance de l'infiltration immunitaire dans la prostate et le risque de progression de l'HBP (Torkko *et al.*, 2015). L'inflammation de la glande est consécutive à diverses caractéristiques dont la chronologie n'est pas encore bien élucidée. L'inflammation

est stimulée par la calcification des sécrétions prostatiques, une élévation du stress oxydant ainsi que par une sécrétion de cytokines et chimiokines attractantes sécrétées par les cellules épithéliales et stromales. La corrélation entre le stress oxydant et l'ampleur de l'HBP de manière sera plus approfondie dans le chapitre **IV.C**.

Chez l'homme âgé, les cellules immunitaires sont plus petites et plus nombreuses que dans les prostates d'hommes jeunes (Yan *et al.*, 2022) traduisant certainement un changement du micro-environnement lors du processus de vieillissement (Crowell *et al.*, 2020). La zone de transition voit sa population de lymphocytes T, de macrophages et de NK augmenter contrairement à la zone périphérique qui comporte davantage de cellules immunitaires résidentes. De plus, les cellules immunitaires de la zone de transition ont une réponse inflammatoire plus forte que celles de la zone périphérique (Yan *et al.*, 2022). Certaines études ont trouvé que l'inflammation promeut les capacité progénitrices. De manière intéressante, ces mêmes chercheurs trouvent davantage d'interactions entre les cellules immunitaires et les cellules Club et Hillock qu'avec les autres types cellulaires épithéliales. Ces interactions pourraient également participer à l'amplification de cellules Club et Hillock dans l'HBP.

*e) Augmentation du tonus fibromusculaire*

L'HBP est également caractérisée par un fort tonus fibromusculaire, qui est la cible de certains traitements symptomatiques de l'HBP (alpha-bloquants). En effet, cette augmentation du tonus fibromusculaire peut s'expliquer par un défaut d'innervation de la prostate par le système nerveux autonome conduisant à une diminution de la relaxation musculaire ainsi qu'à une augmentation du tonus adrénergique (Untergasser, Madersbacher and Berger, 2005). Par ailleurs, dans les zones hyperplasiques, le stroma est moins riche en collagène et les cellules musculaires lisses sont désorganisés (Bianchi-Frias *et al.*, 2010).

*f) « Etiologie » de l'HBP*

L'HBP est une maladie multifactorielle, dont les caractéristiques physiopathologiques sont intimement reliées rendant la compréhension de son étiologie compliquée. Il est possible que différents scénarios conduisent au développement de cette pathologie. En raison des fortes

interactions entre le stroma et l'épithélium durant le développement de la prostate, Mc Neal envisageait que le processus physiopathologique de l'HBP résulte d'un réveil des voies du développement (Brennen and Isaacs, 2018). Nous avons vu que cette théorie est toujours d'actualité au vu de l'expression de certaines voies impliquées dans le développement prostatique par l'épithélium et le stroma âgés. Aussi, le vieillissement est souvent caractérisé comme un état inflammatoire global, pouvant certainement préparer un environnement propice au développement de l'HBP. Nous notons également le rôle pivot de la signalisation androgénique dans le développement de cette pathologie. Les androgènes sont non seulement liés à la plasticité des cellules luminales mais également à l'inflammation puisque les traitements anti-androgéniques dans le cadre de l'HBP ou d'un cancer augmentent l'inflammation dans la prostate (Maggio *et al.*, 2006; Sorrentino *et al.*, 2011).

#### D. LES TRAITEMENTS ACTUELS DE L'HBP

##### a) *Approches médicales*

Il existe différentes stratégies thérapeutiques dans le cadre d'une prise en charge des SBAU liés à l'HBP. La sévérité des symptômes urinaires, l'âge du patient, sa sexualité et ses comorbidités vont guider le médecin vers la stratégie de traitement la plus adaptée à proposer.

En Europe, de 2004 à 2008, le nombre annuel de prescriptions médicamenteuses pour HBP était de 11,6 millions pour 74 millions de personnes à risque. L'indice global de prescription a augmenté dans tous les pays et a été trois fois plus important dans les pays du Sud que dans ceux du Nord (Cornu *et al.*, 2010).

**Les alpha-bloquants** sont considérés comme la stratégie thérapeutique symptomatique de l'HBP, et sont généralement prescrits comme traitement de première ligne. Leur action vise à relaxer la prostate et l'urètre prostatique, notamment via l'inhibition des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques situés à la surface des cellules musculaires lisses, bloquant le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique et *in fine* la contraction musculaire. Ces

médicaments permettent de réduire rapidement (dans les deux premières semaines de traitement) les SBAU liés à l'HBP, mais doivent être poursuivis au long cours pour obtenir un effet durable. Deux études cliniques (ALTESS 2006 et ALF-one 2008) ont montré une amélioration des SBAU et du débit urinaire par rapport à un placebo (Jardin *et al.*, 1991). Ces traitements permettent également selon l'étude ALF-one, une diminution de 25% de la nycturie (levers nocturnes) (Vallancien *et al.*, 2008). Leur utilisation prolongée (2-3 ans) prévient également le risque de progression des SBAU, puisqu'il est constaté un moindre risque de progression du score IPSS ainsi que du recours à la chirurgie pour les hommes sous traitement (Roehrborn and ALTESS Study Group, 2006; Vallancien *et al.*, 2008). Ces traitements peuvent cependant être responsables d'anéjaculations ou d'une éjaculation rétrograde.

**Les inhibiteurs de la 5 $\alpha$ -réductase** (5ARI pour 5-alpha-reductase inhibitor) sont considérés comme la classe de traitements dit « étiologiques » et sont prescrits aux patients ayant de gros volumes prostatiques (>30 mL). Ils permettent de bloquer la métabolisation de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) au sein de la prostate, réduisant *in fine* le compartiment luminal et le volume prostatique. Il existe deux types d'inhibiteurs, ceux bloquant uniquement la 5 $\alpha$ -réductase de type I (Finastéride) et ceux bloquant les 5 $\alpha$ -réductases de type I et II (Duastéride). Ces traitements permettent une diminution de 19% du volume prostatique la première année, une augmentation du débit urinaire moyen ainsi que l'amélioration de la qualité de vie des patients (Gormley, 1992). Ces effets sont durables et toujours observés après 4 ans de traitement. Ils permettent une diminution de 50% du risque de recours à une intervention chirurgicale pour l'HBP ou de la survenue d'une rétention urinaire sévère par rapport au traitement placebo (McConnell, Lieber and Nickel, 1998).

**Les phytothérapies** sont des alternatives intéressantes et disponibles sans ordonnance en pharmacie pour soulager les SBAU légers. Ce sont des extraits de plantes comme le palmier nain (*Serenoa repens* principe actif du Permixon®), le prunier d'Afrique (*Pygeum africanum*), l'ortie, la Swertia (*Swertia mileesis*) ou bien des combinaisons de plantes. Ces plantes sont reconnues pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antiprolifératives (Vela Navarrete *et al.*, 2003; Latil *et al.*, 2015; Wu, Gu and Li, 2017). Par ailleurs, le palmier nain a

aussi démontré une activité inhibitrice des 5 $\alpha$ -reductases *in vivo* sur des co-cultures primaires humaines (Bayne et al. 1999). Bien qu'une amélioration symptomatique soit rapportée chez environ 40% des patients, le manque d'étude contrôlée ne permet pas de recommander ce traitement avec un niveau de preuve élevé. Une méta-analyse récente des différentes études cliniques disponibles n'a d'ailleurs pas démontré l'efficacité de la monothérapie *Serenoa repens* sur la réduction des SBAU liés à l'HBP (MacDonald *et al.*, 2012).

**D'autres stratégies médicamenteuses existent** pour soulager les hommes des SBAU liés à l'HBP, et dont les différents mécanismes d'actions ont pour but de décompresser l'urètre via la stimulation de la relaxation ou l'inhibition de la contraction des muscles lisses prostatiques. Parmi ceux-ci nous pouvons citer les inhibiteurs de Phospho-diesterases (IPDE) (Oelke *et al.*, 2012), permettant de prolonger les effets du monoxyde d'azote (NO) dans l'espace inter-synaptique, favorisant *in fine* la relaxation musculaire.

Les anti-muscariniques (van Kerrebroeck *et al.*, 2013), ainsi que les agonistes  $\beta_3$  comme le Mirabegron (Nitti *et al.*, 2013; Ichihara *et al.*, 2015), ont une action sur le détrusor (muscle de la vessie) et permettent la relaxation vésicale. Ceci a pour effet de traiter les symptômes de la phase de remplissage en diminuant les urgences, la pollakiurie et la nycturie.

Il est également possible de combiner certaines stratégies thérapeutiques pour en potentialiser les effets. Par exemple les études cliniques MTOPS et COMBAT ont montré un effet synergique de la bithérapie associant  $\alpha$ -bloquant et 5ARI. Ces études ont montré une amélioration significative des SBAU sous bithérapie versus chacune des 2 classes thérapeutiques utilisées seules (Lepor *et al.*, 1996; Roehrborn *et al.*, 2010).

Après un certain délai néanmoins, certains patients ne répondent plus aux traitements médicamenteux ou ne les tolèrent plus sur le plan sexuel, et certains voient leurs symptômes progresser ou récidiver, les contraignant à recourir à une intervention chirurgicale de désobstruction prostatique.

## b) *Approches chirurgicales*

La chirurgie de désobstruction prostatique est indiquée soit de manière impérative, en cas de survenue d'une complication de l'HBP. C'est le cas de la rétention chronique d'urine nécessitant un drainage vésical par sonde urinaire en raison du risque de dégradation réno-vésicale, de la survenue de prostatites aiguës à répétition, de la formation de calculs intra-vésicaux de stase, ou encore d'hématuries récidivantes. Dans les autres cas, la chirurgie permet de soulager les patients non satisfaits ou ne tolérant pas le traitement pharmacologique (Descazeau et al., 2012).

Elle consiste à enlever la partie hyperplasique de la prostate (adénomyofibrome), par résection, vaporisation ou énucléation. La plupart des interventions sont réalisées par voie transurétrale et utilisent l'électricité ou le laser (holmium, thulium, ou potassium titanyl phosphate encore appelé GreenLight) mais l'adénomectomie peut également être réalisée par voie abdominale. L'ensemble de ces techniques de désobstruction peut être à l'origine de complications précoces hémorragiques, et d'effets indésirables à long terme sur le plan sexuel. Il s'agit principalement d'une dysfonction éjaculatoire permanente associant une part d'éjaculation rétrograde et une part de déficit excrétoire lié à la résection des canaux éjaculateurs (Lebdai *et al.*, 2019).

Une alternative mini-invasive à la désobstruction classique visant à éviter ces effets indésirables est la pose d'implants intra-prostatiques (UroLift) permettant d'ouvrir légèrement le canal urétral et d'améliorer l'IPSS d'une dizaine de points, sans pour autant compromettre la fonction éjaculatoire (Jung *et al.*, 2019). D'autres alternatives mini-invasives innovantes sont en cours de développement et d'évaluation clinique : il s'agit de la vaporisation trans-urétrale à la vapeur d'eau avec le dispositif REZUM (McVary, Rogers and Roehrborn, 2019) ou encore, de la pose d'implants temporaires intra-prostatiques iTIND (Porpiglia *et al.*, 2019). Enfin l'embolisation des artères prostatiques par voie trans artérielle fémorale ou radiale est en cours d'étude (Lebdai *et al.*, 2016; Anract *et al.*, 2019), mais s'est avéré équivalente voire mieux tolérée qu'une combinaison médicamenteuse (alpha-bloquant + 5-ARI) dans une étude récente randomisée (étude PARTEM, Sapoval et al, 2023).

L'évolution naturelle de l'HBP n'est pas modifiée par la chirurgie, et l'on constate une possible repousse des tissus adénomateux, de fréquence variable après l'intervention chirurgicale, conduisant aux recours à des traitements additionnels pharmacologiques, ou même chirurgicaux. Le taux de ré-intervention rapporté dans la littérature est d'environ 15% après 10 ans (Cornu *et al.*, 2015). De plus, ces techniques chirurgicales invasives peuvent induire des effets secondaires urinaires exceptionnels comme l'incontinence urinaire ou la sténose urétrale cicatricielle (rétrécissement du calibre de l'urètre).

c) *La nécessité de nouvelles stratégies thérapeutiques*

- La problématique de la morbidité des traitements

Les traitements pharmacologiques peuvent provoquer des effets indésirables fréquents. Les 5-ARI sont les moins bien tolérés sur le plan sexuel, car ils sont à l'origine d'une dysfonction érectile dans 15 à 20% des cas, de troubles de la libido dans environ 20% des cas, ainsi que d'une dysfonction éjaculatoire dans 15% des cas (Erdemir *et al.*, 2008 ; Gur *et al.*, 2013). Les alpha-bloquants sont quant à eux responsables d'une dysfonction éjaculatoire avec parfois anéjaculation pouvant atteindre 60% des patients (Sakata and Morita, 2012). La phytothérapie est la mieux tolérée, mais aussi la moins efficace sur le plan symptomatique. Enfin, la population de patients traités sont souvent âgés et soumis à de multiples traitements pharmacologiques et certains alpha-bloquants peuvent entraîner des hypotensions artérielles. La gestion des interactions médicamenteuses est un sujet important, conduisant souvent à l'arrêt du traitement, et donc à un échec thérapeutique.

Les traitements chirurgicaux, en dehors des complications précoces inhérentes à la chirurgie (saignement, infection, allergie, complication anesthésique), entraînent automatiquement une dysfonction éjaculatoire définitive dès lors qu'une ablation tissulaire est entreprise. De plus, toute manœuvre endoscopique intra-urétrale peut provoquer des microtraumatismes muqueux et sous-muqueux, à l'origine d'un rétrécissement de l'urètre dans 2 à 3% des cas.

- Problématique de l'échec thérapeutique

En France, le défaut d'observance thérapeutique lié à la mauvaise tolérance d'un traitement pharmacologique de l'HBP est élevé, rapporté à environ 16% (Lukacs *et al.*, 2013). Environ 70,000 patients sont opérés chaque année d'une désobstruction prostatique. L'incidence rapportée de la reprise d'un traitement pharmacologique après la chirurgie est de 14% à 12 mois (Lukacs *et al.*, 2013). Ces données soulignent que l'arsenal thérapeutique n'est pas adapté pour un nombre significatif de patients. L'échec de la stratégie thérapeutique pourrait être lié à une mauvaise sélection des patients, ou encore à un éventail thérapeutique insuffisant et inadapté pour nombre d'entre eux.

- Absence de traitement étiologique

S'il existe 4 classes thérapeutiques ( $\alpha$ -bloquants, IPDE5, anticholinergiques et phytothérapies) pouvant potentiellement traiter les conséquences symptomatiques de l'HBP, il n'existe néanmoins actuellement que les 5-ARI qui ciblent une des composantes physiopathologiques de la maladie. Comme nous l'avons précisé en introduction, les mécanismes à l'origine de l'HBP sont vraisemblablement multiples. En atteste l'absence de réponse d'environ 30% rapportée chez les patients traités par 5-ARI de même que l'échappement thérapeutique constaté chez une autre part d'entre eux au cours du suivi (McConnell *et al.*, 2003; Roehrborn *et al.*, 2010). De plus le rôle émergent de la baisse de la signalisation androgénique dans la plasticité cellulaire questionne sur son bénéfice au long terme. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et des voies de signalisations moléculaires conduisant au développement de l'HBP, à sa progression naturelle et sous traitement, permettrait de proposer d'autres cibles thérapeutiques.

Enfin, la connaissance plus fine de ces mécanismes de progression de l'HBP permettrait de mieux comprendre l'hétérogénéité des présentations cliniques, la variabilité de progression du volume prostatique, ainsi que les mécanismes conduisant à une progression sous 5-ARI ou à une repousse anatomique après résection chirurgicale. Cette catégorisation permettrait une meilleur sélection pré-thérapeutique des patients, ainsi qu'un suivi plus personnalisé des patients.

## IV. Le stress oxydant dans l'HBP

Le stress oxydant est par définition une dérégulation de la balance entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS de l'anglais *reactive oxygen species*) et leur détoxification par les systèmes antioxydants de la cellule. Il existe dans toute cellule vivante un stress oxydant basal, appelé « eustress », qui participe activement à la signalisation cellulaire (Egea *et al.*, 2017 ; Sies and Jones, 2020). Les concentrations de ROS physiologiques varient en fonction du type cellulaire. En revanche, si la production de ROS augmente et dépasse les capacités antioxydantes et réparatrices de la cellule, le stress oxydant devient toxique et est appelé « distress » (Davies *et al.*, 2017).

Au cours de ce chapitre, nous allons dans une première partie détailler les différents acteurs du stress oxydant : des différentes sources de ROS aux acteurs antioxydants en passant par les mécanismes de réparations cellulaires. Nous aborderons ensuite les rôles des ROS dans la signalisation cellulaire ainsi que leurs effets néfastes lorsque leur concentration n'est pas maîtrisée. Enfin nous établirons l'état des connaissances sur le stress oxydant dans le cadre de l'HBP.

### A. STRESS OXYDANT ET SES ACTEURS

#### a) *Les sources et les différents types de ROS*

Il existe deux grands types de ROS, les radicaux libres et les non-radicaux. Les radicaux libres possèdent un électron célibataire sur leurs couches périphériques. Parmi ces radicaux, se comptent l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), le radical perhydroxyle  $HO_2^{\circ}$ , le radical hydroxyle  $^{\circ}OH$ , les radicaux peroxyde  $RO_2^{\circ}$  et les radicaux alkoxyde  $RO^{\circ}$  (Delattre, Beaudoux and Bonnefont-Rousselot, 2007). Quand deux radicaux libres partagent un électron célibataire, ils forment alors une espèce non-radicalaire comme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Birben *et al.*, 2012). Les

principaux ROS retrouvés dans les cellules sont répertoriés dans le **Tableau 1**. Parmi ces derniers l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène sont ceux qui possèdent la plus grande importance physiologique (Birben *et al.*, 2012).

**Tableau 1 : Principaux oxydants endogènes**

Oxydant	Formule	Equation de réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	$NADPH + 2 O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2 O_2^{\cdot-} + H^+$ $2 O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$	$Hypoxanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons xanthine + H_2O_2$ $Xanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons Acide\ urique + H_2O_2$
Radical hydroxyle	$^{\circ}OH^{\cdot}$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + ^{\circ}OH^{\cdot}$
Acide hypochloreux	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radical peroxyde	$ROO^{\circ}$	$R^{\circ} + O_2 \rightarrow ROO^{\circ}$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\cdot}$	$O_2^{\cdot-} + H_2O \rightleftharpoons HOO^{\cdot} + OH^-$

L'anion superoxyde est formé par l'addition d'un électron à une molécule d'oxygène. Cette réaction peut être médiée par l'activité des NADPH oxydases (NOXs), la xanthine oxydase ou la chaîne respiratoire mitochondriale. Le peroxyde d'hydrogène peut être produit par la xanthine oxydase, les aminoacides oxydases et les NOXs. Il peut également être issu de la détoxification de l'anion superoxyde. Le radical hydroxyle est un produit de la réaction de Fenton décrite ici, mais peut être lui aussi produit suite à la détoxification de l'anion superoxyde. En présence d'ion chlorure, le peroxyde d'hydrogène est converti en acide hypochloreux. Ce dernier, très oxydant est important dans la lutte contre les pathogènes des voies aériennes. Les radicaux peroxydes dont le plus petit est le radical hydroperoxyde, jouent un rôle dans la peroxydation des acides gras. Pour les radicaux peroxyde et hydroperoxyde, R désigne un substrat organique. Modifié d'après Birden *et al.*, 2012.

Les ROS ont des réactivités différentes et préférentielles avec certains acides aminés et groupes chimiques (Hawkins and Davies, 2019). Le ROS le plus réactif est l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), mais c'est également celui qui a la demi-vie la plus courte et le nombre de cibles le plus limité telles que les centres fer-soufre des chaînes respiratoires (Lambeth 2004 ; Sies, Berndt and Jones, 2017). A l'inverse, l' $H_2O_2$  est le ROS le moins réactif, mais son champ d'action est plus large. Il comprend les méthionines, et certains résidus cystéines que l'on peut trouver dans les sites actifs de certaines enzymes (Lambeth, 2004). Sa concentration cellulaire varie physiologiquement entre 1 et 100nM (Sies and Jones., 2020). C'est un véritable acteur de la

signalisation qui est impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Nous aborderons l'implications des ROS dans la signalisation cellulaire dans le sous-chapitre **IV.B**.

Parmi les sources de ROS, il existe des sources exogènes, comme la cigarette (Church and Pryor, 1985), l'exposition à l'ozone (Nightingale, Rogers and Barnes, 1999), l'hypoxie (Matthay et al 1999), les radiations ionisantes (Narayanan et al., 1997), les métaux lourds (Stohs, 1995); et des sources endogènes, c'est-à-dire produites par le métabolisme cellulaire. Il existe de nombreuses sources endogènes de ROS, telles que les enzymes des organites cellulaires, les enzymes de la voie arachidonique, la xanthine oxydase, les NADPH oxydases (NOXs) et la chaîne respiratoire mitochondriale. Les deux derniers sites sont les sources principales des ROS.

Les NOXs sont des complexes d'enzymes membranaires exportrices d'électrons, responsables de la formation de l'anion superoxyde (voir réaction illustrée dans le **Tableau 1**). Chez l'Homme on dénombre 7 isoformes différentes (NOX1-5 ainsi que DUOX1 et DUOX2). Elles sont exprimées différemment au sein de l'organisme et possèdent des rôles physiologiques particuliers (Lambeth, 2004). Leur localisation est résumée dans le **Tableau 2**.

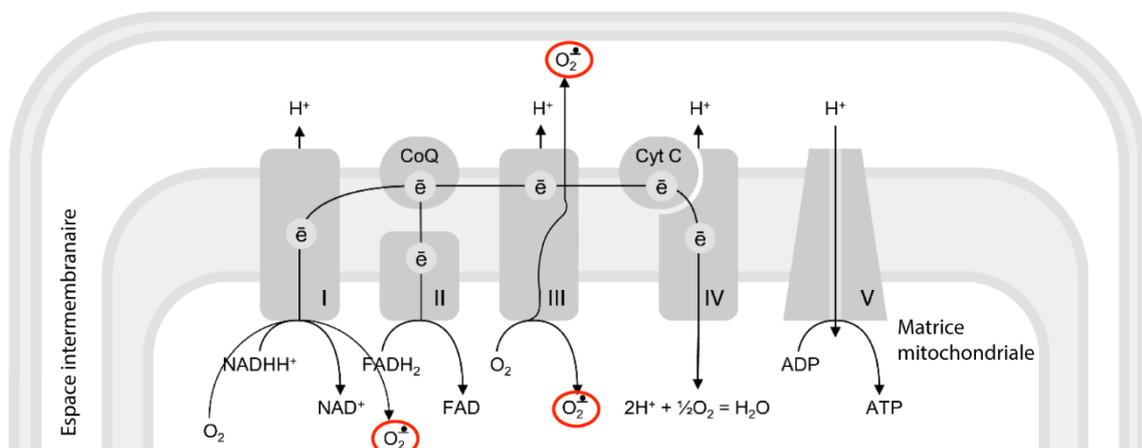
**Tableau 2 : Localisation des NOXs dans l'organisme**

Enzyme	Localisation avec le niveau d'expression le plus élevé
NOX1	Inductible : Colon et cellules musculaires lisses vasculaires
NOX2	Phagocytes
NOX3	Rein fœtal
NOX4	Rein, ostéoclaste, ovaire et yeux : très répandu
NOX5	Rate, sperme, glande mammaire, cerveau
DUOX1	Thyroïde, cerveau et poumon
DUOX2	Thyroïde, colon, îlots pancréatiques et prostate

Modifié d'après Lambeth 2004.

Les NOXs sont généralement localisées au niveau de la membranes plasmique et génèrent continuellement des faibles quantités de ROS. Cependant, elles peuvent aussi en produire en réponse à des stimuli tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des signaux calciques ou lors de processus d'éliminations de pathogènes (Lambeth, 2004). Par exemple, NOX2, qui est localisée au niveau de la membrane des phagosomes, participe à la lyse des pathogènes lors de leur phagocytose par les neutrophiles et les macrophages (Lambeth, 2004). NOX5 est un acteur clef des processus d'angiogenèse et d'apoptose.

L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale produit naturellement des ROS. En effet lors de son fonctionnement normal, certains électrons s'échappent de la mitochondrie, particulièrement au niveau des complexes I et III, et viennent réagir avec l'oxygène (**Figure 17**). L'interaction avec l'oxygène produit alors de l'anion superoxyde (Wong *et al.*, 2017). Si l'activité de la mitochondrie est modulée (sous activité ou suractivité), la production d'anion superoxyde peut augmenter. Ces radicaux sont ensuite réduits par l'action en chaîne de plusieurs enzymes antioxydantes en radicaux de moins de moins toxiques puis en eau (Collins *et al.*, 2012). Comme nous le verrons plus loin, la molécule thérapeutique que nous avons utilisée dans le cadre de ce projet de thèse agit spécifiquement sur la production de ROS mitochondriaux.



**Figure 17 : Chaîne respiratoire mitochondriale et sites préférentiels d'échappement d'électrons**

Lors de la respiration, les électrons sont transférés du NADH et du FADH<sub>2</sub> via la chaîne de transport d'électrons. Parfois, et notamment à certains sites de prédilection (complexe I et III), les électrons s'échappent de la chaîne et réagissent avec l'oxygène présent dans la cellule. Cette réaction est à l'origine de la production mitochondriale d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> entourés ici en rouge. Modifié d'après (Martins *et al.*, 2023).

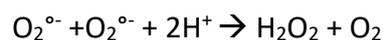
Ces deux sources endogènes permettent de générer localement de l' $\text{HO}^-$  et de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour répondre aux stimuli extérieurs comme des facteurs de croissances, des cytokines ou l'hypoxie participant à différentes voies de signalisations ainsi qu'aux adaptations métaboliques nécessaires à la survie cellulaire (Spencer and Engelhardt, 2014; Fuhrmann and Brüne, 2017).

### *b) Les systèmes antioxydants*

La réactivité importante des ROS nécessite une régulation fine de leur concentration via des composés et des systèmes antioxydants. Les antioxydants dont dispose l'organisme sont soit apportés par l'alimentation, comme les caroténoïdes, les polyphénols, le glutathion (GSH), les thiols, les quinols, la vitamine C et la vitamine E, soit endogènes, c'est-à-dire produites par l'organisme (Hawkins et Davies, 2019).

Il existe plusieurs types d'enzymes antioxydantes réparties dans les compartiments cellulaires, qui permettent de détoxifier les différents ROS (Delattre, Beaudeau and Bonnefont-Rousselot, 2007) :

**Les superoxydes dismutases (SOD)** sont des métalloenzymes accélérant la dismutation de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante :



Il existe trois isoenzymes de SOD : la SOD1, contenue dans le cytosol, le noyau et le réticulum endoplasmique, chélatant du cuivre et du zinc (McCord and Fridovich, 1969), la SOD2, se trouvant principalement dans la membrane mitochondriale interne et chélatant du manganèse, et la SOD3, qui est sécrétée dans le microenvironnement, et chélatant du cuivre et du zinc. Le mécanisme catalytique est basé sur la réduction puis l'oxydation du métal chélaté par chaque SOD.

**La catalase (CAT)** est une enzyme héminique (comportant un hème). Elle est localisée dans le peroxysome, et catalyse la dysmutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène selon la réaction suivante :



**Les peroxydases** comprennent les cytochrome c peroxydases, les glutathion peroxydases (GPx) et les NADH peroxydases. Elles utilisent comme leurs noms l'indiquent, les pouvoirs réducteurs du cytochrome c, du GSH et du NADH afin de détoxifier les composés hydroperoxydes. Les GPx sont des sélénoprotéines qui détoxifient également le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques en alcool et en eau selon la réaction suivante :



Chez les mammifères, on répertorie 8 isoenzymes GPx1-8 qui ont des expressions et des localisations différentes (**Tableau 3** dreprenant les principales GPx). La GPx4 joue un rôle fondamental dans la détoxification de la peroxydation des lipides membranaires (Tomas et al., 1990). Elle peut également détoxifier les hydroperoxydes thymine de l'ADN.

**Tableau 3 : Localisations des principales GPx de l'organisme**

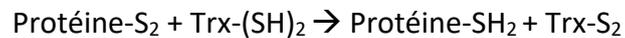
Enzyme	Localisation
Gpx1	Ubiquitaire, abondante dans les érythrocytes. Principalement cytoplasmique & mitochondriale (10%)
Gpx2	Cytoplasme des cellules gastrointestinales
Gpx3	Plasma, rein, poumon, cœur, placenta
Gpx4	Mitochondriale (testicules) et cytoplasmique (autres organes)

**Les antioxydants endogènes non-enzymatique** : enfin, il existe également des molécules antioxydantes produites par l'organisme comme le GSH, la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q, les mélanines, la mélatonine et l'acide lipoïque.

### c) Les systèmes de réparation

Cette protection antioxydante cellulaire est renforcée par des systèmes dits de "réparation". En effet, la cellule possède plusieurs enzymes spécifiques réparant les dommages causés par les ROS sur les différents composants cellulaires (Sies, Berndt and Jones, 2017).

**La détoxification des protéines :** La thiorédoxine (Trx) est une enzyme ubiquitaire à sélénium, localisée majoritairement dans le cytoplasme, intervenant dans la détoxification des protéines comportant des cystéines engagées dans des fonctions thiols oxydés. Elle libère ces groupements liés par un pont disulfure via le transfert d'atomes d'hydrogènes à partir d'un de ses résidus cystényls (SH) :



Une fois le transfert réalisé, l'enzyme est réduite par la Trx réductase, ce qui la rend à nouveau fonctionnelle (Arnér et Holmgren, 2000). La méthionine oxydée peut ainsi être prise en charge par la méthionine sulfoxide reductase. Il n'est pas connu à ce jour d'autres enzymes pouvant prendre en charge l'oxydation des autres acides aminés suite aux attaques des ROS.

**La détoxification des lipides :** Les aldéhydes déshydrogénases ainsi que la GPx4 détoxifient les hydroperoxydes et aldéhydes produits par l'oxydation des lipides, « appelée peroxydation lipidique ». Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH3A1, ALDH1A1) oxydent les groupes SH des aldéhydes, ce qui les convertit en acides carboxyliques (moins réactifs), via l'extraction d'un atome d'hydrogène et son transfert sur le NAD(P)<sup>+</sup> (Vasiliou et Nebert, 2005). L'activité aldéhyde déshydrogénase permet également la régénération de la forme réduite du GSH.

**Système de réparation de l'ADN :** l'ADN endommagé est réparé par des systèmes spécifiques de l'altération subie. Par exemple, le 8-oxoG sera pris en charge par la 8-oxoG DNA glycosylase codée par le gène *OGG1*.

Lorsque les composants cellulaires et organelles sont trop endommagés, ils peuvent être dégradés via le protéasome ou par la voie lysosomale.

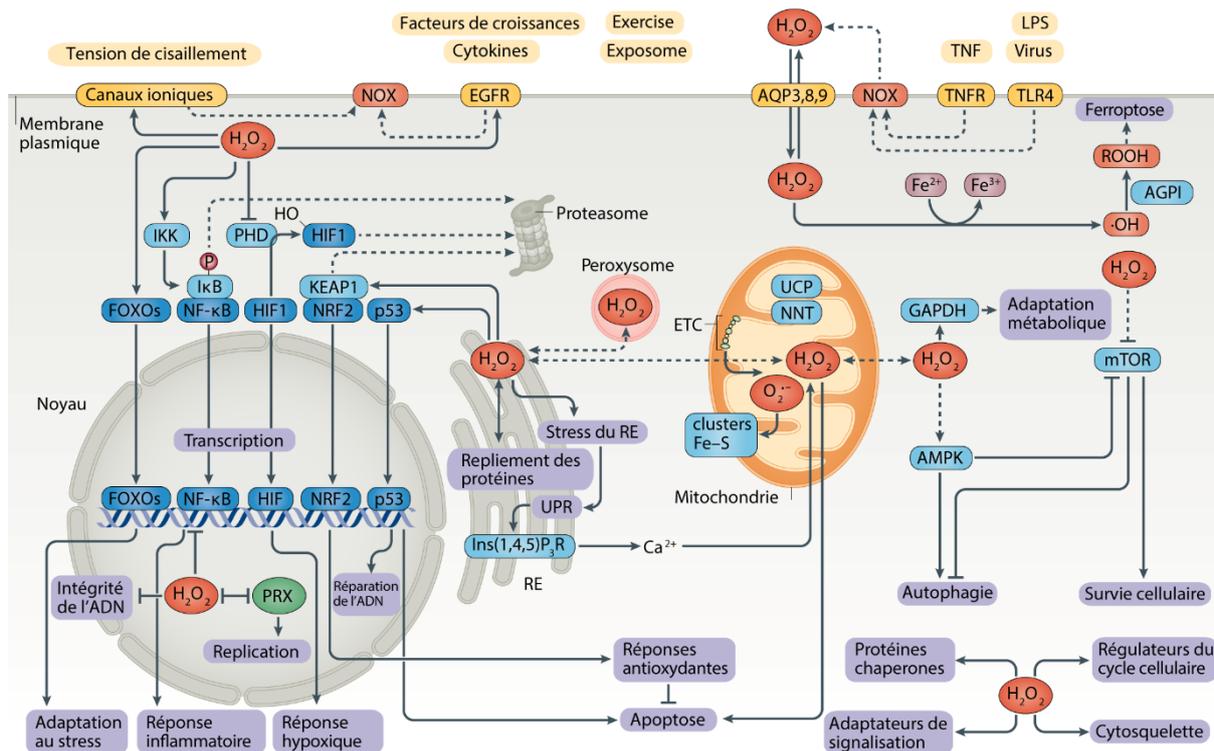
## B. LE STRESS OXYDANT ET LA SIGNALISATION CELLULAIRE

### a) *La signalisation cellulaire des ROS*

Les ROS peuvent être produits suite au métabolisme cellulaire, ou induits par différents stimuli tels que des facteurs de croissances et cytokines, des stress mécaniques, ou encore la présence de virus ou bactéries. Dans des conditions physiologiques, de par leur production minime et maîtrisée, leur compartimentalisation au sein la cellule ainsi que leur nombre limité de cibles, les ROS ont chacun un champ d'action limité. Ils ne sont donc pas nocifs pour la cellule, et sont au contraire de véritables acteurs locaux de signalisation cellulaire (Chandel *et al.*, 1998; Hamanaka *et al.*, 2016; Sies and Jones, 2020).

Le peroxyde d'hydrogène module l'activité de plusieurs facteurs de transcription via un changement de leur structure 3D provoqué par l'oxydation des groupement cystéines et méthionines. Cette modulation de l'activité des facteurs de transcription permet à la cellule d'adapter ses réponses de manière temporelle et quantitative. Les cibles du peroxyde d'hydrogène comprennent FOXOs (*Forkhead box protein O*), NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*), ou encore HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*) modulant respectivement les réponses au stress, à l'inflammation et à l'hypoxie. Mais nous retrouvons également NRF2, un acteur majeur de la signalisation antioxydante, faisant office de rétrocontrôle négatif et permettant de maintenir une concentration physiologique de ROS au sein de la cellule.

En fonction de leur lieu de production, les ROS peuvent avoir différents effets cellulaires. Ils peuvent également moduler la signalisation cellulaire via la modification de l'activité des récepteurs ou des protéines associées à ces derniers, induire des adaptations métaboliques, provoquer des changements au niveau du cytosquelette, inhiber la réplication cellulaire ou encore provoquer la mort cellulaire. Les différents effets des ROS sur la signalisation cellulaire sont synthétisés dans l'illustration suivante (**Figure 18**).



**Figure 18 : La diversité de modulation de la signalisation cellulaire par le stress oxydant**

Le stress oxydant être produit du métabolisme cellulaire ou être induit par différents stimuli. Le stress oxydant module certaines voies de signalisations cellulaires par le biais de modifications de certaines cibles. Le code couleur de ce schéma est le suivant : Les stimuli sont notés en jaune pâle, les récepteurs et canaux en jaune foncé, les ROS en rouge, les cibles cellulaires des ROS sont en bleu, les facteurs de transcription sont en bleu foncé, et les divers effets cellulaires sont en mauve. Les flèches en pointillé indiquent les processus indirects. De haut en bas et de gauche à droite : Tension de cisaillement (*Shear stress*) ; NOX, NADPH oxydases ; EGFR, récepteur à l'EGF ; IKK, *inhibitor of NF-κB* ; IκB, inhibiteur du facteur nucléaire NF-κB ; FOXOs, *Forkhead box protein O* ; PDH, propyl hydroxylase ; HIF1, *hypoxia inducible factor 1* ; KEAP1, *kelch-like ECH associated protein 1* ; NRF2, *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* ; P53, UPR (*Unfolding protein response*) ; Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>R, inositol 1,4,5-triphosphate receptor ; RE, réticulum endoplasmique ; PRX, Peroxyrédoxine ; UCP (*uncoupling protein*) ; NNT, nicotinamide nucléotide transhydrogénase ; AQP3, aquaporine 3 ; TNFR, récepteur au TNF ; TLR4, *toll-like receptor 4* ; AGPI, acides gras polyinsaturés ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase ; mTOR, *mammalian target of rapamycin* ; AMPK, *AMP-activated protein kinase*. Modifié d'après (Sie and Jones, 2020).

### b) Les conséquences néfastes du stress oxydant

Dans des conditions pathologiques, lorsque les concentrations de ROS sont supérieures aux capacités antioxydantes de la cellule, les ROS vont attaquer les composants cellulaires et impacter la signalisation ainsi que le métabolisme cellulaire. Par exemple, une légère

augmentation extra-physiologique de ROS peut stimuler la prolifération cellulaire, alors qu'une concentration plus élevée peut induire des altérations irréversibles conduisant à la mort cellulaire.

**La peroxydation des lipides :** En forte concentration, les ROS induisent la peroxydation des lipides membranaires, ce qui conduit à une réaction en chaîne engendrant premièrement une désorganisation des membranes. Cette désorganisation des membranes cellulaires perturbe de nombreuses voies de signalisation, mais peut également conduire à la perte de leur intégrité et conduire à la mort de la cellule (Sies, Berndt and Jones, 2017).

**L'oxydation des protéines :** Les ROS ont également la capacité d'oxyder l'ensemble des protéines pouvant inhiber leurs fonctions et induire leur dégradation, perturbant aussi la signalisation cellulaire.

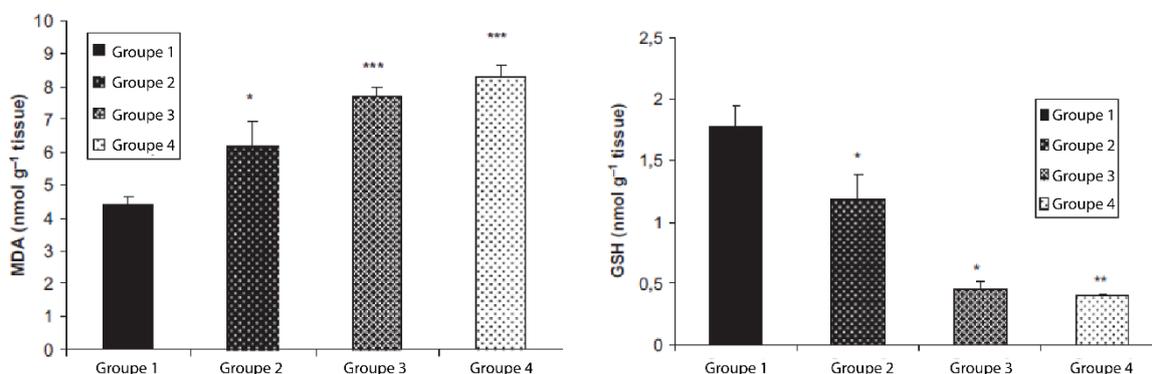
**Les dommages à l'ADN :** Les ROS peuvent oxyder l'ADN, éprouvant son intégrité et pouvant conduire à des mutations génétiques (Khandrika *et al.*, 2009; Hajam *et al.*, 2022). Par exemple, l'oxydation de la guanine (G) en 8-oxoguanine déstabilise l'ADN car il n'y a plus que 2 liaisons hydrogènes (au lieu de 3 sur une paire G-C). Lors du processus de réparation de l'ADN, la cellule aura davantage tendance à remplacer la cytosine (C) par l'adénine (A). Ce changement, conduit au remplacement d'une guanine par une thymine (T) lors de la réplication de l'ADN, conduisant *in fine* à une mutation d'une paire G-C en A-T (Nakabeppu, 2014).

Les différents dommages cellulaires induits par les ROS peuvent servir de marqueurs pour indiquer une augmentation du stress oxydant intracellulaire. Il est possible également de retrouver des protéines oxydées ainsi que des lipides oxydés en circulation dans l'organisme, le plasma, la salive et les urines (Goswami *et al.*, 2007; Gyurászová *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019; Domoslawska *et al.*, 2022). Des niveaux élevés de marqueurs de stress oxydant ont été retrouvés au cours du vieillissement et dans différentes pathologies liées à l'âge, comme les cancers, les maladies neurodégénératives, ou encore le syndrome métabolique (Lambeth, 2007). Comme nous allons le développer dans le chapitre suivant, un lien entre stress oxydant et HBP a également été établi.

### C. STRESS OXYDANT ET HBP

A l'instar d'autres maladies liées à l'âge, l'HBP est corrélée au stress oxydant. En effet, le sérum de patients atteints d'HBP présente davantage de marqueurs de stress oxydant que celui d'hommes sains. Par exemple, les concentrations de malondialdéhyde (MDA), un produit issu de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et de leurs esters, sont plus élevées dans le sérum des patients comparativement aux sujets sains (Merendino *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2019). De plus, la concentration *in situ* de MDA est positivement corrélée avec le poids de la prostate (**Figure 19**), reflétant une augmentation du stress oxydant parallèle à la progression de l'hyperplasie (Zabaiou *et al.*, 2016).

Par ailleurs, chez ces patients, plus le poids de la prostate est élevé, plus faibles sont la concentration en GSH (**Figure 19**), l'activité enzymatique des GST (pour *glutathione-s transférase*) et, l'expression de la CAT et des GPx (Olinski *et al.*, 1995; Zabaiou *et al.*, 2016), traduisant une baisse des capacités antioxydantes du tissu.



**Figure 19 : Augmentation du stress oxydant dans les prostates de patients atteints d'HBP**

Concentration du MDA et du GSH au sein des prostates de groupes d'hommes souffrant d'HBP. Le groupe 1 est composé de tissus provenant de prostates pesant entre 20 et 40g, le groupe 2 entre 41 et 60g, le groupe 3 entre 61 et 81g et le groupe 4 supérieur à 100g. Figure modifiée d'après (Zabaiou *et al.*, 2016).

L'épithélium semble être plus touché que le compartiment stromal par le stress oxydant, puisque son contenu en 8-oxoguanine, reflétant les dommages à l'ADN spécifiquement induits par les ROS, est significativement plus élevé chez des patients souffrant d'HBP que chez des sujets sains, alors que dans le stroma, la différence est non significative (Olinski *et al.*, 1995; Vital, Castro and Ittmann, 2016).

Le stress oxydant dans le contexte de l'HBP possède plusieurs causes possibles et non exclusives, dont la chronologie est encore mal comprise. Vital et ses collègues constatent une concentration plus importante de la NADPH oxydase 4 (NOX4) dans les tissus d'HBP, qui pourrait expliquer l'augmentation du stress oxydant dans ces tissus (Vital, Castro and Ittmann, 2016). L'augmentation du stress oxydant pourrait également provenir d'un processus naturel lié au vieillissement des mitochondries, qui laisseraient échapper davantage d'électrons, et donc produiraient davantage de ROS. C'est la théorie radicalaire du vieillissement (Ziada, Smith and Côté, 2020) qui pourrait vraisemblablement avoir lieu dans tous les compartiments prostatiques. Nous ne connaissons pas à ce jour l'existence de recherches montrant qu'il existe une source cellulaire préférentielle de ROS dans la prostate. Enfin, les ROS peuvent également provenir du contingent inflammatoire. En effet, les macrophages sécrètent physiologiquement des ROS durant la phagocytose (Forman and Torres, 2002). Par ailleurs, leurs phénotypes pro- ou anti-inflammatoire sont intrinsèquement liés à leur concentration de ROS (Mills *et al.*, 2016). L'inhibition de la production de ROS entraîne l'incapacité de ces cellules à acquérir un phénotype pro-inflammatoire. Enfin, la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules inflammatoires pourrait également stimuler la production de ROS dans les cellules épithéliales et stromales via les NOXs.

Ces ROS produits peuvent circuler librement à travers les membranes, ou bien via des transporteurs comme l'aquaporine 3 (AQP3), et se retrouver dans le micro-environnement (Sies and Jones, 2020). Au sein de celui-ci, ils peuvent stimuler la sécrétion, par les cellules stromales et épithéliales, de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (Hayes, Dinkova-Kostova and Tew, 2020), induisant l'infiltration immunitaire (Hajam *et al.*, 2022). Les ROS stimulant la prolifération de différents types cellulaires, ils pourraient également contribuer à l'hyperplasie épithéliale et stromale. Si la corrélation entre stress oxydant et HBP n'est plus à

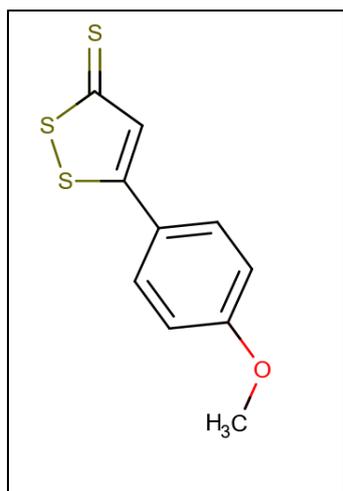
démontrer, il reste à déterminer son rôle exact ainsi que sa chronologie dans l'étiologie de la pathologie.

Depuis quelques années, l'inhibition du stress oxydant a suscité un intérêt croissant en tant que nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter l'HBP. En effet, durant ma thèse, plusieurs équipes ont conforté notre choix de proposer une stratégie antioxydante pour l'HBP, puisqu'elles ont montré que l'administration de différents composés de pharmacologiques (Fajardo *et al.*, 2016; El-Sherbiny *et al.*, 2021; Jin, Lim, *et al.*, 2023) ou extraits de plantes ((Elsherbini *et al.*, 2022) Fu *et al.*, 2022) ayant des propriétés antioxydantes à des rats ou souris modèles d'HBP, réduisait la taille des prostates ainsi que l'inflammation *in situ*. Cependant, ces molécules chélatrices de ROS, ne font que les détoxifier. Comme nous le verrons plus loin, la molécule que nous avons étudiée, l'anéthole tritone, agit quant à elle au niveau de la production des ROS (Detaile *et al.*, 2019), ce qui lui confère un avantage supplémentaire et devrait vraisemblablement potentialiser cette stratégie thérapeutique. A la lumière des résultats obtenus au cours de mon travail de thèse, nous discuterons et comparerons ensuite les avantages et inconvénients dans le traitement de l'HBP des différents composés et de notre molécule d'intérêt.

## D. ANETHOLE TRITHIONE (ATT) ET INTERET POUR L'HBP

### a) Utilisations cliniques

L'anéthole trithione (ATT), de formule chimique  $C_{10}H_8OS_3$ , est une petite molécule organo-sulfurée très lipophile possédant un groupe méthyl et un groupe thio-cétone (**Figure 20**).



**Figure 20: Structure chimique de l'anéthole trithione**

L'ATT possède une forte perméabilité intestinale lui permettant d'être rapidement absorbé par l'organisme après ingestion. Chez le rat et l'homme, l'ATT est ensuite métabolisé par le foie via une O-déméthylation en 4-hydroxy-anéthole trithione (ATX) (Yu *et al.*, 2011; Dulac *et al.*, 2018) possédant des caractéristiques pharmacologiques similaires (Pubchem.com). L'ATT est cependant très peu soluble dans l'eau ( $0,38\mu\text{g/ml}$ ), ce qui limite sa dissolution ainsi que sa bio-viabilité. Sa concentration maximale plasmatique est de  $0,98\text{ng/ml} \pm 0,49\text{ng/ml}$  et elle est observée environs deux heures après ingestion (drugbank.com). Enfin, sa demi-vie après ingestion est d'un peu moins de quatre heures chez l'homme (drugbank.com).

L'ATT, dont les noms commerciaux sont notamment Sulfarlem®, Fetviten®, Muvicol® ou encore Sialor®, est prescrit depuis plus de 50 ans pour traiter les troubles dyspeptiques, les xérostomies (yeux secs) et hyposialies (bouche sèche) (<http://agence-prd.ansm.sante.fr>). Ces deux derniers symptômes peuvent être secondaires à une chimiothérapie, au vieillissement ou s'intégrer dans le syndrome de Sjögren (maladie auto-immune). Le mécanisme d'action exact de cette molécule dans ces syndromes est mal compris. Toutefois, l'effet sialagogue (stimulant la sécrétion salivaire) de l'ATT est attribué à l'augmentation d'une part, de la sécrétion de neurotransmetteurs (substance P et  $\alpha$ -CGPCR pour *calcitonin gene-related peptide*), et d'autre part de la quantité de récepteurs muscariniques à la surface des cellules des glandes salivaires (Christen, 1995; Nagano and Takeyama, 2010).

L'ATT est également utilisé pour ses effets antioxydants en thérapie d'appoint de l'inflammation de la vésicule biliaire, des calculs biliaires, de l'indigestion, et des hépatites aiguës ou chroniques en France. Enfin, ce composé possède des effets anti-carcinogènes mis en évidence dans des modèles murins (Reddy *et al.*, 1993; Pouzaud, 2004; Zhang and Munday, 2008). Il a également montré des propriétés chimio-préventives chez des fumeurs atteints de dysplasie bronchopulmonaire dans le cadre d'un essai clinique de phase II (Lam *et al.*, 2002).

L'utilisation chronique de ce médicament est bien tolérée chez l'Homme et n'induit que de légers effets secondaires comme une coloration foncée des urines et un ramollissement des selles (Vidal®).

#### *b) Intérêt de l'ATT en comparaison aux chélateurs de ROS*

L'ATT possède des propriétés antioxydantes particulières qui le distinguent des chélateurs de ROS, comme le N-Acétyl-Cystéine (NAC), qui par définition détoxifient les ROS déjà présents. En effet, l'ATT permet d'augmenter à la fois les capacités antioxydantes cellulaires, mais également de réduire directement la production de ROS mitochondriale (Pouzaud, 2004; Dettelle *et al.*, 2019).

L'ATT augmente la concentration intracellulaire de GSH et stimule l'activité de NRF2, le facteur de transcription clef dans la réponse antioxydante (Stohs *et al.*, 1986; Giustarini *et al.*, 2014). L'augmentation de l'activité de NRF2 est également couplée avec une augmentation de la transcription de ses enzymes antioxydantes cibles (Lee and Surh, 2005). Par ailleurs, l'ATT est aussi un donneur de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) ce qui pourrait expliquer une partie de ses propriétés antioxydantes mais également lui conférer en autres des propriétés anti-inflammatoires (Spasov *et al.*, 2017; Powell, Dillon and Matson, 2018; Akbari *et al.*, 2019).

Ainsi, les tissus d'HBP ont davantage de marqueurs de stress oxydant, et l'épithélium prostatique semble y être sensible (augmentation significative de marqueurs de stress oxydant en son sein). Cette plus forte sensibilité au stress oxydant peut être due à l'augmentation de la production de ROS *in situ* ou via le stroma (NOX4 et mitochondrie), mais également à la diminution conjointe de l'activité de détoxification des cellules. De plus,

l'inflammation est elle aussi porteuse de ROS et peut ensuite promouvoir la prolifération de l'épithélium. La capacité de l'ATT à diminuer la production des ROS mitochondriaux, ainsi qu'à stimuler l'expression des enzymes antioxydantes, fait de ce composé un véritable *challenger* des thérapies antioxydantes qui, par définition, « tamponnent » mais ne traitent pas les causes du stress oxydant. Ses effets anti-inflammatoires sont un atout supplémentaire dans le traitement de l'HBP. C'est dans cette optique que notre partenaire Zion Pharma a déposé en 2017 un brevet de repositionnement de l'ATT pour le traitement de l'HBP.

## V. Les modèles animaux de l'HBP

Il existe un certain nombre de modèles animaux d'HBP qui ont été développés au cours de ces dernières années. En dehors du chien et du chimpanzé qui demeurent les seuls modèles de développement spontané d'HBP et que nous n'aborderons pas ici (Brendler *et al.*, 1983), il existe des modèles murins (souris et rat) récapitulant chacun au moins une partie des caractéristiques de l'HBP. Ces modèles précliniques font appel à des approches méthodologiques très diverses qui sont présentées dans les paragraphes suivants.

### A. LES SOURIS AGEES

Bien que les souris ne développent pas spontanément d'HBP, l'étude des prostates de souris âgées permet de comprendre les processus cellulaires qui se mettent en place au cours du vieillissement. Ces études fournissent de précieux indices sur les mécanismes qui pourraient favoriser l'émergence de cette pathologie chez l'Homme. En effet, ces études ont permis d'observer l'émergence de la population de cellules luminales progénitrices (Crowell *et al.*, 2019), ainsi que le partage d'une signature transcriptionnelle singulière, suggérant une reprogrammation métabolique de la prostate au cours du vieillissement (Crowell *et al.*, 2020). Ces études montrent également un changement du microenvironnement inflammatoire au cours du vieillissement (Fox *et al.*, 2023). Ces différentes observations sont retrouvées dans la prostate humaine vieillissante, confirmant l'intérêt d'étudier le vieillissement de la prostate de souris sauvages (Crowell *et al.*, 2019 ; Yan *et al.*, 2022).

## B. MODELES INDUCTIBLES

Une grande partie des études sur l'étiologie de l'HBP se base sur des modèles inductibles via différents facteurs de risques de l'HBP dont les androgènes et l'inflammation, ou, selon la théorie du réveil des voies de signalisation du développement, des facteurs embryonnaires.

### a) *Injection d'hormones sexuelles*

Même si l'étiologie exacte de l'HBP n'est pas connue, les hormones sexuelles dont la testostérone ont été rapidement identifiées comme jouant un rôle dans l'apparition de la pathologie (abordé au chapitre **III.C**). C'est pourquoi des modèles murins inductibles par les hormones ont été mis au point.

L'injection sous-cutanée de testostérone-propionate chez le rat et la souris (respectivement 3mg/kg/jour et 5mg/kg/jour) provoque un grossissement rapide de leur prostate, dont la taille après un mois de traitement est significativement plus élevée que celle des souris contrôles (Zou *et al.*, 2017). Chez le rat, une augmentation de la fréquence urinaire ainsi qu'une diminution du volume par miction ont également été constatées (Li *et al.*, 2018). De plus, dans les deux espèces, les prostates possèdent des caractéristiques histologiques similaires à l'HBP humaine : le compartiment épithélial glandulaire est plus dense et présente certains foyers hyperplasiques, le stroma péri-glandulaire est également hyper-prolifératif, et les canaux sont distendus suite également à l'accumulation de sécrétions (Dai *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2017).

Avec l'âge, les taux de testostérone sanguins diminuent, augmentant naturellement le ratio estrogène/testostérone. Afin d'obtenir un modèle plus proche de cette réalité, des modèles d'injections concomitantes de testostérone et d'œstradiol ont été mis au point chez le rat. L'injection de ces deux hormones stéroïdes conduit rapidement à un grossissement de la glande et à des dysfonctionnements de miction chez ces animaux (Nicholson *et al.*, 2012). Dans ce modèle, l'hypertrophie prostatique résulte d'une hyper-prolifération du compartiment épithélial ainsi que d'un épaissement du compartiment stromal. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans la prostate humaine, l'épaississement du stroma est

dû à une accumulation de collagène et non à une hyper-prolifération des fibroblastes ou des cellules musculaires lisses.

L'induction de l'hyperplasie prostatique par injections d'hormones sexuelles rend ces modèles attractifs par leur simplicité de protocole, la rapidité d'apparition du phénotype prostatique et leur faible coût. En revanche, la pertinence physiopathologique de ces modèles est quelque peu fragile car ils ne reproduisent pas une maladie dont le développement est long et concomitant avec la baisse des concentrations sériques d'androgènes chez l'homme (abordé au chapitre III.B).

#### *b) Stimulation de l'inflammation*

L'inflammation de la prostate est constatée dans tous les tissus provenant de patients souffrant de l'HBP. Sans que l'on ne sache aujourd'hui clairement si l'inflammation est une cause ou une conséquence de l'HBP, des modèles reposant sur l'induction initiale d'une inflammation intra-prostatique ont été développés chez le rat. L'induction de l'inflammation se fait classiquement par injection *in situ* d'autoanticorps. Elle provoque une augmentation du poids et du volume prostatique chez ces rats, résultant d'une augmentation de la prolifération épithéliale et stromale (M. Zhang *et al.*, 2020). Toutefois, comparée aux modèles inductibles par la testostérone (voir ci-dessus), l'hyperplasie épithéliale est plus modeste dans ces modèles inflammatoires. En revanche, le stroma y est plus réactif et bien plus prolifératif. L'inflammation peut aussi être stimulée par injection de broyat de tissus reproducteurs (Popovics *et al.*, 2017), ou de lipopolysaccharide (Kim *et al.*, 2013), agissant comme chemo-attractants du système immunitaire et induisant également le grossissement de la glande.

Ces modèles, permettant l'étude de l'impact de l'inflammation sur le grossissement de la prostate, ont cependant les désavantages d'utiliser un plus grand nombre d'animaux (pour produire les autoanticorps ou le broyat de tissus reproducteurs et les souris receveuses) que pour d'autres modèles, ainsi que de ne présenter majoritairement qu'une hyperplasie stromale franche.

c) *Injection intra-prostatique d'UGS*

Comme évoqué plus haut (chapitre **III.C**), un réveil des processus du développement prostatique dans la région péri-urétrale a été proposé comme une cause possible de l'HBP (Mc Neal., 1978). L'injection d'UGS de rats mâles dans le lobe ventral de souris adultes résulte en une excroissance présentant, après 21 jours, des caractéristiques histologiques similaires à l'HBP (Mori *et al.*, 2009). Dans cette excroissance est retrouvée une hyperplasie épithéliale et stromale avec une forte concentration de cellules musculaires lisses. Des phénotypes similaires ont également été observés chez la souris (Tian *et al.*, 2019)

Ces modèles sont intéressants pour approfondir la théorie du réveil du développement embryonnaire. Ils sont également utiles pour étudier les relations fonctionnelles réciproques qu'entretiennent les compartiments stromal et épithélial. En revanche, le haut taux d'échec d'implantation de l'UGS dans l'épithélium prostatique, ainsi que le risque de voir se former d'autres structures du système reproducteur si l'UGS n'est pas pur, en font un modèle peu attractif et difficile à mettre en place.

## C. MODELES DE XENOGREFFES

Afin de reproduire les caractéristiques histopathologiques les plus proches de celles observées dans les tissus d'HBP humaine, des modèles de xénogreffes ont été mis en place. Ces tissus de patients présentant une HBP peuvent être implantés de manière orthotopique, c'est-à-dire dans la prostate de l'animal hôte, ou de manière hétérotopique. Le site de greffe préférentiel est sous la capsule rénale, lieu bénéficiant d'une diffusion des androgènes (Wang *et al.*, 2005). Le tissu peut aussi être introduit sous la peau, mais l'avantage d'accessibilité est contrebalancé par une prise de greffe inférieure (Wang *et al.*, 2005). Il est également possible d'injecter des cellules issues de lignées cellulaires, conduisant à des excroissances épithéliales similaires.

Les avantages principaux de ces modèles sont, pour ce qui est de la greffe de tissus d'HBP, la conservation de la structure histologique caractéristique de la pathologie humaine, avec des ratios et des interactions critiques entre les cellules épithéliales et les cellules stromales et une activité sécrétoire similaire (Lopez-Barcons, 2010). Ce modèle répond également aux traitements comme le dutastéride, il est donc pertinent dans l'étude des effets moléculaires et cellulaires des différents traitements médicamenteux (Tsujimura *et al.*, 2015). Malheureusement, ces modèles ont aussi leurs inconvénients. En plus des difficultés inhérentes à l'accès aux tissus de patients et à la mise en place de la chirurgie de greffe, ces modèles présentent un autre désavantage majeur. En effet, l'implantation de tissu humain doit se réaliser dans un animal hôte immunodéprimé, abolissant *de facto* l'étude de la contribution du système immunitaire au développement de l'hyperplasie.

## D. MODELES ASSOCIES AU SYNDROME METABOLIQUE

Chez l'homme, le syndrome métabolique est un facteur de risque de développer une HBP (Ozden *et al.*, 2007). C'est pourquoi les prostates des souris présentant des troubles du métabolisme ont été étudiées. De manière intéressante, ces prostates arborent certaines caractéristiques des tissus issus d'HBP humaines.

Les poids des prostates ainsi que l'index de prolifération du compartiment prostatique épithélial de rat dont un syndrome métabolique est induit par un régime riche en graisse, sont plus importants que ceux des rats avec un régime classique (Vikram, Jena and Ramarao, 2010). Dans ce modèle, les glandes sont distendues et les lumières glandulaires sont remplies de sécrétions (Xu *et al.*, 2018). L'utilisation de médicaments normoglycémiant, comme la metformine, ou hypolipémiant, comme la simvastatine, réduisent le volume prostatique dans ces modèles (Xu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023).

Par ailleurs, les souris non-obèses développant un diabète de type I (NOD pour *non-obese diabetic*) à la suite de la destruction des cellules  $\beta$ -pancréatiques ont également des prostates plus grosses. Dans ce modèle auto-immun, les prostates présentent une inflammation, une diminution du compartiment épithélial ainsi qu'une augmentation du compartiment stromal. Cette augmentation du volume stromal est caractérisée par une accumulation de collagène et une hyper-prolifération des cellules musculaires lisses (Ribeiro *et al.*, 2006).

De même, les rats spontanément hypertendus (SHR pour *spontaneous hypertensive rat*), possèdent une prostate hypertrophiée présentant certaines caractéristiques histologiques de l'HBP (étude du lobe ventral) (Zhang, Na and Guo, 2004). L'épithélium et le stroma sont tous deux hyper-prolifératifs. L'épithélium présente des hypertrophies focales avec des empilements cellulaires s'accroissant avec l'âge, et le stroma présente davantage de fibroblastes et de cellules musculaires lisses que des rats non hypertendus. (Matityahou, Rosenzweig and Golomb, 2003; Yamashita *et al.*, 2003).

Bien que ces modèles récapitulent une partie des caractéristiques histologiques de la pathologie humaine, la comorbidité du syndrome métabolique, qui est souvent associée mais pas toujours concomitante à l'HBP chez homme, restreint l'extrapolation des résultats à ce contexte métabolique particulier.

## E. MODELES D'OBSTRUCTION MECANIQUE

Dans la plupart des modèles animaux, la prolifération cellulaire prostatique ne se limite pas à la région péri-urétrale, de sorte que la croissance tissulaire est observée dans toutes les directions vers la cavité péritonéale, n'obstruant au final que légèrement son conduit urétral, et n'affectant que légèrement le flux urinaire. Afin d'étudier les réactions tissulaires et cellulaires qu'induit une réduction du canal urinaire sur la vessie, des modèles d'obstruction mécanique ont été réalisés chez différentes espèces telles que le rat, le lapin, le chien et le cochon. L'obstruction de l'urètre peut s'obtenir par sutures du col vésical, avec effet immédiat (Malkowicz *et al.*, 1986; Austin *et al.*, 2004), ou plus progressivement par création d'une capsule entourant la prostate et empêchant les tissus de s'expandre en « s'éloignant » de l'urètre (Broderick *et al.*, 1994). Ces différents modèles ont permis de comprendre que l'obstruction de l'urètre était directement impliquée dans la perte progressive de la capacité de vidange de la vessie. En effet, après avoir subi une brève période d'hyper-prolifération, la masse de la vessie diminue progressivement, un changement vitesse de contraction, ainsi que la diminution de sa capacité à générer de la pression en réponse à une stimulation électrique est constatée (Austin *et al.*, 2004). Ces modèles, bien que nécessaires pour étudier les effets qu'induit la réduction du conduit urétral sur les SBAU, sont des modèles provoquant une obstruction rapide ne reflétant pas le développement progressif de l'HBP. De plus, dans le cas des modèles murins d'obstruction vésicale, la pratique d'une chirurgie aussi haute, et non en partie plus distale de l'urètre due à des limitations de procédures chirurgicales sur de si petits modèles, est une limitation supplémentaire dans l'extrapolation des résultats (Austin *et al.*, 2004).

## F. MODELES TRANSGENIQUES

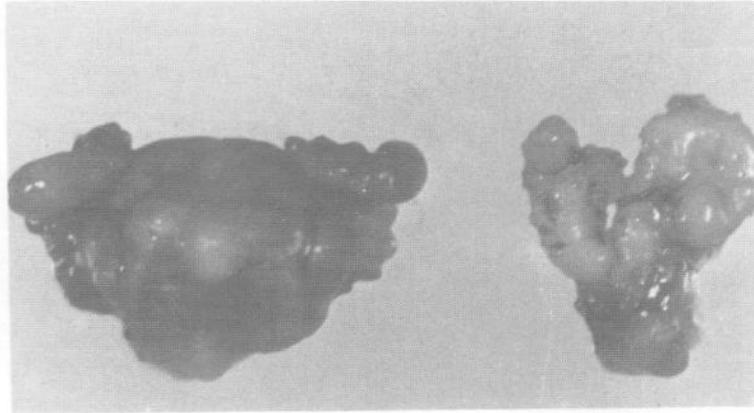
Il existe peu de modèles de souris transgéniques d'HBP. Quelques laboratoires ont décrit un grossissement de la prostate en surexprimant certains gènes impliqués notamment dans le développement prostatique embryonnaire, ou corrélés à l'inflammation de la glande. Cependant, au contraire des recherches sur le cancer de la prostate qui reposent majoritairement sur quelques modèles transgéniques "universels", il n'existe pas actuellement de modèle transgénique de référence pour l'HBP.

### a) *La souris MMTV-Int2*

La voie de signalisation FGF est impliquée dans l'allongement et la ramification des cordons épithéliaux lors du développement embryonnaire. Des facteurs appartenant à la famille des FGFs sont alors sécrétés par les cellules de l'UGM activant les récepteurs FGFR2 exprimés à la surface des cellules épithéliales de l'UGE (Wilhelm and Koopman, 2006). En se basant sur la théorie du réveil des voies de signalisation impliquées dans le développement prostatique, certains modèles sont basés sur la surexpression d'acteurs de ces voies. C'est le cas du gène *Int-2* qui code pour FGF3. Les souris transgéniques surexprimant *Int-2* sous contrôle de la séquence régulatrice du virus MMTV (*mouse mammary tumor virus*) ont un système sexuel drastiquement plus volumineux (les photographies ne montrant pas la prostate isolée il est difficile donc d'apprécier le volume de la prostate - voir **Figure 21**) (Muller *et al.*, 1990).

Dans ce modèle, l'histologie de la prostate montre une accumulation de cellules épithéliales (Muller *et al.*, 1990) alors que le stroma ne montre aucun signe d'hyperplasie (Tutrone *et al.*, 1993). De plus, certaines équipes ne retrouvent pas d'hypertrophie prostatique (Donjacour, Thomson and Cunha, 1998) et ne constatent qu'une augmentation de volume pour les glandes ampullaires et les vésicules séminales. Depuis, une troisième équipe a mis en place une surexpression bi-génique de *Int-2* (*Int-2* et un transactivateur) chez des souris. Les prostates

dans ce modèle de souris sont hypertrophiées et présentent une hyperplasie du compartiment épithélial (Chua *et al.*, 2002).



**Figure 21: Système sexuel de souris Int-2**

Photographie représentant les organes sexuels et urinaires internes de souris Int-2 (gauche) et sauvage (droite). Figure extraite de Muller *et al.*, 1990.

*b) La souris KC*

L'expression élevée de l'interleukine 8 (IL-8) dans l'épithélium prostatique est corrélée à la présence d'un stroma réactif dans l'HBP humaine (Schauer *et al.*, 2008). De même, la surexpression de la chimiokine KC (pour *keratinocyte-derived chemokine*) paralogue de l'IL-8 humaine, induit le grossissement des prostates de souris due à une hyper-prolifération de l'épithélium ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de certains marqueurs du stroma réactif en zone péri-épithéliale (Schauer, Ressler and Rowley, 2009).

Ces différents modèles ont l'avantage d'être aisés d'utilisation puisqu'une fois la lignée établie, l'hyperplasie se développe au cours du temps. Cependant, ils ne récapitulent qu'une partie des caractéristiques l'histologique des tissus d'HBP humains, et ne sont que très peu utilisés de nos jours au profit des modèles inductibles.

c) *Souris transgénique Pb-PRL*

La prolactine (PRL) est une hormone endocrine sécrétée par l'hypophyse antérieure. Elle possède de nombreuses actions, dont la principale est la différenciation du tissu mammaire (mammopoïèse) lors de la grossesse et la stimulation de la lactation (Kinet *et al.*, 1996; Bole-Feysot *et al.*, 1998). De manière générale, la PRL agit sur de nombreux tissus comme facteur de prolifération et/ou anti-apoptotique. L'implication de cette hormone dans la progression tumorale de nombreux tissus, dont la glande mammaire et la prostate, est largement documentée (Goffin *et al.*, 2011; Goffin and Touraine, 2015; Goffin, 2017).

La PRL induit ses effets via son récepteur (PRL-R) exprimé par un très large éventail de tissus et cellules, dont font partie les cellules épithéliales prostatiques murines et humaines (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Il est connu de longue date que la PRL induit la prolifération de l'épithélium prostatique (Syms, Harper and Griffiths, 1985). Réciproquement, l'inactivation génétique de la PRL dans la prostate induit une diminution du poids du lobe ventral de la souris (Steger *et al.*, 1998). La PRL contribue également à la fonction sécrétoire de la prostate (Costello and Franklin, 1994).

La souris Pb-PRL (Probasine-Prolactine) est un modèle de souris transgénique dans lequel la PRL est exprimée par les cellules luminales prostatiques (la PRL n'est pas exprimée dans la prostate de souris sauvage). Dans ce modèle, l'ADNc de la PRL est sous contrôle transcriptionnel du promoteur de la probasine de rat (Pb), et la protéine est sécrétée par les cellules luminales (Kindblom *et al.*, 2003; Rouet *et al.*, 2010). Ce modèle animal fut développé en 2003 par une équipe suédoise afin d'évaluer les effets de la boucle autocrine/paracrine de la PRL documentée peu de temps avant dans la prostate humaine saine (Nevalainen *et al.*, 1997). Au vu des données suggérant un rôle de la PRL dans le cancer prostatique (Goffin *et al.*, 2011), les auteurs s'attendaient à ce que la surexpression massive de la PRL dans la prostate de souris conduise au développement de tumeurs malignes. Il n'en fut rien, et le papier princeps documenta un phénotype d'hyperplasie bénigne (Kindblom *et al.*, 2003).

Le poids des prostates des souris Pb-PRL est significativement plus important que celui des prostates de souris sauvages à partir de 3 mois (Kindblom *et al.*, 2003; Rouet *et al.*, 2010).

Du point de vue histologique, l'épithélium et le stroma des prostates de souris Pb-PRL sont hypertrophiés. Ceci est dû notamment à une augmentation de l'index de prolifération de ces deux compartiments (Boutillon *et al.*, 2019), mais également à une baisse du pourcentage d'apoptose des cellules épithéliales (Dillner *et al.*, 2003). Ceci conduit à des anomalies morphologiques comme la présence d'amas épithéliaux (PINs, *prostate intraepithelial neoplasia*) et ainsi qu'au grossissement des glandes. Les glandes sont distendues et remplies de sécrétions parfois calcifiées. Le compartiment stromal des souris Pb-PRL possède également un fort infiltrat immunitaire contrastant avec le faible nombre de cellules immunitaires résidentes dans la prostate de souris sauvage (Bernichtein *et al.*, 2015), et montre des signes de fibrose (Pigat *et al.*, 2019). Dans ces prostates, l'hyper-prolifération épithéliale est largement liée à la stimulation par la PRL de la voie de signalisation STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) (Boutillon *et al.*, 2019). Dans la prostate, STAT5 apparaît en effet comme la voie de signalisation privilégiée du PRLR-R (Goffin *et al.*, 2011). En accord avec ceci, le KO de *Stat5* dans l'épithélium des souris Pb-PRL conduit à une diminution significative des phénotypes d'HBP, dont le poids des prostates, l'index de prolifération épithélial et l'inflammation (Boutillon *et al.*, 2019).

La prostate des souris Pb-PRL est également caractérisée par l'augmentation de la proportion des cellules luminales progénitrices LSC<sup>med</sup>, phénotype qui fut d'ailleurs à l'origine de la découverte par notre équipe de ce compartiment cellulaire (Sackmann-Sala *et al.*, 2014). Comme décrit plus haut (chapitre **I.E**), ces cellules épithéliales sont résistantes à la castration et possèdent une activité progénitrice démontrée *in vitro* et *in vivo* (Kwon, Zhang and Xin, 2016; Sackmann Sala *et al.*, 2017). En 2021, notre laboratoire a montré par une étude *in silico* que ces cellules LSC<sup>med</sup> partagent des similarités moléculaires avec les cellules Club/Hillock de la prostate humaine (Baures *et al.*, 2022). De manière intéressante, une étude récente suggère que la proportion des cellules Club pourrait être augmentée dans des tissus issus d'HBP (Joseph *et al.*, 2020).

Ce modèle Pb-PRL possède donc de nombreux avantages. Il ne nécessite pas de chirurgie, le processus de développement de l'hyperplasie prostatique n'est pas immédiat mais progressif, ce qui en fait un modèle simple et économique. De plus, il récapitule l'ensemble des

phénotypes histologiques caractéristiques de l'HBP humaine affectant les compartiments épithélial et stromal (inflammation), ainsi que la perturbation du flux urinaire. L'ensemble de ces caractéristiques interroge forcément sur le lien causal que pourrait avoir la signalisation PRL sur l'HBP chez l'homme. Force est de constater qu'il est à ce jour très peu documenté. Quelques études anciennes avaient noté que la concentration sérique de PRL était positivement corrélée à l'âge mais sans corrélation avec la prévalence de l'HBP (diagnostiquée par la présence de SBAU) (Hammond *et al.*, 1977; Ron *et al.*, 1981; Rannikko and Adlercreutz, 1983). De plus, il a été montré que l'hyperprolactinémie n'avait pas de conséquence sur le volume prostatique. Néanmoins, conclure à une absence d'effet de la voie PRL pourrait être quelque peu biaisé par le fait que les patients hyperprolactinémiques présentent des taux faibles de testostérone et DHT, qui devraient *de facto* conduire à une réduction du volume prostatique, laquelle n'est donc pas observée en présence de taux élevés de PRL (Colao *et al.*, 2004). Enfin, quelques publications récentes suggèrent un rôle de la signalisation STAT5 dans l'HBP, notamment sur la régulation du compartiment inflammatoire (Yang *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2019).

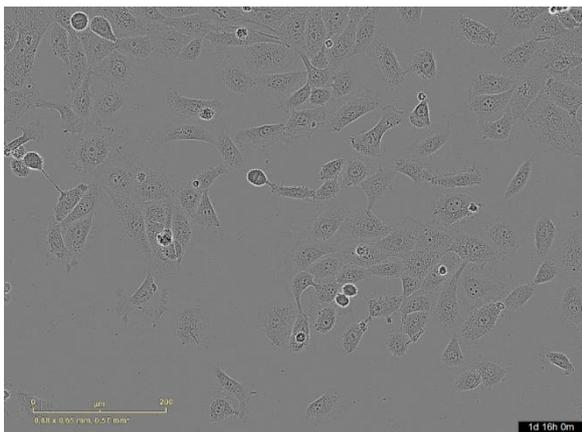
Afin d'étudier plus simplement les caractéristiques moléculaires des cellules prostatiques ainsi que l'action des traitements pharmacologiques, des modèles *ex vivo* et *in vivo* ont été générés. Il s'agit de lignées cellulaires prostatiques humaines issues, de cultures primaires et des cultures d'organoïdes issues de tissus de patients ou de modèles de souris.

## VI. Les modèles cellulaires de l'HBP

### A. LIGNÉES CELLULAIRES PROSTATIQUE HUMAINES

#### a) *La lignée épithéliale prostatique hyperplasique BPH-1*

La lignée BPH-1 (*Benign prostatic Hyperplasia 1*) est une lignée épithéliale non tumorigénique provenant d'une résection trans-urétrale d'un patient de 68 ans dans le cadre d'un traitement de l'HBP non précédée d'une thérapie hormonale. Elle a été établie et immortalisée par insertion de l'antigène grand T du virus SV-40 en 1995 en collaboration entre deux équipes Californienne et Danoise (Hayward *et al.*, 1995). Cette lignée possède une morphologie caractéristique de type épidermoïde, étalée et adhérente. Elle croît en petit amas cellulaires avec inhibition de contact, et elle est peu réfringente à la lumière (voir **Figure 22**).



Elle exprime les cytokératines KRT8, KRT18 et KRT19 caractéristiques des cellules luminales, et métabolise les androgènes (dsmz.de). Elle exprime la 5 $\alpha$ -réductase mais n'exprime que faiblement AR, et le PSA n'est pas détectable (Hayward *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2001).

#### **Figure 22: Morphologie des BPH-1**

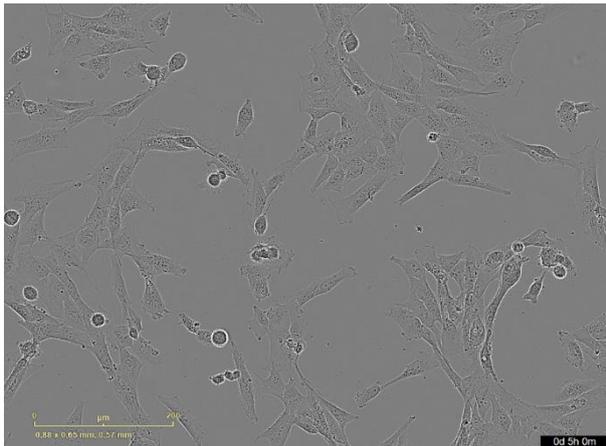
Photographie de cellules BPH-1 en culture à l'aide de l'IncuCyte (grossissement 20X), générée au cours de ma thèse.

Nous avons également montré au cours de ma thèse qu'elles expriment des marqueurs clés des cellules LSC<sup>med</sup> comme KRT4 (Dos Santos *et al.*, sous presse), faisant penser qu'elles partagent des caractéristiques transcriptionnelles avec les cellules luminales progénitrices. Par ailleurs, la recombinaison de ces cellules avec des UGM de rat génère la formation de petites structures canales et ductales bénignes dans des souris immunodéficientes mâles, laissant penser qu'elles peuvent avoir une certaine capacité progénitrice (Cunha *et al.*, 2003). Une partie des cellules BPH-1 meurent sous déprivation en androgènes, mais la majorité sont

résistantes (Liu *et al.*, 2018). Ces trois caractéristiques en font un bon modèle de lignée humaine partageant des caractéristiques avec les cellules LSC<sup>med</sup>-like. C'est actuellement la seule lignée commercialisée non tumorigénique et issue d'un patient avec HBP. La lignée BPH-1 a été utilisée pour étudier la réponse des cellules épithéliales à de nouveaux traitements, comprendre les interactions entre l'épithélium et le stroma dans cette pathologie, ainsi que l'induction de la tumorigenèse (Asare *et al.*, 2015; Kim, Jin and An, 2021; Clark *et al.*, 2023; Consoli *et al.*, 2023).

b) *La lignée fibromusculaire WPMY-1*

Il n'existe pas à notre connaissance de lignée commerciale issue du compartiment stromal de patients atteints d'HBP. C'est pourquoi les études menées sur ce type cellulaire utilisent la lignée WPMY-1, qui a été isolée en 1992 à partir du stroma prostatique d'un homme de 54 ans non décrit comme souffrant d'HBP. Elle est immortalisée par l'insertion de l'antigène



grand T du virus SV-40, et exprime l' $\alpha$ -actine des cellules musculaires, la vimentine, mais pas la desmine, ce qui l'identifie comme une lignée myofibroblastique distincte des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Webber, 1999).

**Figure 23: Morphologie des WPMY-1**

Photographie de cellules WPMY-1 en culture à l'aide de l'IncuCyte (grossissement 20X), générée au cours de ma thèse.

Cette lignée cellulaire est de morphologie allongée, et est adhérente (voir **Figure 23**). Elle est utilisée pour étudier le rôle du stroma prostatique dans l'HBP (Li *et al.*, 2022), pour tester l'action de molécules sur le compartiment stromal prostatique (Dong *et al.*, 2020), ainsi que pour comprendre les relations entre le stroma et l'épithélium (Siejka, Schally and Barabutis, 2013).

## B. LES CULTURES PRIMAIRES

Etant donné le peu de lignées cellulaires disponibles, certaines équipes travaillent sur les modèles *ex vivo* mis en place à partir de tissus de patients ou de modèles murins de l'HBP.

### a) *Les explants*

La culture d'explant ou DPE (*patient-derived explant*) permet de se rapprocher au plus près de la physiopathologie. Elle consiste en la culture de petits morceaux de tissus de 3 à 5mm<sup>3</sup> sur une surface gélatineuse et poreuse permettant l'accès au milieu et aux nutriments qu'il contient à l'ensemble de la surface de l'explant (Dong *et al.*, 2020)

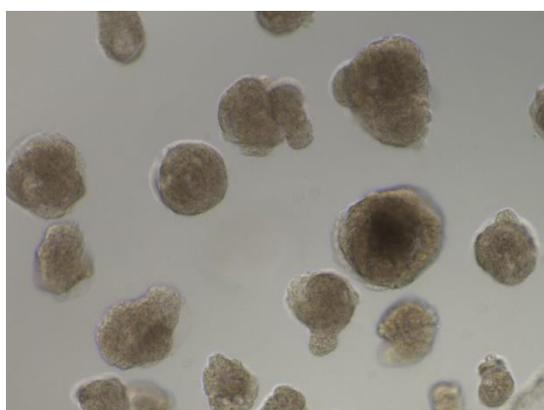
Cette technique, facile à mettre en place, possède de nombreux avantages. Elle permet d'étudier directement les effets d'un traitement sur des cellules de patients non transformées, de garder les interactions entre l'épithélium et le stroma. La variabilité intrinsèque des explants de patients en fait un modèle intéressant pour tester la robustesse d'un effet biologique. Cependant, le tissu ne pouvant se conserver plus de quelques jours, il n'est pas possible d'étudier les effets à long terme d'un produit. De plus, si cette technique est utilisée pour tester l'effet d'une molécule, elle ne peut rendre compte de la métabolisation de celle-ci par l'organisme, ni de sa biodisponibilité ou de sa distribution réelle à l'organe.

### b) *Les cultures 2D*

Les cellules issues de tissus prélevés lors d'une résection d'adénome peuvent être dissociées pour être cultivées en monocouche (Zhou *et al.*, 2023). Ce type de culture possède l'avantage de ne pas travailler avec des cellules transformées. En revanche, selon la technique d'isolation des cellules, il est nécessaire de caractériser les cellules cultivées afin de garantir l'interprétation des résultats. Contrairement à la culture d'explants, et sauf dans le cas de co-culture, les cellules isolées sont privées des interactions avec la matrice et des autres types cellulaires composant l'organe.

### c) Les organoïdes

Enfin, il est également possible, à partir de spécimens chirurgicaux, d'isoler les cellules et de les cultiver en 3 dimensions dans du matrigel ou hydrogel (**Figure 24**). Les cellules épithéliales possédant des capacités progénitrices vont alors survivre et former des structures composées de deux couches (luminale et basale) ayant des caractéristiques similaires aux glandes prostatiques (Lawson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Sackmann-Sala *et al.*, 2014). Cette technique permet d'étudier les propriétés progénitrices d'une population cellulaire ainsi que les effets de drogues sur celle-ci. Il est également possible de moduler l'environnement en co-cultivant des cellules dans la même structure en 2D (Li *et al.*, 2023).



**Figure 24: Organoïdes issus de cellules basales de souris**

Photographie d'organoïdes issues de cellules basales de souris Pb-PRL préalablement isolées par FACS. Photographie prise au microscope EVOS (grossissement 10X) et générée au cours de ma thèse.

Les avancées technologiques permettent de surmonter les problématiques spécifiques associées à un domaine d'étude et accélèrent l'émergence de découvertes scientifiques majeures.

Pour la prostate, et plus particulièrement les recherches portant sur l'HBP, l'absence de modèle récapitulant l'ensemble des caractéristiques de l'HBP humaine, le peu de lignées cellulaires existantes, ainsi que la difficulté d'accès aux tissus de patients pour beaucoup d'équipes de recherche, en font un domaine dans lequel il reste beaucoup à découvrir.

Tout récemment, une équipe a également réussi à former des organoïdes prostatiques à partir de cellules iPSCs (*induced pluripotent stem cells*) humaines induites par co-culture avec des cellules mésenchymateuses de vésicules séminales de rat néonataux (Singh *et al.*, 2023). La modification des conditions de culture de ces organoïdes (stimulation de l'inflammation, déprivation en androgènes) pourrait sans doute permettre d'étudier les différents facteurs impliqués dans la physiopathologie de l'HBP.

Les avancées technologiques permettent de surmonter les problématiques spécifiques



## OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

L'HBP est une maladie liée à l'âge, très fréquente, et caractérisée par des SBAU dégradant notoirement la qualité de vie des patients. Face à cette pathologie multifactorielle, le monde scientifique et médical peine à clarifier son étiologie exacte, au détriment du développement de thérapies plus efficaces que celles actuellement disponibles. La poursuite des recherches sur cette pathologie est donc nécessaire et permettra sans doute de proposer de nouvelles stratégies de traitement afin de pallier la perte d'effets des thérapies actuelles, observée chez de nombreux patients.

Comme décrit dans cette Introduction, les dernières études en date apportent de nouvelles données pouvant nous éclairer quant à l'étiologie de l'hyperplasie glandulaire, mais également expliquer l'apparition d'une résistance progressive aux 5ARI. En effet, plusieurs équipes constatent des modifications de la composition cellulaire de l'épithélium et du stroma au sein des prostates humaines et murines vieillissantes. En particulier, la prostate de souris âgées apparaît enrichie en cellules luminales progénitrices prostatiques, alors que le laboratoire du Dr Douglas Strand montre, au sein des prostates hyperplasiques humaines, l'émergence des cellules Club. Cette population cellulaire, de par sa localisation préférentielle autour de l'urètre (zone de transition), l'expression de facteurs immunomodulateurs, son androgéno-indépendance intrinsèque et son amplification accrue au sein des prostates hyperplasiques de patients sous traitement 5ARI, est aujourd'hui suspectée jouer un rôle non seulement dans l'étiologie de la pathologie, mais également dans la résistance à ce traitement. Les mécanismes sous-jacents à cette amplification demeurent cependant méconnus. Notre laboratoire ayant montré que la population Club humaine partage des similarités transcriptionnelles avec les cellules luminales progénitrices murines (LSC<sup>med</sup>), amplifiées quant à elles dans les prostates hyperplasiques des souris Pb-PRL, il nous a paru essentiel de mieux caractériser la composition cellulaire des prostates de ce modèle unique d'HBP.

C'est donc avec la conviction que l'étude de l'amplification des LSC<sup>med</sup> au sein des prostates de souris Pb-PRL pourrait nous apporter des indices essentiels quant aux processus conduisant

à l'émergence des cellules Club humaine dans l'HBP, que nous avons mené une première série de travaux sur ce modèle de souris. Par ailleurs, le modèle Pb-PRL reproduisant de nombreuses caractéristiques pathologiques de l'HBP humaine, il nous donnait l'opportunité d'évaluer les potentiels effets bénéfiques d'une approche thérapeutique encore sous-évaluée : la stratégie antioxydante. Le partenaire industriel de cette thèse CIFRE ayant déposé un brevet de repositionnement de l'ATT pour traiter l'HBP, nous avons traité des souris hyperplasiques Pb-PRL afin de déterminer si ce traitement pourrait compléter l'arsenal thérapeutique déjà déployé.

Dans ce contexte, les deux objectifs principaux de mes travaux de thèse étaient donc les suivants :

1. Approfondir notre connaissance du phénotype des prostates des souris Pb-PRL
2. Etudier les effets de l'ATT, un composé antioxydant, sur ce modèle.

Dans le premier axe de recherche, nous avons pris parti des deux approches principales que sont le séquençage d'ARN sur cellules uniques (scRNAseq) et l'étude des paramètres urodynamiques des souris PbPRL. Pour le deuxième axe, nous avons évalué l'effet de l'administration à des souris Pb-PRL de l'ATT en étudiant ces mêmes paramètres urodynamiques, la composition cellulaire des prostates (via scRNAseq) ainsi que la capacité de formation d'organoïdes. Nous avons également exploré les effets du traitement sur les lignées prostatiques humaines BPH-1 et WPMY-1.

La majorité des résultats issus de mes travaux de thèse sont présentés sous la forme du **manuscrit récemment accepté** pour publication dans l'*American Journal of Pathology*. Sa mise en page (dont l'insertion des Figures et légendes dans le corps du texte) a été adaptée afin de faciliter sa lecture. Quelques **résultats complémentaires** sont présentés dans une seconde partie afin d'apporter des éléments supplémentaires quant aux effets de l'ATT sur les lignées cellulaires humaines et faciliter la compréhension de la Discussion qui suivra ces données.

# I. Manuscrit

## A. RESUME GRAPHIQUE

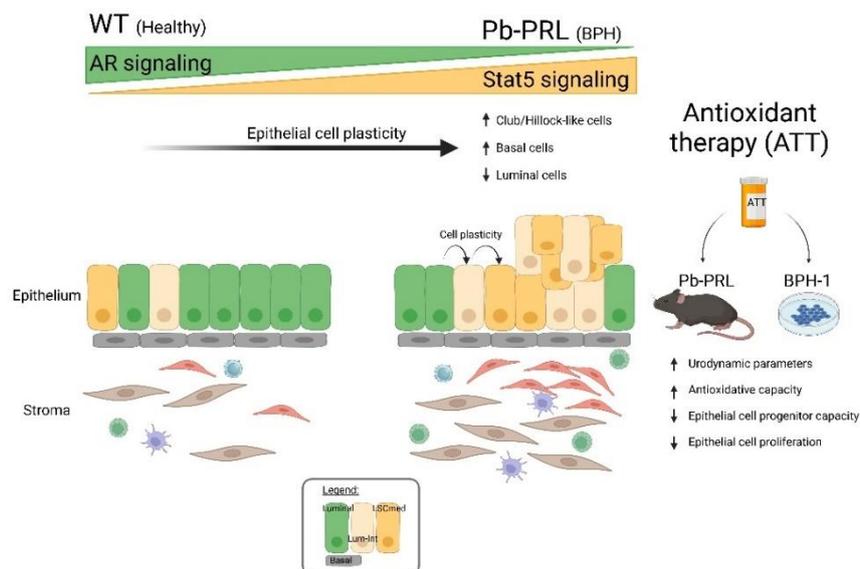
### **Cell plasticity in a mouse model of benign prostatic hyperplasia drives amplification of androgen independent epithelial cell populations sensitive to antioxidant therapy.**

*La plasticité cellulaire dans un modèle murin d'hyperplasie bénigne de la prostate entraîne une amplification de populations de cellules épithéliales androgéno-indépendantes sensibles à la thérapie antioxydante.*

Leïla DOS SANTOS, Francesco CARBONE, Emeline PACREAU, Sekou DIARRA, Marine LUKA, Natascha PIGAT, Manon BAURES, Emilie NAVARRO, Julien ANRACT, Nicolas BARRY DELONGCHAMPS, Nicolas CAGNARD, Frédéric BOST, Ivan MENAZANY, Olivier PETITJEAN, Ahmed HAMAÏ, Mickaël MENAGER, Stefano PALEA, Jacques-Emmanuel GUIDOTTI, Vincent GOFFIN

*Sous presse à American Journal of Pathology*

#### **Résumé graphique :**



Réalisé avec BioRender.com

B. ARTICLE SCIENTIFIQUE

**Cell Plasticity in a Mouse Model of Benign Prostate Hyperplasia**

**Drives Amplification of Androgen-Independent Epithelial Cell Populations Sensitive to Antioxidant Therapy.**

Leïla DOS SANTOS<sup>1</sup>, Francesco CARBONE<sup>2,3</sup>, Emeline PACREAU<sup>1</sup>, Sekou DIARRA<sup>4</sup>, Marine LUKA<sup>1,2</sup>, Natascha PIGAT<sup>1</sup>, Manon BAURES<sup>1</sup>, Emilie NAVARRO<sup>1</sup>, Julien ANRACT<sup>1,5</sup>, Nicolas BARRY DELONGCHAMPS<sup>1,5</sup>, Nicolas CAGNARD<sup>6</sup>, Frédéric BOST<sup>7</sup>, Ivan NEMAZANY<sup>8</sup>, Olivier PETITJEAN<sup>9</sup>, Ahmed HAMAÏ<sup>1</sup>, Mickaël MENAGER<sup>2,3</sup>, Stefano PALEA<sup>4</sup>, Jacques-Emmanuel GUIDOTTI<sup>1</sup>, Vincent GOFFIN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Cité, INSERM UMR-S1151, CNRS UMR-S8253, Institut Necker Enfants Malades, F-75015 Paris, France.

<sup>2</sup>Université Paris Cité, Imagine Institute, Laboratory of Inflammatory Responses and Transcriptomic Networks in Diseases, Atip-Avenir Team, INSERM UMR 1163, Paris, France,

<sup>3</sup>Labtech Single-Cell@Imagine, Imagine Institute, INSERM UMR 1163, Paris, France

<sup>4</sup>Humana Biosciences SAS, Prologue Biotech, Labège, France

<sup>5</sup>Urology Department, Hôpital Cochin, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>6</sup>Université Paris Cité Paris, Bioinformatics Core Platform, INSERM UMR1163 and Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR3633, France

<sup>7</sup>C3M, INSERM U1065, Université Côte d'Azur, Nice, France. Equipe Labélisée Ligue Nationale contre le Cancer.

<sup>8</sup>Metabolomics Core Facility, Université de Paris - Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR3633, Paris, France

<sup>9</sup>Zion Pharma, 10 rue Clapier 13001 Marseille, France

**\*Correspondence:** Dr Vincent GOFFIN, INEM Team 5, Faculté de Médecine Necker, 160, rue de Vaugirard, 75015 PARIS, France. Phone : (+33) 1 40 61 53 23. [vincent.goffin@inserm.fr](mailto:vincent.goffin@inserm.fr)

**Main text:**

- Number of pages: 55
- Figures: 7
- Tables: 4

**Running title:** Epithelial cell plasticity in mouse BPH

**Funding support:** This research was partly funded Inserm (V.G.), University Paris Cité (V.G.), CNRS (V.G.), and the Agence National de la Recherche (V.G., grant ANR-22-CE14-0059-01). L.D.S. was supported by a CIFRE PhD fellowship (Zion Pharma and Association Nationale Recherche Technologie (ANRT), contract n°191037A10) and Association Endocrinologie Clinique et Recherche (ECLER). M.B. was supported by a PhD fellowship from the Ministry of Research.

**Conflict of interest statement:** O. Petitjean holds a patent on ATT repositioning for BPH treatment. He participated in initial study design, but had no role in data collection, analysis and interpretation, and report writing.

**Key words:** BPH; Pb-PRL; progenitor cells; cell plasticity; scRNAseq; lower urinary tract symptoms; ATT; antioxidant

## Abstract

Benign prostate hyperplasia (BPH) is caused by the non-malignant enlargement of the transition zone of the prostate gland, leading to lower urinary tract symptoms (LUTS). While current medical treatments are unsatisfactory in many patients, the limited understanding of the mechanisms driving disease progression prevents the development of alternative therapeutic strategies. The probasin-prolactin (Pb-PRL) transgenic mouse recapitulates many histopathological features of human BPH. We here show that these alterations parallel urodynamic disturbance reminiscent of LUTS. Single cell RNA-sequencing analysis of Pb-PRL mouse prostates revealed that their epithelium mainly includes low-androgen signaling cell populations analogous to Club/Hillock cells enriched in the aged human prostate. These intermediate cells are predicted to result from the reprogramming of androgen-dependent luminal cells. Pb-PRL mouse prostates exhibit increased vulnerability to oxidative stress due to reduction of antioxidant enzyme expression. One-month treatment of Pb-PRL mice with Anethole Trithione (ATT), a specific inhibitor of mitochondrial ROS production, reduced prostate weight and voiding frequency. In human BPH-1 epithelial cells, ATT decreased mitochondrial metabolism, cell proliferation and stemness features. ATT prevented the growth of organoids generated by sorted Pb-PRL basal and LSC<sup>med</sup> cells, the two major BPH-associated, androgen-independent epithelial cell compartments. Taken together, our results support cell plasticity as a driver of BPH progression and therapeutic resistance to androgen signaling inhibition, and identify antioxidant therapy as a promising treatment of BPH.

## Introduction

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a common disease characterized by the non-malignant hyperproliferation of the stromal and/or glandular cell compartments in the transition zone of the prostate, leading to bladder outlet obstruction and lower urinary tract symptoms (LUTS)<sup>1, 2</sup>. LUTS are particularly prevalent in the aging population and markedly affect the quality of life of patients<sup>2, 3</sup>. The only etiologic treatment of LUTS involves 5 $\alpha$ -reductase inhibitors (5-ARIs) that block intraprostatic conversion of testosterone into its active metabolite dihydrotestosterone (DHT), leading to apoptosis of androgen-dependent cells of the glandular epithelium<sup>4</sup>. Although up to 25% prostate size reduction can be observed after one-year treatment<sup>2, 4</sup>, approximately half of the patients are unsatisfactorily treated due to incomplete clinical response or resurgence of BPH progression within 4 years<sup>5, 6</sup>. Moreover, 5-ARIs induce a range of side-effects (decreased libido, erectile dysfunctions and gynecomastia) strongly reducing patient compliance in the long term<sup>7</sup>.

Oxidative stress is commonly associated with age-related diseases<sup>8</sup>, including BPH<sup>9, 10</sup>. Hallmarks of oxidative stress (e.g. malondialdehyde, peroxidized lipids, carbonylated proteins) are elevated in serum<sup>11, 12</sup> and/or in the prostatic epithelium of BPH patients<sup>10, 13, 14</sup>. These features parallel prostate weight and are inversely correlated to the activity of antioxidant enzymes such as catalase and glutathione peroxidases (GPX) in the prostatic tissue<sup>10, 13, 14</sup>. The actual role of oxidative stress in BPH pathogenesis is poorly understood and the potential benefit of antioxidant therapy in preclinical models of BPH is unexplored.

The probasin-prolactin (Pb-PRL) transgenic mouse<sup>15</sup> recapitulates the autocrine/paracrine prolactin (PRL) signaling loop shown to promote epithelial cell growth and survival in the human prostate<sup>16, 17</sup>. Pb-PRL mice exhibit several features of human BPH including progressive development of tissue hypertrophy with increased stromal cellularity, immune cell infiltration, epithelial cell hyperplasia, and intraepithelial neoplasia<sup>15, 17-22</sup>. The hypertrophied Pb-PRL mouse prostate is enriched in a peculiar cell population called LSC<sup>med</sup><sup>23, 24</sup>. LSC<sup>med</sup> defines non-secretory luminal cells<sup>25</sup> that exhibit a specific transcriptomic profile enriched in stemness markers (*PscA*, *Tacstd2*, *Cd44*, *Sox2*, *Sca-1*)<sup>23</sup>, and are able to generate organoids *in vitro* and glandular epithelium *in vivo*<sup>24, 26, 27</sup>. Importantly, LSC<sup>med</sup> cells are tolerant to androgen deprivation<sup>23, 26, 28</sup>. LSC<sup>med</sup> cells show molecular similarity with Club cells of the human

prostate<sup>27, 28</sup>. Club cells have been proposed to be urethral cells that extend into the proximal ducts of the prostate transition zone, where BPH develops<sup>29</sup>. They are enriched in BPH compared to healthy prostate<sup>30, 31</sup>, and this phenotype is aggravated by 5-ARI treatment, which was proposed to result from luminal cell reprogramming into Club-like cells<sup>32</sup>. Together, these observations suggest that cells exhibiting LSC<sup>med</sup>/Club-like features may contribute to BPH development and therapeutic resistance.

Based on its human BPH-related hallmarks, the Pb-PRL mouse is emerging as one of the most relevant preclinical BPH models<sup>28, 33, 34</sup>. As such, it has been used to challenge new therapeutic options for BPH<sup>34, 35</sup>. In keeping with this, the first aim of this study was to use single cell RNA sequencing (scRNAseq) to elucidate the complex cell composition of hypertrophied Pb-PRL prostates and progress in our understanding of BPH pathobiology. This analysis revealed the emergence of various low-androgen signaling cell states intermediate between basal and luminal lineages, suggesting epithelial cell plasticity reminiscent of what has been hypothesized in the human disease. The second aim was to explore the therapeutic benefit of antioxidant therapy for the treatment of BPH.

## **Materials & Methods**

### **Mice**

The Pb-PRL mouse carries the rat prolactin transgene driven by the prostate-specific short probasin promoter<sup>15, 19, 23</sup>. Colonies established on *C57BL/6J* background were housed on a 12:12 h light/dark cycle with normal chow diet. Information on experimental animals (*Pb-Prl*<sup>+/-</sup>) used in this study (number, age, housing) is reported in Table 1. All experiments were approved by local ethical committees for animal experimentations (APAFIS#18297-2018032710526065 v2 and APAFIS#12547-2017112008275221 v7).

## **Antioxidant treatment**

Anetholtrithione (ATT) was supplied by Zion Pharma (Marseille, France) as an orange/brown powder (raw material for SULFARLEM, purity 98.7% produced by M2I SALIN, Salin de Giraud, France, lot GIG203503).

For animal studies, ATT was resuspended extemporaneously in pure coconut oil (C1758-500G, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at a concentration of 15 mg/mL. The effects of antioxidant therapy on urodynamic and cellular/molecular parameters of Pb-PRL mice were determined after 30-days of daily oral treatment with ATT (60 mg/kg/day) *versus* vehicle (coconut oil). This dosing allows a  $T_{12h}$  plasma concentration (~150 ng/mL, as determined by mass spectrometry) similar to what is observed in humans after 75 mg oral dosing<sup>36</sup>. For cell studies, ATT was dissolved in pure DMSO at a concentration of 10 mM, aliquoted and stored at -20 °C. As needed, it was diluted in culture medium and applied onto cell cultures at a final concentration of 10  $\mu$ M *versus* similarly diluted DMSO (vehicle). Higher concentrations of ATT (20  $\mu$ M and above) were found to precipitate in culture medium (formation of crystals).

## **Urodynamic parameters**

Urodynamic parameters were determined at Humana Biosciences (CREFRE, Toulouse, France) using specialized metabolic cages (Shinfactory, Fukuoka, Japan)<sup>37</sup> installed in a separate quiet room of the animal facility. The floor of each cage consists of a patented mesh that allows urine to pass through but traps feces. A square-shaped water-repellent funnel positioned below the mesh directs voided urine that passes through it into a container located on a precise balance meter (GX-1003A; A&D Company Ltd., Tokyo, Japan). Quantities of water and food sufficient to last for a few days were prepared for administration through the supply line and feeder box, respectively. Food and water were *ad libitum*.

Basal urodynamic parameters were determined by putting mice in these metabolic cages for 48 h. The first 24 h allowed animal acclimatization to their new environment. After the acclimation period, data on voided urine (weight and timing) and water consumption (volume and timing) were continuously collected for each mouse over further 24 h using a Micro1401 data acquisition system (Cambridge Electronic Design, Milton, Cambridge, United Kingdom).

Data were converted by a digitizer to digital signals and entered into a computer for analysis by Spike II software (Cambridge Electronic Design, Milton, UK). Data include food intake (g/day), water intake (mL/day), urine output volume (mL/day), voiding frequency (times/dark period and /light period), urine volume per voiding ( $\mu\text{L}$ ), voiding duration (s), and mean uroflow rate ( $\mu\text{L/s}$ ) calculated as the urine volume per voiding ( $\mu\text{L}$ )/voiding duration (s).

Before starting the chronic treatment of Pb-PRL mice with ATT, the basal urodynamic parameters were determined as described above for each Pb-PRL mouse. Following this step, daily treatment by oral route with ATT or vehicle was started. ATT (15 mg/mL) was administered at 10 mL/kg by oral gavage (60 mg/kg/day) once a day between 9 and 11 a.m., for 30 consecutive days. Due to the lack of administration of the drug on Sunday, a double dose of ATT (120 mg/kg) was administered on Saturday mornings (the half-life of ATT following oral administration in mice is around 30 min). On the 29<sup>th</sup> day, mice were again transferred into metabolic cages for acclimatization and stabilization of urodynamic parameters (24 h) before measurements of urodynamic parameters for each mouse (next 24 h). ATT was administered during the first and second days of permanence in the metabolic cages. At the end of urodynamic recordings, mice were euthanatized by cervical dislocation, and exsanguination was performed by sectioning of the abdominal aorta. Urogenital tissues (urinary bladder, urethra, anterior prostates, and whole prostate) were gently blotted on a filter paper and weighted using an electronic microbalance. Organ weights are expressed as a function of each mouse body weight. Results are presented as means  $\pm$  standard deviation using statistical tests as indicated in Figure captions. All differences were considered statistically significant when the null hypothesis can be rejected at a risk  $\alpha$  of less than 0.05.

### **Single Cell RNA-sequencing**

Prostates of four Pb-PRL mice treated for 30 days with vehicle (n=2) or ATT (n=2) (Table 1) were harvested carefully excluding the urethra. Prostate tissue was dissected and digested as described<sup>38</sup>, then dead cells (SYTOX™ *Blue-positive*) and Ter119-positive cells (erythrocytes) were eliminated by flow cytometry (BD FACSAria III, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

The scRNA-seq libraries were generated using Chromium Single Cell Next GEM 3' Library & Gel Bead Kit v.3.1 (10x Genomics, Pleasanton, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were counted, diluted at 1,000 cells/ $\mu$ L in PBS+ 0,04 % and 20,000 viable cells (10,200 for #756 mouse) were loaded in the 10x Chromium Controller to generate single-cell gel-beads in emulsion. After reverse transcription, gel-beads in emulsion were disrupted. Barcoded complementary DNA was isolated and amplified by PCR. Following fragmentation, end repair and A-tailing, sample indexes were added during index PCR. The purified libraries were sequenced on a Novaseq (Illumina) with 28 cycles of read 1, 8 cycles of i7 index and 91 cycles of read 2.

The sequencing reads of the Pb-PRL mice were demultiplexed and aligned to the human reference transcriptome (mm10-2020-A directly download from 10x), using the Cell Ranger Pipeline (v5.0.1). The unfiltered raw UMI counts from Cell Ranger were uploaded into Seurat v4.0.4<sup>39</sup> for quality control, data integration and downstream analyses. The wild-type reads were downloaded from the GSE172515 Gene Expression Omnibus (GEO) repository<sup>40</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>; last accessed date 9<sup>th</sup> July 2021). Duplets, empty sequencing beads and apoptotic cells were removed by filtering out cells with fewer than 500 features or a mitochondrial content higher than 20%.

Data from each sample were normalized and scaled using the log normalization method, and batch effect between samples was corrected using Seurat's FindIntegratedAnchors. On this integrated dataset, we computed the principal component (PC) analysis on the 3000 most variable genes. UMAP was carried out using the 30 most significant PCs, and community detection was performed using the graph-based modularity-optimization Louvain algorithm from Seurat's FindClusters function. The human dataset<sup>30</sup> is constituted by samples from the GSE172357 GEO repository<sup>40</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>; last accessed date 9<sup>th</sup> July 2021), and the filtered h5 files were processed in the same way as the mouse samples.

### ***In silico* scRNAseq analyses**

scRNAseq data of vehicle-treated Pb-PRL mice (referred to as Pb-PRL mice in Figures 1 to 3 for clarity) were compared to scRNAseq datasets of 3 WT mice (#1, #3, #7) from Joseph et al<sup>30</sup>, excluding urethral cells. Each sample was processed independently and then integrated together using the standard integration methods provided by Seurat. 51,307 cells for the mouse dataset (3 WT, 2 Pb-PRL-vehicle, 2 Pb-PRL-ATT), and 83,894 from the human dataset<sup>30</sup> (11 samples from 3 healthy and 4 untreated BPH subjects) were retained after filtering and all clusters were annotated using a list of manually curated gene markers.

Differential expression was performed on the different groups using the FindMarkers function of Seurat on the RNA assay with default parameters (Wilcoxon testing with Bonferroni correction). Only genes with adjusted p-values < 0.05 were selected as significant. The lists of differentially expressed genes were further divided into UP and DOWN regulated genes based on the avg\_log2FC; avg\_log2FC >0 for the UP regulated genes and avg\_log2FC <0 for the DOWN regulated ones. Pathway enrichment analysis was performed using the FGSEA package<sup>41</sup> and gene set from the mouse collections of MsigDB<sup>42, 43</sup>.

Signature scores were calculated from curated list of genes (LSC<sup>med</sup> cells<sup>27</sup>, Club cells<sup>30</sup>, Hillock<sup>30</sup> cells, AR-up and AR-down signaling<sup>23</sup>, STAT5<sup>44</sup>, PRL reactome<sup>45</sup>, antioxidant; see Table S1) using the AddModuleScore\_Ucell function from the R package Ucell<sup>46</sup>. For trajectory analyses (cell plasticity), the BAM files generated by CellRanger were processed independently using the velocity software<sup>47</sup> with default parameters, and the resulting loom files were loaded, integrated and analysed with scVelo<sup>48</sup>. The average velocity values associated to each cluster were then projected on the UMAP. scRNAseq data have been uploaded to the GEO repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>; accession number GSE235859; last accessed date 13<sup>th</sup> September 2023).

### **Transcriptomic analysis of sorted Pb-PRL epithelial cells (Affymetrix)**

Gene expression analysis of basal, LSC<sup>med</sup> and luminal cells sorted from Pb-PRL mice was performed using GeneChip Mouse Transcriptome Arrays 1.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), interrogating more than 6.0 million probes covering coding transcripts (70% of probes) and non-coding transcripts (30% of probes). The experiment was performed together with previously described analysis of cognate cell compartments from WT littermates [23]. Microarray data have been deposited on the ArrayExpress repository (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/studies/S-BSST1128>; last accessed date 13<sup>th</sup> September 2023).

### **Organoid assay**

Mouse prostate basal and LSC<sup>med</sup> cell populations were sorted based on their Lin/Sca-1/CD49f antigenic profile using BD FACSAria III (BD Biosciences) as previously described<sup>23, 24, 49</sup>. For organoid generation, we used the reference protocol described by Clevers' lab<sup>50</sup>, except that N-Acetyl Cysteine (NAC) was omitted in culture medium. LSC<sup>med</sup> and basal cells sorted from Pb-PRL mouse prostates were plated in triplicate (3000 cells/well) on a Low Growth Factor-containing Corning Matrigel (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) layer in a 96-well plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). After 1-day incubation, the medium was removed, and cells were covered by a new layer of Matrigel in order to perform 3D culture. After the second layer of Matrigel had solidified, 100 µL of fresh medium containing 10 µM ATT (*versus* DMSO) were added to each well. The medium was changed every other day. After 10 days of Matrigel embedding, organoids were fixed in 4 % PFA (Cat. No: 047377.9M, Thermo Fisher scientific, Kandel, Germany) and photos were taken with a 4X objective under a M5000 EVOS inverted microscope in order to cover the entire surface of the well. Counting (number) and surfacing (size) were performed on QuPath v0.3.0 software by manually surrounding the organoids.

## Cell lines

The BPH-1 prostate epithelial cell line (immortalized from a 68-year-old BPH patient using SV-40 T-antigen) was purchased in 2019 at DSMZ-German collection (Braunschweig, Germany; ACC 143, reference 1402). The WPMY-1 prostate myofibroblastic cell line (immortalized from a 54-year-old man using SV-40 T-antigen) was purchased in 2020 at ATCC (Manassas, USA; ATCC CRL-2854). Both cell lines were routinely maintained in DMEM medium (Glutamax, 4.5 g/L D-Glucose + Pyruvate, reference 31966-0.21, Gibco, Les Ulis, France) with 10 % (BPH-1) or 5 % (WPMY-1) FBS (CVFSVF00-01, Eurobio Scientific, Les Ulis, France). Cells were passaged every 3-4 days.

## Expression Array

Two million BPH-1 cells were seeded in 100 mm Petri dish. Media was replaced 24 h after seeding, then fresh medium containing 10  $\mu$ M ATT or vehicle was added for 72 h. Cells were trypsinized and centrifuged to dry pellets were stored at -20 °C. RNA was extracted using NucleoSpin (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's protocol and quantified using Nanodrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Les Ulis, France). RNA quality was checked with Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France), then 5  $\mu$ L RNA at a concentration of 120 ng/ $\mu$ l were used for library generation. Clariom\_S\_Human arrays were used on the GeneChip 3000 7G scanner (Thermo Fisher Scientific). Results were processed with Transcriptome Analysis Console TAC4.0 (Thermo Fisher Scientific) and normalized with summarization methods RMA. Function pathways were determined using INGENUITY (Qiagen, Courtaboeuf, France) based on a differentially expressed gene list with fold-change 1.2 and a p-value of 0,05 (529 genes). Heatmap was done using GraphPad Prism 9.3.1 and a list of differentially expressed genes with fold-change 2 and p-value 0.05 under t-Test (26 genes). Microarray data have been deposited on the ArrayExpress repository (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/studies/S-BSST1129>; last accessed date 13<sup>th</sup> September 2023).

### **Live cell imaging (Incucyte)**

BPH-1 and WPMY-1 cells were seeded in 12-well plates at a density of 50,000 cells and 100,000 cells per well, respectively. Images (20X) of the same fields were taken every hour for 72 h by a real-time IncuCyteS3 Live-Cell analysis system (Essen Bioscience). Confluence areas were analyzed using the IncuCyte software (version 2022A), and results are displayed normalized to the initial time point (time  $t = 0$ ).

### **Cell numeration**

BPH-1 cells were seeded in T75 flasks at the density of 35,000 cells. Fresh media containing ATT or vehicle was changed every 72 h. Every 7 days, images of the flask were taken using phase contrast microscope (EVOS 5000, Thermo Fisher Scientific) before the cells and the medium were collected and counted using Malassez cell with Trypan blue.

### **Seahorse (OCR & ECAR)**

BPH-1 and WPMY-1 cells were seeded in a specialized 96-well Seahorse XF96 V3 PS microplate (101085-004, Agilent Technologies) at the density of 1,000 and 5,000 cells per well, respectively. 72 h after ATT treatment cells were incubated for 1h in unbuffered XF assay media (Agilent Technologies) without ATT supplemented sequentially with either 2 mM glutamine, 25 mM glucose (G8769, Sigma Aldrich), and 1 mM sodium pyruvate for oxygen consumption rate (OCR) analysis, or 2 mM glutamine for extracellular acidification rate (ECAR) analysis. XF Cell Mito Stress Test (103015100, Agilent Technologies) and XF Glycolysis Test assay (103020-100, Agilent Technologies) were used for OCR and ECAR measurement, respectively.

Compounds (all from Sigma Aldrich) were injected during the assay at the following final concentrations. For OCR measurements: 1  $\mu$ M oligomycin (Ref. 75351, ATP synthase inhibitor); 0.5  $\mu$ M FCCP (Ref. 370-86-5, uncoupling agent measuring the maximal respiration capacity); 1  $\mu$ M antimycin A (Ref. A8674, mETC inhibitor); for ECAR measurements: 10 mM glucose; 1  $\mu$ M oligomycin; 50 mM 2-deoxyglucose (Ref. D6134, glycolytic inhibitor). Data were

recorded using XFe 96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies), normalized using protein concentration, and analyzed using Wave 2.6.3 software (Agilent Technologies).

### **Extracellular lactate and glucose measurement**

BPH-1 and WPMY-1 cells were seeded in 12-well plate at a density of 50,000 and 100,000 cells per well, respectively. After 30 min, 2 h, 24 h, 48 h and 72 h after treatment, 200  $\mu$ L of the medium of the corresponding wells were taken and put into a 96-well plate et rapidly store at -20 °C. The rest of the media was kept separate to determine protein concentration (Pierce BCA protein assay kit 23225, Thermo Fisher Scientific). Glucose and lactate media concentrations were measured with YSI 2090 Biochemistry analyzer and normalized to protein concentration in the medium.

### **Mitochondrial parameters**

BPH-1 and WPMY-1 cells were seeded in a 6-well plate at a density of 200,000 and 90,000 cells per well, respectively. After 72 h of treatment, cells were detached with trypsin (0.05%, 25300054, Gibco), collected and stained with different probes (see below) for 20 up to 45 min at 37 °C following manufacturer protocol in DMEM media. After probe staining, dead cells were stained using 2,5  $\mu$ g/mL of DAPI (D1306, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) in HBSS medium (14175-053, Gibco). Viable cell dye intensity was measured by flow cytometry using Fortessa (BD Biosciences). A minimum of 50,000 events were analyzed for each condition. Data were processed using BD FACSDiva software and analyzed using Flowjo software on median fluorescence level gate on live cells.

The probe concentrations were the following (all from Life Technologies, Courtaboeuf, France): 20 nM MitoTMRM (M20036), 50 nM Mitotracker green (M7514), and 50 nM MitoCMX ROS (M7512). TMRM positive control for mitochondrial membrane depolarization was done by treating cells with 50mM CPPP (M20036, Life Technologies) for 10 min at 37 °C before staining. Cell viability was measured by the percentage of cells incorporating the DAPI (D1306, Invitrogen).

## **ALDH Activity**

BPH-1 cells were seeded in 6-well plates at a density of 45,000 cells by well. After 72 h of ATT treatment, medium and cells were collected and ALDH activities were measured using the Aldefluor kit (01700, StemCell Technologies, Saint-Egrève, France) according to manufacturer's protocol by recording median of fluorescence by flow cytometry using flow cytometer (Fortessa, BD Biosciences). In order to create the ALDH activity-positive gate, a sample of cells from each condition was treated separately with the ALDH activity inhibitor Diethylaminobenzaldehyde (DEAB) to provide a negative control. A minimum of 50,000 events were analyzed for each condition. Data were processed using BD FACSDiva software and analyzed using Flowjo software on the percentage of ALDH-positive cells (Aldefluor).

## **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical (IHC) analyses were performed using antibodies listed in Table 2, with pH6 citrate buffer. Antibodies were revealed using Vectastain Elite ABC Peroxydase Standard kit (# PK-6100, Vector laboratories, Les Ulis, France). Antibodies were diluted in antibody diluent (ZUC025-500 Zytomed, Diagomics, Blagnac, France) with 0,1% Triton for primary antibodies, and 2 % horse serum (S-2000 Vector laboratory) in PBS-Triton 0,1 % for secondary antibody. Prostate tissue sections (H&E or IHC) were digitally scanned using a NanoZoomer-2.0 RT scanner (Hamamatsu, Photonics, Massy, France) coupled to NDP.view2 software analysis beta version U12388-01 (Hamamatsu, Photonics). For quantification of immunostaining, computer-assisted analysis of digital (scanned) images on whole prostates was performed using QuPath software version 0.3.0 (<https://qupath.github.io/>, last accessed date 18<sup>th</sup> January 2023). To quantify nuclear immunostaining (Ki-67, pSTAT5, AR) in the epithelium, first, the Random Forest Tree for tissue recognition was used to delineate and only include the glandular areas in the analysis for each prostate lobe that had been manually surrounded and recognized by the software as objects. Then, the positive cell detection command was applied to each prostate lobe to discriminate staining-positive (DAB +) *versus* staining-negative (DAB -) cells. The detection and export steps were fully automated using batch processing script. The index of proliferation (Ki-67+) and of STAT5 and AR activation was

calculated as the ratio of the number of positive *versus* total (positive + negative) nuclei counted in the epithelium. The whole procedure was validated by comparing the results obtained by Qu-Path-assisted *versus* manual counting.

### **Quantitative PCR**

Total RNA was isolated from separate prostate lobes using the NucleoSpin RNA XS (Macherey Nagel, Hoerd, France) for mouse samples or NucleoSpin (RNA Macherey Nagel, Hoerd, France) for human prostate cell line samples, according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). RNA (250 ng) was reverse transcribed using GoScript Reverse kit (A5001 for human samples, and A2791 for mouse samples Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The cDNAs, at a final dilution 1/100 for mouse samples and 1/200 for human samples, were then subjected to real-time PCR amplification using gene-specific primers (Table 3) at a final concentration of 400 nM purchased from Sigma-Aldrich (KiCqStart SYBR green probe), except mouse *Nrf2* and *Ar* (Integrated DNA Technologies Europe, Leuven, Belgium) which were used at 1X final. Real-time PCR was performed using Qtower 2.0 (Analytik Jena, Jena, Germany). The qPCR reaction contained 2  $\mu$ L cDNA sample (25 ng for mouse and 12.5 ng for human) and 10  $\mu$ L mastermix with 1X GoTaq qPCR Master Mix (A6002, Promega) and 0.8  $\mu$ L primer (10  $\mu$ M) and 7.2  $\mu$ L of RNA/DNA-free water. Actin was used as housekeeping gene in each reaction. The Qtower 2.0 Instrument was used with the following program: Enzyme activation: 95 °C for 2 min; amplification (40 cycles): 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s. Results were generated with the Qtower 2.0 software and were analyzed by the comparative cycle threshold method and presented as fold change in gene expression relative to actin expression.

## Western Blotting

Freshly trypsinized cells were centrifuged then dry pellets were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until processing. Cells were lysed with RIPA buffer (Handmade, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 8, NP40 1 %, SDS 0,1 %, Na-deoxycholate 0,5 %) with protease and phosphatase inhibitor cocktail (PPI 78445, Thermo Fisher Scientific). Protein concentrations were determined with Pierce BCA protein assay kit (23225, Thermo Fischer Scientific) using a density optic plate reader (ClarioSTAR, BMG Biotech, Champigny sur Marne, France). Equal protein concentrations (15 to 50 µg) were diluted and denatured in 4x Laemmli buffer (Nupage NP007, Invitrogen) with 2 % of β-mercaptoethanol (M7522, Sigma-Aldrich) by heating at 95 °C for 5min. Proteins were resolved in 4-12 % gradient SDS-PAGE in NuPAGE Bis-Tris Precast Gels (Life Technologies) with BlueStar PLUS Prestained protein marker (MWP04 Nippon Genetics Europe, Düren, Germany). Proteins were then transferred onto a 0.45 µm PVDF membrane (IEVH85R Immobilon-E, Millipore, Guyancourt, France) and membranes were blocked with 5 % non-fat dry milk with PBS-T (DPBS with 0.1 % Tween-20) and stained with primary antibodies (Table 4) overnight at 4 °C under agitation diluted as described below. For band detection, HRP-coupled secondary anti-rabbit (7074, Cell Signaling Technology, Leiden, Pays-Bas) or anti-mouse (NA931, GE Healthcare Europe, Freiburg, Germany) antibodies were added for 1 h at room temperature under agitation before ECL substrate (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate WBKLS0500, or Immobilon Forte WBLUF0500, both from Millipore). Protein bands were visualized using ChemiDoc Imaging System (Biorad) and bands were quantified using Image Lab Software (Biorad). Staining intensities were normalized on GAPDH staining.

## Statistics and reproducibility

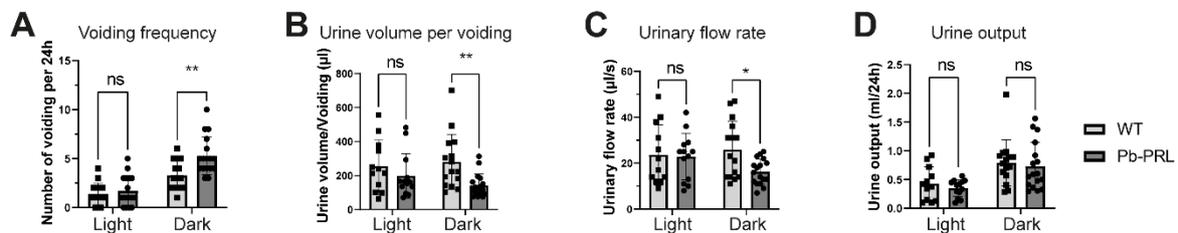
Statistical analyses were done using GaphPad Prism 9.3.1. Data are presented as mean ± SD, or as ratio (ATT *versus* vehicle, Pb-PRL vs WT) as indicated. Wilcoxon test was used for urodynamic tests comparing same mice before and after treatment, otherwise Mann-Whitney or ANOVA were used for other mouse data, and t-test or ANOVA for BPH-1 cell data.



## Results

### Pb-PRL mice exhibit urodynamic disturbances

The previously reported BPH hallmarks harbored by Pb-PRL mice have been widely documented<sup>15, 17-22</sup> and are summarized in supplemental **Figure S1**. To further assess the relevance of Pb-PRL mice as a BPH model, we analyzed various urodynamic parameters of Pb-PRL *versus* WT mice using metabolic cages. As expected, values for voiding frequency, urine output and water intake were greater in the dark than in the light period for both genotypes ( $p < 0.05$ , two-way ANOVA), and no genotype-related difference in any parameters could be observed in the light period (**Figure 1A-D** and supplemental **Figure S2**). In the dark period, voiding frequency was significantly higher in Pb-PRL than in WT mice  $5.29 \pm 1.93$  vs  $3.27 \pm 1.49$ ,  $p = 0.0010$ ; **Figure 1A**), while urine volume per voiding ( $140.8 \pm 68.4$   $\mu\text{L}$  vs  $280.3 \pm 162.7$   $\mu\text{L}$ ,  $p = 0.0080$ ; **Figure 1B**) and urinary flow rate ( $16.2 \pm 5.5$   $\mu\text{L/s}$  vs  $25.9 \pm 12.5$   $\mu\text{L/s}$ ,  $p = 0.0239$ ; **Figure 1C**) were concomitantly decreased in Pb-PRL mice. The urine output (diuresis; **Figure 1D**), mean micturition duration and water intake (supplemental **Figure S2B,C**) were similar for both genotypes. Together, these experiments assess that Pb-PRL mice exhibit urodynamic disturbances reminiscent of LUTS observed in patients with BPH.



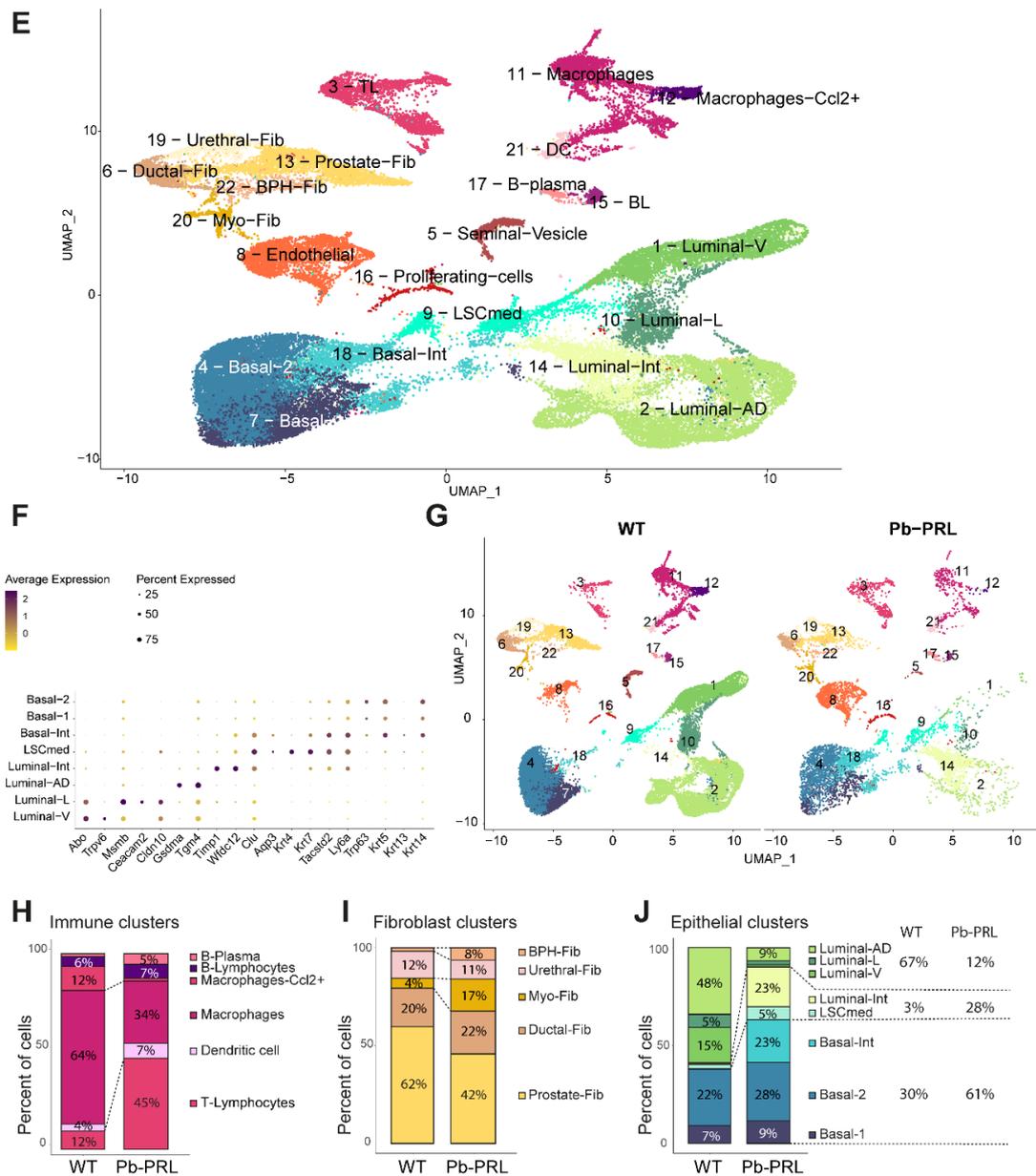
**Figure 1 (part 1): Pb-PRL mice exhibit marked alteration of urodynamic parameters and of prostate cell composition.** (A-D) Comparison of various urodynamic parameters (as indicated) between 15 WT and 17 Pb-PRL mice measured during light and dark periods. Error bars represent standard deviations, and stars denote significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant) in a two-way ANOVA statistical analysis.

### Single cell analysis of Pb-PRL mouse prostates

To address the cellular and molecular alterations underlying the various BPH hallmarks of Pb-PRL mice, we collected droplet-based scRNAseq profiles from 24,721 live cells originating the four prostate lobes of four Pb-PRL mice (Table 1). These data were analyzed together with publicly available datasets of 3 WT mouse prostates from which urethral cells had been excluded<sup>30</sup>. Unsupervised clustering segregated 22 distinct cell subsets that were annotated using marker genes validated for the mouse prostate<sup>40, 49-51</sup> (supplemental **Figure S3**). These markers identified 8 epithelial, 6 immune, 5 stromal, 1 endothelial, 1 seminal vesicle, and 1 proliferating cell clusters (**Figure 1E-G** and supplemental **Figure S4A**).

Pathway enrichment analysis in epithelial, immune and stromal cell compartments identified TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B, hypoxia and apoptosis/cell death in the top 20 pathways activated in all of them (supplemental **Figure S5** and **Table S2**). Compartment-specific pathways included cell differentiation (development, EMT, wound healing) in the epithelium, and inflammatory pathways in stromal (inflammatory response, IL-6/STAT3) and immune (inflammatory response, IL-2/STAT5, interferon) cell compartments. In agreement with histopathological characterizations<sup>15, 21</sup> immune cells infiltrating Pb-PRL mouse prostates mainly involved T lymphocytes and macrophages, while the latter dominated the rare prostate-resident immune cells found in WT mouse prostates (**Figure 1H**). In the stroma, the main alterations in Pb-PRL mice were the decreased ratio of the prostate-fibroblast cluster to the benefit of myofibroblasts (in agreement with increased picrosirius red staining, supplemental **Figure S1F**), and of a cluster of prostate fibroblasts enriched in *Egr1*, *Junb* and *Sox10*. This cluster was named BPH-Fib as it was virtually absent in healthy prostate (**Figure 1I**).

The epithelial compartment of Pb-PRL prostates was more strongly affected (**Figure 1F,G,J**). The basal cell compartment was composed of 3 clusters. Basal 1 and Basal 2 clusters were transcriptionally similar and found at similar prevalence in both genotypes. The third cluster was virtually absent in healthy prostates but represented ~20% of the Pb-PRL prostate epithelium (**Figure 1J**). This cluster hereafter referred to as 'Basal-Int' (for 'intermediate' between the basal and luminal lineages) was characterized by high expression of *Krt13*, a marker of Hillock cells in the human prostate<sup>29</sup>, *Tacstd2* (encoding TROP2) and *Ly6a* (encoding SCA-1), two typical stemness genes.



**Figure 1 (part 2): Pb-PRL mice exhibit marked alteration of urodynamic parameters and of prostate cell composition.** (E-J) Single cell RNA sequencing analyses of WT and Pb-PRL mouse prostates. (E) UMAP of 51,307 single cells from the mouse dataset (n=7 mice) after quality control. A resolution of 1.4 allows the identification of 22 cell types annotated based on the expression of 55 prostate genes, as shown in Figure S3. (F) Dot plot of the expression of the specific markers used to annotate the epithelial cell populations of the mouse dataset (n=7 mice). (G) UMAP representation colored by the annotated cell type and split by the genotype (3 WT and 2 Pb-PRL) (individual mice shown in Figure S4A). (H-J) Proportion of the cell type within the immune (H), fibroblast (I), and epithelial (J) cell populations between 3 WT and 2 Pb-PRL mice (bars color-coded according to panel E). *Symbols*: TL, T lymphocytes; BL, B lymphocytes; DC, dendritic cells; luminal-Int, luminal intermediate; Basal-Int, basal-intermediate; Luminal-AD (anterior/dorsal), Luminal-L (lateral) and Luminal-V (ventral) identify secretory luminal cells of the different lobes.

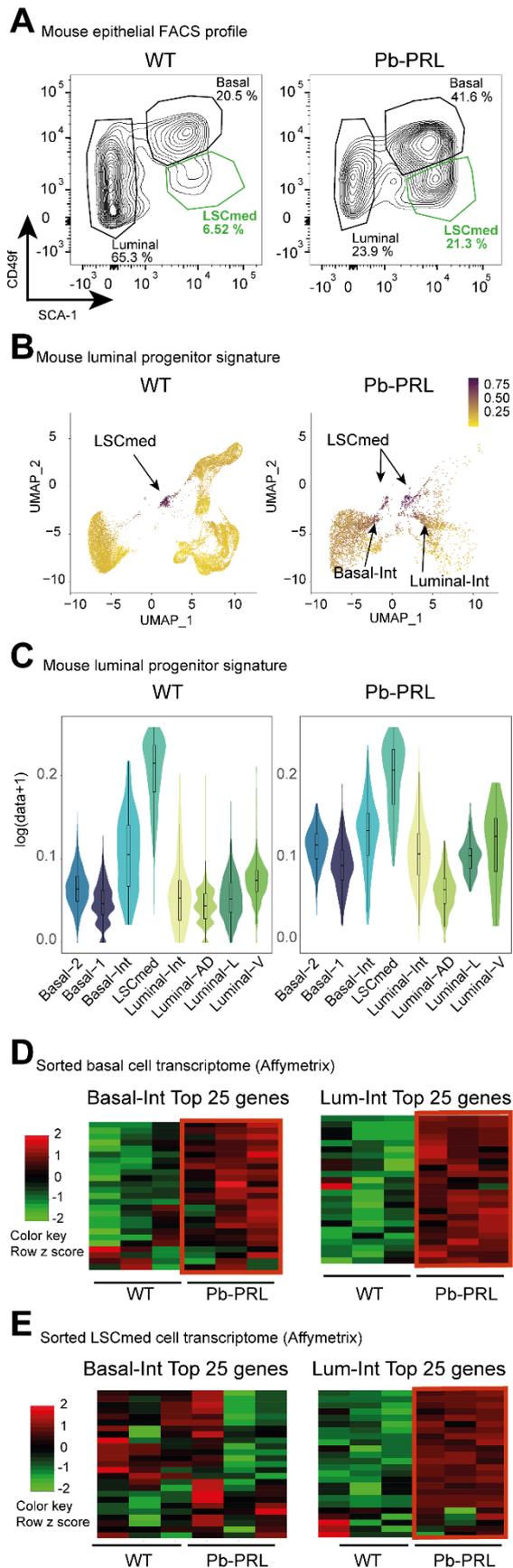
The luminal secretory cell compartment was markedly reduced in Pb-PRL mice (from >60% to <20%) to the benefit of two clusters of non-secretory Luminal cells referred to as LSC<sup>med</sup> and luminal-intermediate (Lum-Int) (**Figure 1J**, and supplemental **Figure S4B**). Typical markers of LSC<sup>med</sup> cells include *Krt4*, *Krt7*, *Clu* and *Pscd*<sup>23</sup>, while Lum-Int cells are characterized by *Pate6*, *Wfdc12* and *Timp1* and low levels of secretory luminal cell markers (**Figure 1F**).

Overall, this scRNAseq analysis indicated that the epithelium of Pb-PRL prostate is much more heterogeneous than in healthy prostate, reminiscent of what has been observed in the human prostate from old donors, including BPH, *versus* young donors<sup>30, 31</sup>. We therefore focused our study on the epithelial compartment.

### **Characterization of BPH-associated epithelial cell clusters**

LSC<sup>med</sup> defines a population of SCA-1+ luminal cells that can be enriched from mouse prostate by SCA-1/CD49f cell sorting (**Figure 2A**)<sup>23, 24</sup>. This population was shown to largely correspond to the luminal progenitor cluster identified by scRNAseq, from which a common signature of 15 genes was established<sup>27, 28</sup> (supplemental **Table S1**).

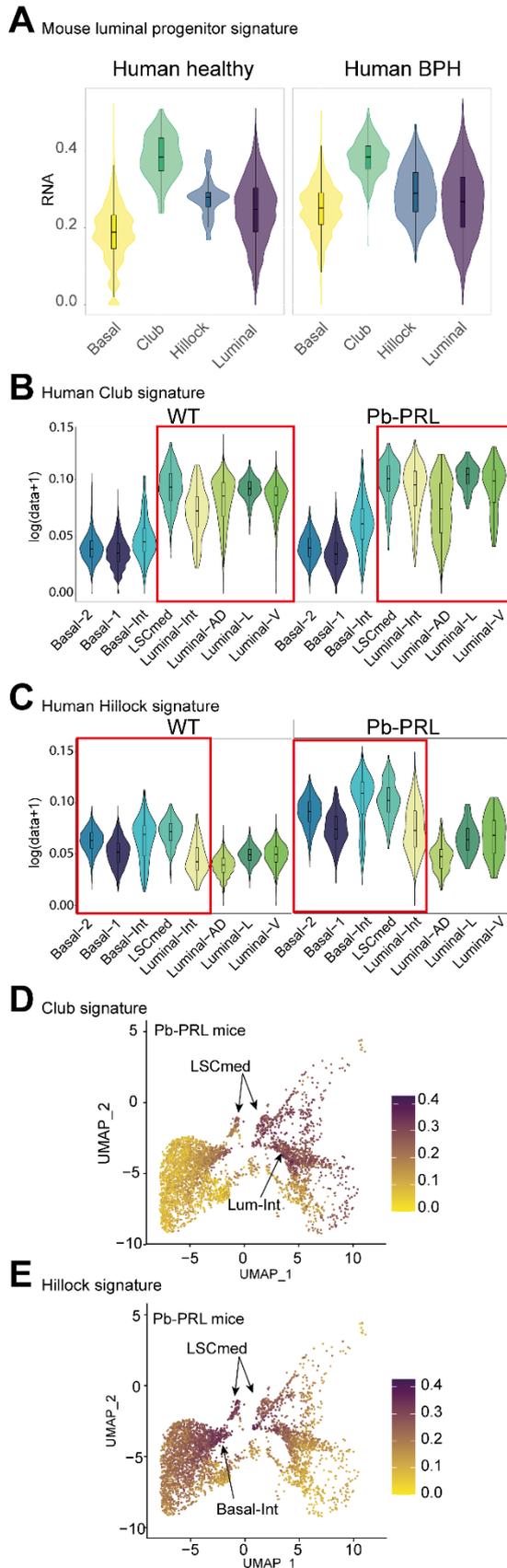
In WT mice, this LSC<sup>med</sup>/luminal progenitor signature marked a small scRNAseq cluster corresponding to the ~5% of epithelial cells enriched by cell sorting (**Figure 2A**) and was logically named LSC<sup>med</sup> (**Figure 2B**). In Pb-PRL prostates, the luminal progenitor signature marked a second group of cells identified as part of the LSC<sup>med</sup> cluster (**Figure 2B**). In addition, there was a global trend for the enrichment of LSC<sup>med</sup> genes in contiguous Lum-Int and Basal-Int clusters (**Figure 2B,C**). Enrichment analysis of the top 25 genes of these two clusters in the transcriptomes of FACS-sorted LSC<sup>med</sup> and basal cell populations (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/studies/S-BSST1128>; last accessed date 13<sup>th</sup> September 2023) suggested that, in Pb-PRL mice, Basal-Int cells preferentially segregate with basal cells while Lum-Int cells segregate with both sorted LSC<sup>med</sup> and basal cells (**Figure 2D,E**). This data supports that the enrichment of basal and LSC<sup>med</sup> cells observed in sorting profiles of Pb-PRL prostates (**Figure 2A**) is due, at least in part, to the co-segregation of disease-associated Basal-Int and Lum-Int cells.



**Figure 2: Cell sorting-scRNASeq correspondence of BPH-associated epithelial cell populations.** (A) Representative cell sorting profile of 3 WT and 3 Pb-PRL mouse prostates using CD49f and SCA-1 cell markers. (B-C) LSC<sup>med</sup> cell location in the epithelial clusters for both WT (n=3) and Pb-PRL (n=2) genotypes shown as UMAP (B) and violin plots (C). Genes of the signature are listed in Table S1. (D-E) Enrichment of the top 25 genes of Basal-Int and Lum-Int clusters in the transcriptome of LSC<sup>med</sup> (D) and basal (E) cells sorted from 3 WT and 3 Pb-PRL mice, as indicated.

In agreement with our former reports<sup>27, 28</sup>, the mouse luminal progenitor signature was enriched in Club and Hillock cells of the human prostate, especially in BPH-associated Club cells (**Figure 3A**; clustering shown in supplemental **Figure S6**). Reciprocally, the human Hillock and Club signatures (supplemental **Table S1**) were enriched in mouse LSC<sup>med</sup> cells (**Figure 3B-E**).

More globally, both signatures were enriched in Pb-PRL prostates, on the basal side (including Basal-Int) for the Hillock signature (**Figure 3C,E**), and on the luminal side (including Lum-Int) for the Club signature (**Figure 3B,D**). Together, these data assess that Pb-PRL mouse prostates are enriched in features of cells that have been associated with human prostate aging and pathogenesis<sup>30, 31</sup>



**Figure 3: Mouse-human correspondence of BPH-associated epithelial cell populations.** (A) Violin plot of the epithelial compartment of human prostate (healthy and BPH) showing an enrichment of the LSC<sup>med</sup> score in Hillock and Club cell clusters. (B-E) Reciprocally, the Club (B,D) and Hillock (C,E) signatures were found to be enriched in LSC<sup>med</sup>-positive cells of the Pb-PRL mouse prostate. Genes of the signatures are listed in Table S1.

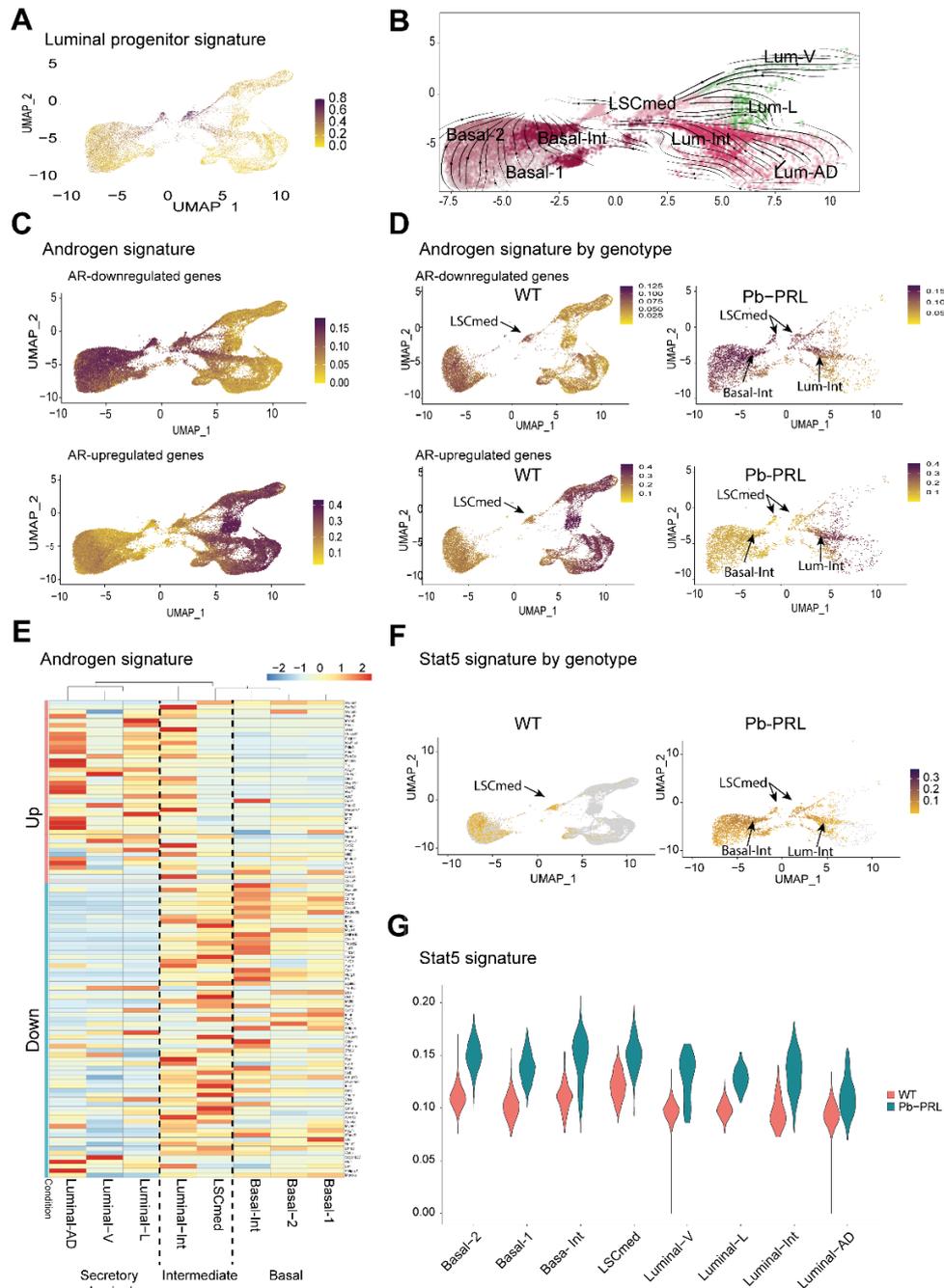
**BPH-associated epithelial clusters overlap altered androgen and STAT5 signaling**

The overlap of the LSC<sup>med</sup> signature with the cell continuum linking basal and luminal cell clusters in Pb-PRL prostates (**Figure 2B** right panel and **Figure 4A**) led us to investigate possible trajectories between them. As shown in **Figure 4B** (whole prostate shown in supplemental **Figure S7A**), scVelo analysis proposed trajectories connecting secretory luminal cells to the LSC<sup>med</sup> cluster, directly and/or through Lum-Int cells. In the basal compartment, the Basal-Int cluster was connected to the LSC<sup>med</sup> compartment as well as to Basal 1 and Basal 2 clusters. This analysis indicates that cells enriched in LSC<sup>med</sup> genes may act as a central hub integrating various

transitional cell states in diseased Pb-PRL prostates. This behavior was also suggested by the gradient of expression of some cluster-specific genes (supplemental **Figure S7B**).

Androgen signaling downregulation has been shown to induce prostatic epithelial cell plasticity in WT mice<sup>49</sup>. In line with this, expression of *Ar* and 5 $\alpha$ -reductase was decreased in Pb-PRL prostate tissue (supplemental **Figure S8A-C**). Androgens regulate target genes both positively and negatively<sup>52</sup>. Both signatures expectedly displayed a mirror image with upregulated genes mainly expressed in the luminal cell compartment, and downregulated genes mainly expressed in the basal compartment (**Figure 4C,D**). LSC<sup>med</sup> cells have intrinsically low androgen signaling<sup>23</sup>. Lum-Int cells exhibited a pattern half-way between LSC<sup>med</sup> and luminal cells (**Figure 4E**), further supporting they constitute a hinge in the epithelial cell continuum of Pb-PRL prostates. In addition to these cell-specific profiles, androgen signaling was globally decreased in Pb-PRL compared to WT prostate epithelium as highlighted by the higher level of AR-repressed genes in Pb-PRL *versus* WT prostates (supplemental **Figure S8D**). This was not due only to the enrichment in low androgen-signaling cells (Basal-Int, LSC<sup>med</sup>, Lum-Int) at the expense of high androgen-signaling cells (secretory luminal), but also to reduced androgen signaling in cognate cell compartments, e.g. basal and LSC<sup>med</sup> clusters (**Figure 4D** and supplemental **Figure S8D**).

Cell-autonomous JAK/STAT signaling has also been shown to regulate prostatic epithelial cell plasticity in inflammatory context<sup>53</sup>. STAT5 is the canonical PRLR signaling pathway in the prostate<sup>17, 22</sup>. In WT mice, the PRLR reactome (including *Prlr*) was highly expressed in the luminal epithelium, but in the absence of local PRL expression, no STAT5 signaling was detected<sup>22, 24</sup> (**Figure 4F,G** and supplemental **Figure S9A-D**). In Pb-PRL mice, PRLR/STAT5 signaling is triggered in the luminal epithelium by locally-produced PRL (**Figure 4F**). The shift of PRLR reactome expression from luminal cells in WT prostates, to Lum-Int cells in Pb-PRL mice (supplemental **Figure S9B,C**), suggests a functional role of PRLR/STAT5 signaling in epithelial cell reprogramming in this BPH model. Of note, based on *Prlr* and PRLR reactome expression pattern, STAT5 signaling detected in the basal compartment in both genotypes is most likely triggered by other cytokines than PRL. Together, the almost superimposable pattern of LSC<sup>med</sup>, AR-repressed and STAT5 signatures strongly suggests the contribution of these two pathways to the emergence of intermediate/LSC<sup>med</sup> cells in Pb-PRL prostates.

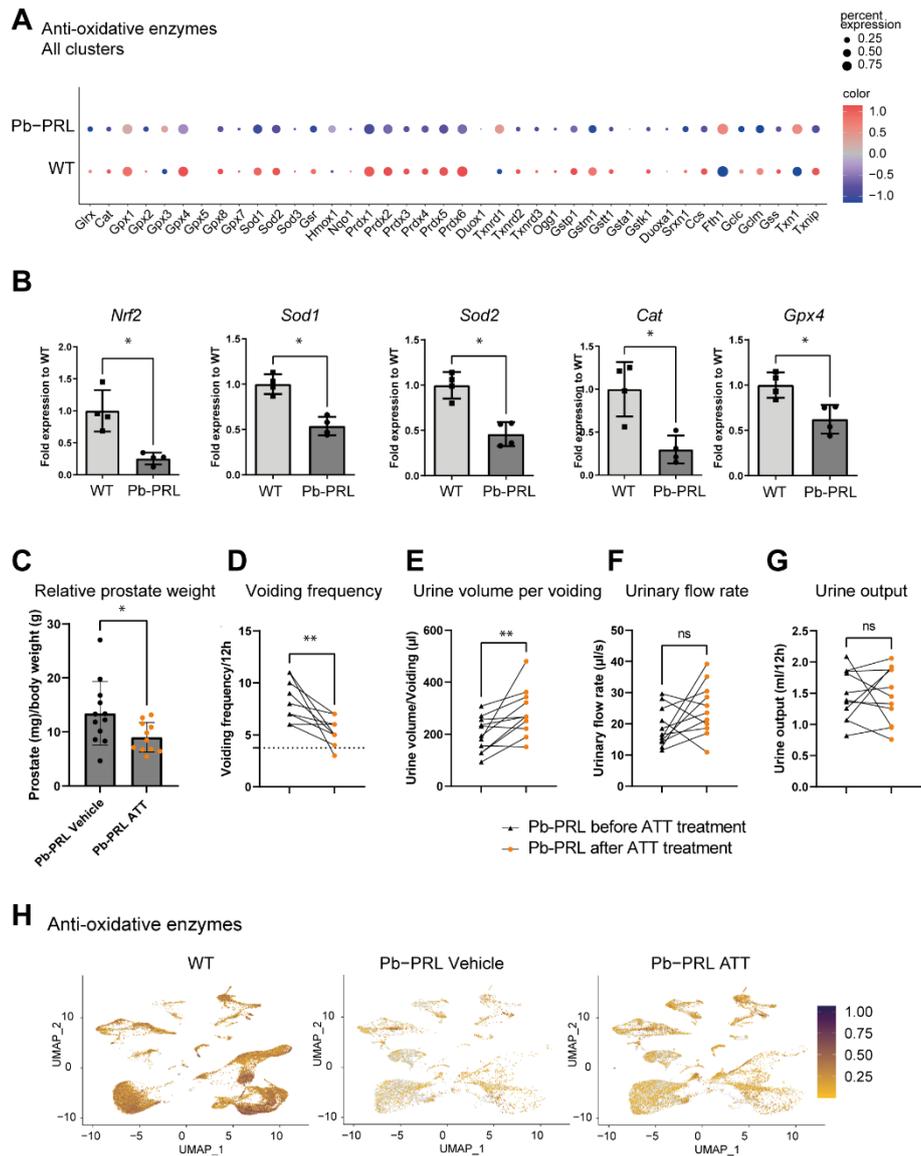


**Figure 4: BPH-associated epithelial cell clusters overlap with altered androgen and STAT5 signaling.** (A) LSC<sup>med</sup> signature score in the epithelium of the mouse dataset (n=7 mice). (B) The velocity vector field displayed as streamlines of the epithelial population in mice, showing the central role of LSC<sup>med</sup>-positive cells in the epithelial plasticity. (C) Upregulation of AR signaling (bottom) is found in luminal cells while AR downregulation (top) characterizes basal cells (all mice). (D) Same as in C shown per genotype (3 WT and 2 Pb-PRL) (E) Heatmap of the pseudo-bulk expression of the regulators of the androgen genes. Hierarchical clustering of the clusters was computed with a Pearson's correlation as a distance, and the genes were grouped in UP and DOWN based on AR-mediated regulation of their transcription. (F,G) Level of STAT5 signaling in the different genotypes, visualised as UMAP (F) and violin plot (G) in WT (n=3) vs Pb-PRL mice (n=2). Genes of the signatures are listed in Table S1.

### **Pb-PRL mice are responsive to antioxidant therapy**

Like in human BPH, Pb-PRL mouse prostates displayed features of oxidative stress as the level of expression of antioxidant enzymes was uniformly decreased in Pb-PRL mice compared to WT animals (**Figures 4A and H**). This was confirmed by RT-qPCR analysis of key antioxidant enzymes including the chief transcription factor *Nrf2*, *Gpx4*, *Sod1*, *Sod2* and *Cat* (**Figure 5B**). Thus, the Pb-PRL model was appropriate to investigate the potential benefit of antioxidant therapy in BPH.

Anethole trithione (ATT), a drug marketed in several countries for its choleric and sialogogic properties<sup>54</sup>, is a specific inhibitor of reactive oxygen species (ROS) production at the Iq site of the mitochondrial respiratory chain. As such, it is assumed to preserve mitochondria activity and integrity in contrast to unspecific antioxidant molecules acting as ROS scavenger<sup>55</sup>. As shown in **Figure 5C**, one month of daily ATT treatment of Pb-PRL mice led to a significant decrease of prostate weight, but not of urinary bladder and urethral tissue weight (Supplemental **Figure S10A**). Compared to pre-treatment values, chronic antioxidant treatment resulted, in the dark period, in significant reduction in voiding frequency and concomitant increase in urine volume per voiding, and in a trend (8 out of 11 mice) to increased urinary flow rate (**Figure 5 D-G**). ATT had no effect on micturition duration and urine output, and vehicle failed to affect any parameter (Supplemental **Figure S10B**). Together, these data demonstrate the therapeutic benefit of antioxidant therapy in this model. The histology of Pb-PRL prostates did not show any sign of marked alteration after ATT treatment (Supplemental **Figure S11A**). Also, STAT5 and AR signaling were not much affected by the treatment. At best, nuclear pSTAT5 immunostaining was slightly decreased in the epithelium of anterior and dorsal lobes (i.e. the two lobes where it is the most highly activated in Pb-PRL mouse prostates) but it remained at such a high level that the STAT5 signaling signature was not impacted (Supplemental **Figure S11B-D**). Similarly, both up and down AR signaling signatures were unchanged. In agreement, nuclear AR immunostaining in the epithelium, earlier shown to be of lower intensity in Pb-PRL *versus* WT mice<sup>23</sup>, was unaffected by ATT treatment (supplemental **Figure S11E-G**). Single cell RNAseq analysis of prostates from vehicle- *versus* ATT-treated Pb-PRL mice showed only mild changes in cluster distribution, at best a slight decrease in the prevalence of disease-associated clusters Lum-Int, Basal-Int and myofibroblasts could be observed (supplemental **Figure S12A-C**). Noticeably, the expression pattern of antioxidant enzymes was partially restored under ATT treatment (**Figure 5H**), including in epithelial cells.



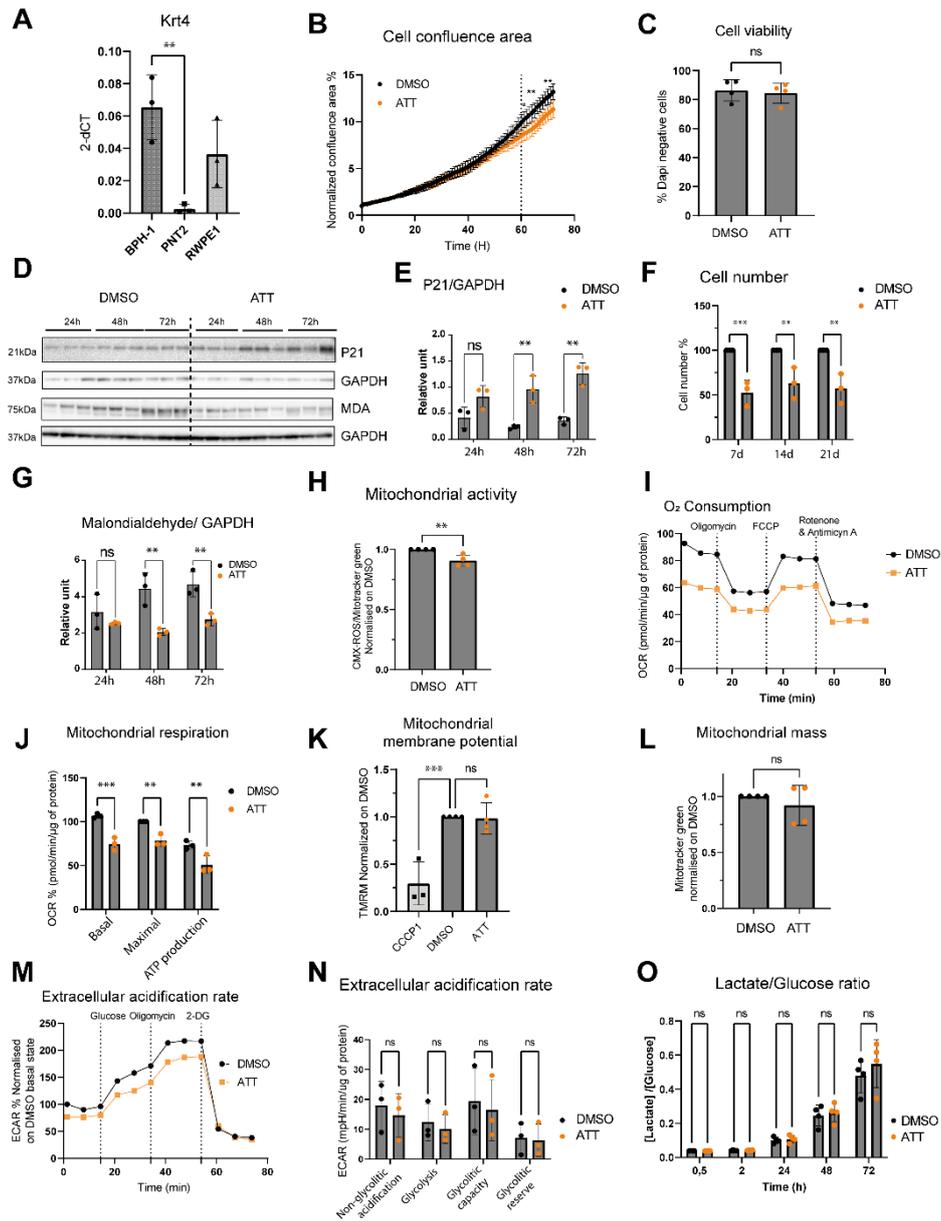
**Figure 5: Pb-PRL mice are responsive to ATT therapy.** (A) The comparison of the expression of the anti-oxidative enzymes between 3 WT and 2 Pb-PRL mice highlights a decrease in overall expression in Pb-PRL mice. (B) RT-qPCR analysis of selected anti-oxidative enzymes (*Gpx4*, *Sod1*, *Sod2*, *Cat*) and transcription factor (*Nrf2*) expressed in ventral prostates of 4 Pb-PRL versus 4 WT untreated mice (data normalized to WT). Error bars represent S.D., and stars denote significant differences (\* $p < 0.05$ ) in t-test. (C) Prostate (mg) /mouse (g) weight ratio in Pb-PRL mice after one-month ATT versus vehicle treatment. Error bars represent standard deviations, and stars denote significant differences (\* $p < 0.05$ ) in Mann-Whitney test. (D-G) Evolution of various urodynamic parameters (as indicated) of Pb-PRL mice measured during the dark period before (baseline) vs after one-month ATT treatment. Stars denote significant differences (\*\* $p < 0.01$ , ns: not significant) in Wilcoxon test. See Figure S10 for vehicle treatment. Dotted line in D represents averaged voiding frequency in 6-month-old WT mice. (H) UMAP representation of anti-oxidative enzyme expression split by genotype and treatment (3 WT, 2 Pb-PRL Vehicle and 2 Pb-PRL ATT). Genes of the antioxidant signature are listed in Table S1.

### **ATT reduces proliferation and mitochondrial metabolism of BPH-1 cells**

We then used the BPH-1 cell line to investigate the effect of ATT on BPH epithelial cells<sup>56</sup>. Based on its keratin profile<sup>56</sup> this cell line has been described as luminal<sup>56</sup>. Its androgen insensitivity conjugated to the expression of typical luminal progenitor cell markers such as *KRT7*<sup>56</sup> and *KRT4* (**Figure 6A**), suggests it can be used as a model of LSC<sup>med</sup>/Club-like cells. After 60h ATT treatment, a decrease in cell confluence was observed by Incucyte<sup>®</sup> analysis without alteration of cell viability (**Figure 6B,C** and supplemental **Figure S13A**). This effect was concomitant to increase in p21 protein levels (**Figure 6D,E**) and persisted over 3 weeks of chronic ATT treatment (**Figure 6F** and supplemental **Figure S13B**).

ATT treatment has been shown to decrease mitochondrial ROS production on isolated rat heart mitochondria<sup>55</sup>. In BPH-1 cells, ATT reduced the level of malondialdehyde, a marker of oxidative stress (**Figure 6D,G**). We hypothesized that the reduction of cell growth under ATT treatment could be related to cell metabolism impairment. After 72 h of treatment, we observed a decrease in mitochondrial activity measured by flow cytometry (**Figure 6H**). This was confirmed by a significant decrease in mitochondrial respiration measured by oxygen consumption rate (OCR) using Seahorse BioAnalyser: basal mitochondrial respiration, maximal respiration and ATP production were all downregulated (**Figure 6I,J**). ATT treatment affected neither mitochondrial membrane potential nor mitochondrial mass (**Figure 6K,L**). BPH-1 cells did not compensate the decrease in mitochondrial activity by upregulating glycolysis, as the extracellular acidification rate remained similar between control and treated cells (**Figure 6M,N**). The lack of glycolysis alteration by ATT treatment was also confirmed by measuring the extracellular lactate/glucose concentration ratio (**Figure 6O**).

Similar assays performed using the human myofibroblastic WPMY-1 cell line showed that ATT also affected the mitochondrial respiration (OCR) in this cell type, with a significant effect on mitochondrial membrane potential and a trend towards reduction of mitochondrial mass and activity (Supplemental **Figure S14A-E**). ATT-induced accumulation of lactate in culture medium was observed from 48 h of treatment (Supplemental **Figure S14F**), which may explain it was not observed in short-term seahorse experiments performed in fresh medium (Supplemental **Figure S14G,H**).



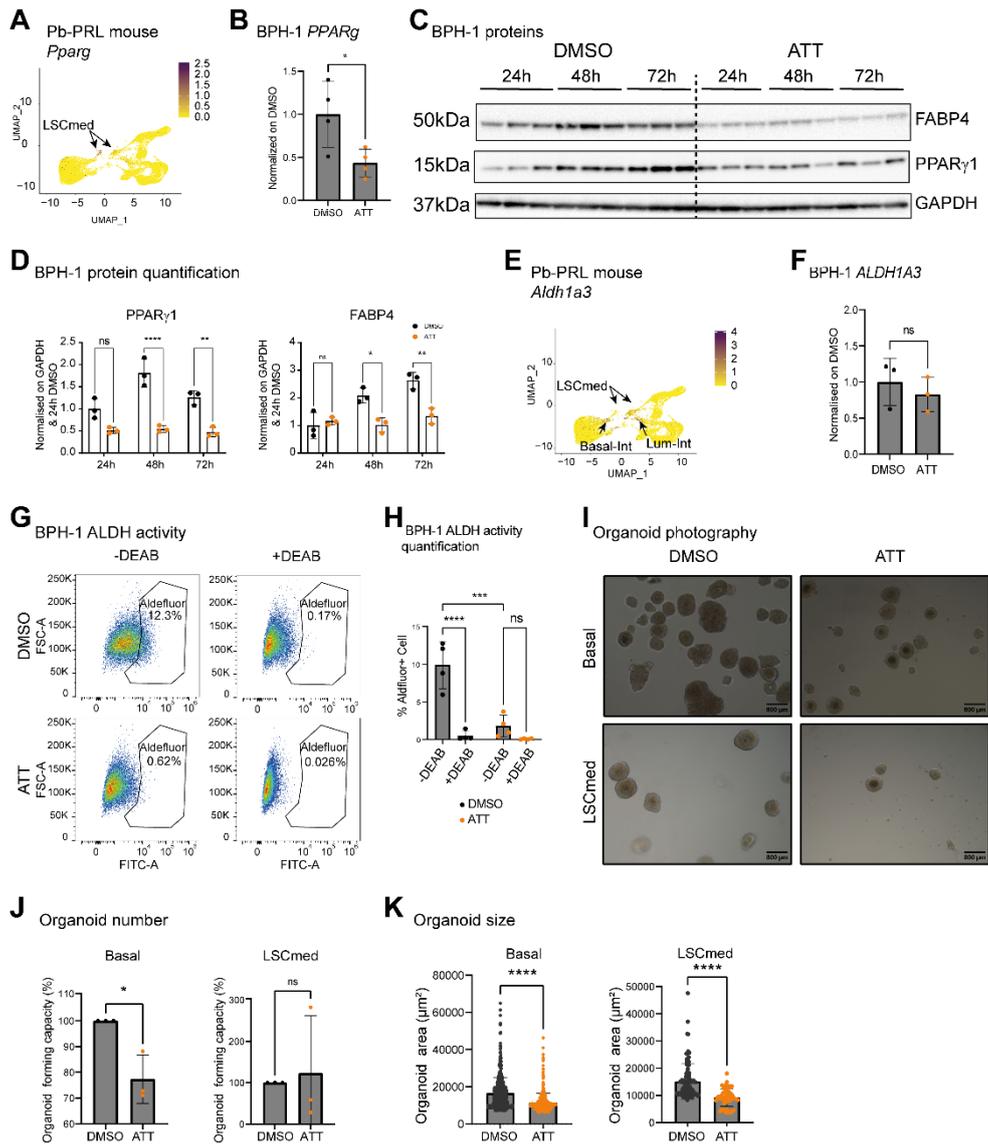
**Figure 6: ATT reduces oxidative stress, cell proliferation and mitochondrial metabolism in BPH-1 cells.** (A) mRNA expression of the LSC<sup>med</sup> cell marker *KRT4* measured by RT-qPCR (n=3) in three benign human prostatic epithelial cell lines: BPH-1 derived from a BPH patient, and PNT2 and RWPE1 derived from healthy donors. (B) Mean cell confluence area in BPH-1 cells treated with 10 μM ATT versus DMSO, normalized to day 0 (n=3). Scans were acquired every hour for 72h using IncuCyte (see Figure S11). (C) Percentage of live BPH-1 cells treated for 72h with 10 μM ATT versus DMSO measured by flow cytometry using DAPI (n=4). (D) Immunoblot of P21, malondialdehyde (MDA), and for each, of GAPDH, after 24h, 48h and 72h of treatment with 10 μM ATT versus DMSO (n=3). The dotted line separates DMSO and ATT samples loaded on the same gel (E) Quantification of P21 versus GAPDH proteins shown in D. (F) BPH-1 cell numeration (Malassez cell) after 7, 14 and 21 days of chronic treatment with 10 μM ATT versus DMSO (treatment renewed every three days). (G) Quantification of malondialdehyde versus GAPDH proteins shown in D. (H, K, L) Relative median fluorescence intensity (MFI) measured

by flow cytometry of CMX-ROS (H), TMRM (K) and MitotrackerGreen (L) probes in BPH-1 cells after 72h ATT (10  $\mu$ M) treatment (n=4). Each experiment is normalized to DMSO, and CMX-ROS MFI is also normalised to MitotrackerGreen MFI. (I) Representative BPH-1 cell O<sub>2</sub> consumption rate (OCR) after 72h of ATT (10  $\mu$ M) treatment measured by Seahorse. (J) Quantification of OCR in BPH-1 cells after 72h of ATT (10  $\mu$ M) treatment, each point represents the mean OCR measured for 4 to 8 technical replicates and the maximal respiration is normalized to 100% (n=3). (M) Representative BPH-1 cell extracellular acidification rate (ECAR) after 72h of ATT (10  $\mu$ M) treatment measured by Seahorse. Cells were incubated in fresh ATT-free Seahorse medium 1 h before recording (T0). (N) Quantification of ECAR in BPH-1 cells after 72h ATT (10  $\mu$ M) treatment, each point represents the mean of 4 to 8 technical replicates (n=3). (O) Ratio of extracellular lactate *versus* glucose concentration after 30 min, 2 h, 24 h, 48 h and 72 h of ATT (10  $\mu$ M) treatment (n=4). Each lactate and glucose concentration is normalized to the extracellular protein concentration. Error bars represent standard deviations, and stars denote significant differences (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ns: not significant) in t-test (A,C,H,L), one-way (K) or two-way ANOVA (B,E,F,G,J,N,O) analyses.

This data may suggest mild upregulation of glycolysis under ATT, which could explain the absence of impact on WPMY-1 cell proliferation (Supplemental **Figure S14I,J**). Together these data suggest that ATT affects mitochondrial metabolism in both epithelial and myofibroblastic prostate cell lines, with different outcomes on cell proliferation depending on compensatory upregulation of glycolysis.

### **ATT interferes with progenitor hallmarks of epithelial cells**

Despite of relatively mild transcriptomic effects, short-term (72h) treatment of BPH-1 cells with ATT affected various disease- and metabolism-related functions including free radical scavenging (supplemental **Figure S15A-C**). Strikingly, the most affected genes included markers of LSC<sup>med</sup>/Club/Hillock cells (e.g. *ALDH1A3*, *PPARG*, *KRT13*)<sup>23, 29, 57, 58</sup> (supplemental **Figure S15D**). In the prostate epithelium, *PPARG* is mainly expressed in luminal progenitor-like cells (mouse LSC<sup>med</sup> and human Club/Hillock) (**Figure 7A** and supplemental **Figure S15E,F**), and mouse studies have suggested its involvement in epithelial cell differentiation<sup>59</sup>.



**Figure 7: ATT interferes with progenitor hallmarks of epithelial cells.** (A-D) Analysis of *PPAR $\gamma$* . (A) Expression of *Pparg* in the epithelial subset of Pb-PRL-vehicle mice (n=2). (B) mRNA expression of *Pparg* measured by RT-qPCR (n=3) in BPH-1 cells treated for 72h with 10  $\mu$ M ATT *versus* DMSO (n=4). (C) Immunoblot of *PPAR $\gamma$ 1*, *FABP4* and *GAPDH* proteins after 24h, 48h and 72h of treatment with 10  $\mu$ M ATT *versus* DMSO (3 independent samples shown). The dotted line separates DMSO and ATT samples loaded on the same gel. (D) Quantification of *PPAR $\gamma$ 1*/*GAPDH* and *FABP4*/*GAPDH* ratios normalized to the 24h DMSO condition. (E-H) Analysis of *ALDH1A3*. (E) Expression of *Aldh1a3* in the epithelial subset of Pb-PRL-vehicle mice (n=2). (F) mRNA expression of *ALDH1A3* measured by RT-qPCR (n=3) in BPH-1 cells treated for 72h with 10  $\mu$ M ATT *versus* DMSO (n=4). (G) Representative experiment showing ALDH activity in BPH-1 cells after 72h of ATT *versus* DMSO treatment by flow cytometry using Aldefluor kit. DEAB is an ALDH activity inhibitor used to delineate the ALDH activity positive gate named Aldefluor. (H) Percentage of Aldefluor-positive BPH-1 cells after 72h of treatment. Each point represents the mean of 3 technical replicates (n=4). (I-K) Organoid assay. (I) Representative images of organoids derived from basal and LSC<sup>med</sup> cell sorted from 3 non-treated Pb-PRL mice

(n= 3 independent experiments). Images were taken by light inverted microscope EVOS 5000 at 10X magnification after 10-day treatment with ATT or DMSO (scale bar = 800  $\mu$ m). Treatments were started one day after the cell seeding and renewed with fresh media every other day for 10 days. Quantification of the number of organoids (J) and organoid size (K) is shown. Each point in panel K represents a single organoid. Errors bars represent standard deviations and stars denote significant differences (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001, ns: not significant) in t-test (B,F,J), Mann-Whitney (K) or two-way ANOVA (D,H) analyses.

*PPARG* expression in Club cells was increased in BPH versus healthy human prostate (supplemental **Figure S15F**). The ATT-induced reduction of *PPARG* expression in BPH-1 cells was confirmed by RT-qPCR (**Figure 7B**) and immunoblot (PPAR $\gamma$ 1 isoform), and the downregulation of its transcriptomic target FABP4 assesses the functional downregulation of this pathway by ATT (**Figure 7C,D**).

ALDH1A3 is tightly correlated to cell stemness<sup>60</sup>, and high ALDH activity is a functional marker of mouse prostate stem/progenitor cells<sup>61</sup>. In the human prostate, *ALDH1A3* is expressed in luminal and Club/Hillock cells and in the mouse, it is mostly expressed in disease-associated Basal-Int, LSC<sup>med</sup> and Lum-Int clusters (**Figure 7E**, and supplemental **Figure S15E,F**). In contrast to *ALDH1A3* expression measured by RT-qPCR (**Figure 7F**), treatment of BPH-1 cells by ATT drastically affected ALDH enzymatic activity as assessed in the Aldefluor assay (**Figure 7G,H**).

The alteration of PPAR $\gamma$  and ALDH pathways suggested that ATT may interfere with the properties of progenitor-like cells. To address this hypothesis, we generated organoids from basal and LSC<sup>med</sup> cells FACS-enriched from Pb-PRL prostates (**Figure 7I**). While ATT treatment had mild (basal) or inconsistent (LSC<sup>med</sup>) effect on organoid forming capacity (**Figure 7J**), a robust and highly significant inhibitory effect on organoid growth was noticed for both cell types (**Figure 7K**). Together, these data indicate that ATT impairs the growth of BPH-associated progenitor-like epithelial cells.

## Discussion

Emerging evidence indicates that the prostate epithelium of the aging male, including the BPH condition, is progressively populated with luminal cells displaying low androgen signaling. Referred to as TROP2+ luminal cells in the mouse<sup>57, 62</sup>, and CD38<sup>low</sup> luminal cells<sup>57, 58</sup> or Club cells<sup>29-31</sup> in humans, these cells largely overlap with LSC<sup>med</sup> cells (for a review, see Ref<sup>28</sup>). As a consequence of their tolerance to low androgen conditions, these cells presumably contribute to therapeutic resistance as supported by the increased prevalence of LSC<sup>med</sup> cells in castrated mice<sup>23, 26, 30, 49</sup>, and of Club-like cells in 5-ARI-treated human BPH<sup>32</sup>. In both species, luminal cell reprogramming into LSC<sup>med</sup>/Club-like cells triggered by androgen signaling manipulation has been proposed as the underlying mechanism<sup>32, 49</sup>. Is cell plasticity also driving LSC<sup>med</sup>-like cell amplification during BPH pathogenesis? The identification of several intermediate cell states between luminal and basal lineages in Pb-PRL mouse prostates supports this hypothesis. In these mice, intraprostatic androgen signaling is decreased (this study) while STAT5 signaling is increased compared to WT mice<sup>19, 22</sup>. *Stat5* knock-down in prostatic luminal cells of Pb-PRL mice reduces luminal cell depletion as well as other BPH hallmarks<sup>22</sup>. At the single cell level, the present study shows that LSC<sup>med</sup>, STAT5 and AR-repressed gene signatures almost perfectly overlap, suggesting functional connections. Are these pathways also involved in human BPH pathogenesis? It is at present unknown. One can note, however, that circulating testosterone levels decline with age<sup>63</sup> when BPH and Club cell prevalence increases. Also, STAT5 signaling triggered by the inflammatory cytokine CCL5 has been proposed to promote BPH epithelial cell proliferation in low-androgen conditions<sup>64</sup>. Further studies are required to decipher the molecular circuitry integrating these pathways in BPH, including potential reciprocal regulation.

How could LSC<sup>med</sup>/Club-like cells contribute to BPH pathogenesis? Beyond their survival advantage over luminal cells in low-androgen conditions, LSC<sup>med</sup>-like cells are also more proliferative, exhibit higher organoid-forming capacity and form larger prostaspheres and organoids<sup>24, 26, 28, 57</sup>. These properties support their contribution to hyperplasia and hypertrophy of the peri-urethral (transition) prostate area ultimately leading to compression of the urethra. In this context, while 5-ARI treatment appears to favor Club-like cell expansion by cell plasticity, the identification of alternative therapeutic strategies targeting these cells

(or luminal cell reprogramming) seems appropriate. This study shows that the antioxidant compound ATT prevented the growth of organoids generated from Pb-PRL LSC<sup>med</sup> and basal cells, i.e. the two epithelial cell compartments amplified in cell sorting (**Figure 2A**), as well as the proliferation of LSC<sup>med</sup>-like human BPH-1 cells. These growth-inhibitory effects may result from reduced mitochondrial metabolism under ATT. Based on altered ALDH activity of BPH-1 cells and organoid-forming capacity of Pb-PRL basal cells, ATT may also affect the progenitor properties of BPH-associated cells. Importantly, one-month antioxidant therapy with ATT reduced prostate weight and partly reversed the urodynamic disturbances exhibited by Pb-PRL mice. This is to our knowledge the first report showing that a drug affecting the growth of androgen-independent LSC<sup>med</sup>-like cells also improves BPH symptoms *in vivo*. Given the wide panel of cells presumably affected by ATT, alternative mechanisms involving other cell compartments may also contribute to this therapeutic benefit.

Other antioxidant compounds have been recently reported as candidates for BPH therapy. These include mitoquinone, a mitochondria-targeted drug<sup>65</sup>, and apocynin, an NADPH oxidase inhibitor<sup>66</sup>. Both were shown to reduce cell proliferation, inflammatory hallmarks and prostate weight gain in a rat model of testosterone-induced prostate enlargement. No data, however, was provided on urodynamic parameters. Both compounds were shown to inhibit AR signaling, therefore one might predict that long-term therapy could ultimately increase the prevalence of androgen-independent Club-like cells by luminal cell plasticity, as observed with 5-ARI<sup>32</sup>. Such an outcome is not expected with ATT treatment. As mentioned, ATT has been used for decades as a treatment of xerostomia<sup>67, 68</sup> and it is well tolerated. Based on that data, we tentatively propose the following steps to validate ATT as a treatment for BPH. First, retrospective cohorts of patients treated with ATT for xerostomia should be analyzed to address the expected lower prevalence of urinary symptoms compared to the general population. This preliminary work should allow to collect specific data on these patients, including hydration habits (considering their xerostomia) as hydration can affect urinary symptoms. Second, a clinical trial should be developed to evaluate the efficacy of ATT in BPH treatment. Treatment-naive patients with symptomatic BPH should be randomized double-blind in 2 arms (ATT *versus* placebo), with improvement of urinary symptoms (IPSS score) as the primary endpoint. If ATT efficacy can be demonstrated, a comparative study involving ATT

and  $\alpha$ -blockers, the most widely used treatment worldwide, could then be proposed. As reported in former reference trials of BPH treatments<sup>5, 6</sup>, such a study should benefit for a long-term follow-up, including IPSS and flow rate evaluation at one and four year. Secondary endpoints should include sexual side effects and patient satisfaction. A non-inferiority trial compared to  $\alpha$ -blockers would be sufficient, considering that side effects are lower with ATT (especially retrograde ejaculation). Finally, in light of our results showing that ATT alters the progenitor properties of androgen-independent cells, a similar trial involving 5-ARI instead of  $\alpha$ -blockers may also be considered. In particular, it would be interesting to assess whether ATT could counteract the exhaustion of effect observed with long-term 5-ARI treatment, which we hypothesize to be causally related to the luminal-to-Club-like cell transition induced by the drug<sup>32</sup>. If so, such a drug combination may delay surgery in case of failure of 5-ARI treatment, with important socioeconomical impact.

This study faces some limitations. One major issue in the BPH field is the paucity of experimental models to address disease mechanisms and drug efficacy. BPH-1 is to our knowledge the only prostatic epithelial cell line generated from a BPH patient<sup>56</sup>. However, although its LSC<sup>med</sup>-like features are appealing, the intrinsic features of this T antigen-immortalized cell line call for confirmation of experimental findings in more relevant models, e.g. organoids generated from primary BPH cells. This issue is even more challenging for stromal cells, as we are not aware of any fibroblastic model generated from acknowledged BPH. This is the reason why we used the healthy, T antigen-immortalized WPMY-1 cell line to address the effects of ATT on myofibroblastic cells. Regarding *in vivo* studies, in contrast to prostate cancer for which the majority of preclinical research worldwide involves a few mouse models carrying the most frequent genetic alterations observed in patients<sup>69</sup>, there is currently no reference model for BPH. Indeed, many animal models of BPH models are difficult to handle, or even considered to be inconsistent with real state<sup>33</sup>. For example, although the above-mentioned testosterone-induced prostate enlargement rat model shows increased voiding frequency and reduced volume per voiding, it is known that in humans androgen levels decline in the elderly, when BPH prevalence increases<sup>70</sup>. In this context, former reports have shown that the histopathological alterations of Pb-PRL mouse prostates mirror human BPH<sup>15, 17-22</sup>. This study provides additional evidence supporting the relevance of this mouse model: i)

its micturition characteristics recapitulate the symptoms of urinary hesitancy and frequency seen in BPH patients; ii) their prostates present increased vulnerability to oxidative stress, as proposed in the human disease; and iii) their epithelium is heterogeneous and contains various Club/Hillock-like cell states exhibiting low androgen signaling, reminiscent of what is observed in the pathogenesis and therapeutic resistance of human BPH. Thus, although the involvement of PRL/STAT5 in human BPH remains to be established<sup>17</sup>, the Pb-PRL mouse is a useful preclinical BPH model to investigate the mechanisms contributing to disease development, including cell plasticity, and to challenge new therapeutic strategies as recently shown for anti-inflammatory compounds<sup>34</sup>, and in this study, for antioxidant therapy.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the personnel of the technological core facilities including animal housing (Sarah Nadjah, Emilie Panafieu, Pierre Chérel, Olivier Claude), cytometry (Jérôme Mégret, Corinne Cordier), and histology (Sophie Berissi) of the SFR Necker (US24/UAR3633), and Sebastien Jacques from the Genom'IC facility of Cochin institute. The also thank Dr Lucila Sackmann Sala for sharing bulk transcriptomic data of Pb-PRL mouse prostate epithelial cells, and Dr Mitsuharu Yoshiyama for help with urodynamic studies and for critical reading of the manuscript.

### **Author contribution statement**

LDS, AH, MM, OP, JEG and VG conceived the study. LDS, EP, SD, ML, NP, MB, EN, FB and IN performed cell and animal experiments. LDS, FC and NC and MM performed bioinformatic analyses. LDS, FC, FB, SP, MM, JEG and VG validated the data. Original manuscript draft and figures were prepared by LDS, FC, SP, FB, NC, JEG and VG. All authors (but OP) were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions. Project supervision and administration were carried out by LDS, MM, JEG and VG. Funds were acquired by VG.

## References

- [1] Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A: Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011, 40:565-75, viii-ix.
- [2] Strand DW, Costa DN, Francis F, Ricke WA, Roehrborn CG: Targeting phenotypic heterogeneity in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation* 2017, 96:49-61.
- [3] Devlin CM, Simms MS, Maitland NJ: Benign prostatic hyperplasia - what do we know? *BJU Int* 2020.
- [4] Steers WD: 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 2001, 58:17-24.
- [5] McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GL, Jr., Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, McVary KT, Nyberg LM, Jr., Clarke HS, Crawford ED, Diokno A, Foley JP, Foster HE, Jacobs SC, Kaplan SA, Kreder KJ, Lieber MM, Lucia MS, Miller GJ, Menon M, Milam DF, Ramsdell JW, Schenkman NS, Slawin KM, Smith JA: The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 2003, 349:2387-98.
- [6] Roehrborn CG, Siami P, Barkin J, Damiao R, Major-Walker K, Nandy I, Morrill BB, Gagnier RP, Montorsi F, Comb ATSG: The effects of combination therapy with dutasteride and tamsulosin on clinical outcomes in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia: 4-year results from the CombAT study. *Eur Urol* 2010, 57:123-31.
- [7] Yu ZJ, Yan HL, Xu FH, Chao HC, Deng LH, Xu XD, Huang JB, Zeng T: Efficacy and Side Effects of Drugs Commonly Used for the Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms Associated With Benign Prostatic Hyperplasia. *Front Pharmacol* 2020, 11:658.
- [8] Rusu ME, Fizesan I, Vlase L, Popa DS: Antioxidants in Age-Related Diseases and Anti-Aging Strategies. *Antioxidants (Basel)* 2022, 11.
- [9] Minciullo PL, Inferrera A, Navarra M, Calapai G, Magno C, Gangemi S: Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *Urol Int* 2015, 94:249-54.
- [10] Zabaoui N, Mamed D, Lobaccaro JM, Lahouel M: Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. *Andrologia* 2016, 48:69-73.
- [11] Srivastava DS, Mittal RD: Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Indian J Clin Biochem* 2005, 20:162-5.
- [12] Merendino RA, Salvo F, Saija A, Di Pasquale G, Tomaino A, Minciullo PL, Fraccica G, Gangemi S: Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker? *Mediators Inflamm* 2003, 12:127-8.
- [13] Olinski R, Zastawny TH, Foksinski M, Barecki A, Dizdaroglu M: DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Radic Biol Med* 1995, 18:807-13.
- [14] Vital P, Castro P, Ittmann M: Oxidative stress promotes benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2016, 76:58-67.

- [15] Kindblom J, Dillner K, Sahlin L, Robertson F, Ormandy C, Tornell J, Wennbo H: Prostate hyperplasia in a transgenic mouse with prostate-specific expression of prolactin. *Endocrinology* 2003, 144:2269-78.
- [16] Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL: Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest* 1997, 99:618-27.
- [17] Goffin V, Hoang DT, Bogorad RL, Nevalainen MT: Prolactin regulation of the prostate gland: a female player in a male game. *Nat Rev Urol* 2011, 8:597-607.
- [18] Bernichtein S, Pigat N, Capiod T, Boutillon F, Verkarre V, Camparo P, Viltard M, Mejean A, Oudard S, Souberbielle JC, Friedlander G, Goffin V: High milk consumption does not affect prostate tumor progression in two mouse models of benign and neoplastic lesions. *PLoS ONE* 2015, 10:e0125423.
- [19] Rouet V, Bogorad RL, Kayser C, Kessal K, Genestie C, Bardier A, Grattan DR, Kelder B, Kopchick JJ, Kelly PA, Goffin V: Local prolactin is a target to prevent expansion of basal/stem cells in prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:15199-204.
- [20] Pigat N, Reyes-Gomez E, Boutillon F, Palea S, Barry Delongchamps N, Koch E, Goffin V: Combined Sabal and Urtica Extracts (WS((R)) 1541) Exert Anti-proliferative and Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Benign Prostate Hyperplasia. *Front Pharmacol* 2019, 10:311.
- [21] Bernichtein S, Pigat N, Camparo P, Latil A, Viltard M, Friedlander G, Goffin V: Anti-inflammatory properties of Lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon(R)) in a mouse model of prostate hyperplasia. *Prostate* 2015, 75:706-22.
- [22] Boutillon F, Pigat N, Sala LS, Reyes-Gomez E, Moriggl R, Guidotti JE, Goffin V: STAT5a/b Deficiency Delays, but does not Prevent, Prolactin-Driven Prostate Tumorigenesis in Mice. *Cancers (Basel)* 2019, 11:929.
- [23] Sackmann Sala L, Boutillon F, Menara G, De Goyon-Pelard A, Leprevost M, Codzamanian J, Lister N, Pencik J, Clark A, Cagnard N, Bole-Feysot C, Moriggl R, Risbridger GP, Taylor RA, Kenner L, Guidotti JE, Goffin V: A rare castration-resistant progenitor cell population is highly enriched in Pten-null prostate tumors. *J Pathol* 2017, 243:54-64.
- [24] Sackmann-Sala L, Chiche A, Mosquera-Garrote N, Boutillon F, Cordier C, Pourmir I, Pascual-Mathey L, Kessal K, Pigat N, Camparo P, Goffin V: Prolactin-Induced Prostate Tumorigenesis Links Sustained Stat5 Signaling with the Amplification of Basal/Stem Cells and Emergence of Putative Luminal Progenitors. *Am J Pathol* 2014, 184:3105-19.
- [25] Kwon OJ, Choi JM, Zhang L, Jia D, Li Z, Zhang Y, Jung SY, Creighton CJ, Xin L: The Sca-1(+) and Sca-1(-) mouse prostatic luminal cell lineages are independently sustained. *Stem Cells* 2020, 38:1479-91.
- [26] Kwon OJ, Zhang L, Xin L: Stem Cell Antigen-1 Identifies a Distinct Androgen-Independent Murine Prostatic Luminal Cell Lineage with Bipotent Potential. *Stem Cells* 2016, 34:191-202.

- [27] Baures M, Puig Lombardi E, Di Martino D, Zeitouni W, Pacreau E, Dos Santos L, Dariane C, Boutillon F, Guidotti JE, Goffin V: Transcriptomic Signature and Growth Factor Regulation of Castration-Tolerant Prostate Luminal Progenitor Cells. *Cancers (Basel)* 2022, 14:3775.
- [28] Baures M, Dariane C, Tika E, Puig Lombardi E, Barry Delongchamps N, Blanpain C, Guidotti JE, Goffin V: Prostate luminal progenitor cells: from mouse to human, from health to disease. *Nat Rev Urol* 2022, 19:201-18.
- [29] Henry GH, Malewska A, Joseph DB, Malladi VS, Lee J, Torrealba J, Mauck RJ, Gahan JC, Raj GV, Roehrborn CG, Hon GC, MacConmara MP, Reese JC, Hutchinson RC, Vezina CM, Strand DW: A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Rep* 2018, 25:3530-42 e5.
- [30] Joseph DB, Henry GH, Malewska A, Iqbal NS, Ruetten HM, Turco AE, Abler LL, Sandhu SK, Cadena MT, Malladi VS, Reese JC, Mauck RJ, Gahan JC, Hutchinson RC, Roehrborn CG, Baker LA, Vezina CM, Strand DW: Urethral luminal epithelia are castration-insensitive cells of the proximal prostate. *Prostate* 2020, 80:872-84.
- [31] Yan Q, Wang M, Xia H, Dai C, Diao T, Wang Y, Hou H, Zhang H, Liu M, Long X: Single-cell RNA-sequencing technology demonstrates the heterogeneity between aged prostate peripheral and transitional zone. *Clin Transl Med* 2022, 12:e1084.
- [32] Joseph DB, Henry GH, Malewska A, Reese JC, Mauck RJ, Gahan JC, Hutchinson RC, Mohler JL, Roehrborn CG, Strand DW: 5-alpha reductase inhibitors induce a prostate luminal to club cell transition in human benign prostatic hyperplasia. *J Pathol* 2021.
- [33] Zhang J, Zhang M, Tang J, Yin G, Long Z, He L, Zhou C, Luo L, Qi L, Wang L: Animal models of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2020.
- [34] Vickman RE, Aaron-Brooks L, Zhang R, Lanman NA, Lapin B, Gil V, Greenberg M, Sasaki T, Cresswell GM, Broman MM, Paez JS, Petkewicz J, Talaty P, Helfand BT, Glaser AP, Wang CH, Franco OE, Ratliff TL, Nastiuk KL, Crawford SE, Hayward SW: TNF is a potential therapeutic target to suppress prostatic inflammation and hyperplasia in autoimmune disease. *Nat Commun* 2022, 13:2133.
- [35] Lai KP, Huang CK, Fang LY, Izumi K, Lo CW, Wood R, Kindblom J, Yeh S, Chang C: Targeting stromal androgen receptor suppresses prolactin-driven benign prostatic hyperplasia (BPH). *Mol Endocrinol* 2013, 27:1617-31.
- [36] He J, Qin T, Wen J, Qin F, Li F: An HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of 4-hydroxy-anethole trithione in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2011, 54:551-6.
- [37] Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Kira S, Mizumachi R, Sokabe T, Takayama Y, Tominaga M, Takeda M: Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015, 308:F1128-34.

- [38] Sackmann-Sala L, Angelergues A, Boutillon F, d'Acremont B, Maidenberg M, Oudard S, Goffin V: Human and murine prostate basal/stem cells are not direct targets of prolactin. *Gen Comp Endocrinol* 2015, 220:133-42.
- [39] Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, Lee MJ, Wilk AJ, Darby C, Zager M, Hoffman P, Stoeckius M, Papalexi E, Mimitou EP, Jain J, Srivastava A, Stuart T, Fleming LM, Yeung B, Rogers AJ, McElrath JM, Blish CA, Gottardo R, Smibert P, Satija R: Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 2021, 184:3573-87 e29.
- [40] Joseph DB, Henry GH, Malewska A, Reese JC, Mauck RJ, Gahan JC, Hutchinson RC, Malladi VS, Roehrborn CG, Vezina CM, Strand DW: Single-cell analysis of mouse and human prostate reveals novel fibroblasts with specialized distribution and microenvironment interactions. *J Pathol* 2021, 255:141-54.
- [41] Korotkevich G, Sukhov V, Sergushichev A: Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/060012>
- [42] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:15545-50.
- [43] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003, 34:267-73.
- [44] Andreatta M, Carmona SJ: UCell: Robust and scalable single-cell gene signature scoring. *Comput Struct Biotechnol J* 2021, 19:3796-8.
- [45] La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lonnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundstrom E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV: RNA velocity of single cells. *Nature* 2018, 560:494-8.
- [46] Bergen V, Lange M, Peidli S, Wolf FA, Theis FJ: Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nat Biotechnol* 2020, 38:1408-14.
- [47] Lukacs RU, Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Witte ON: Isolation, cultivation and characterization of adult murine prostate stem cells. *Nat Protoc* 2010, 5:702-13.
- [48] Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H: Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016, 11:347-58.
- [49] Karthaus WR, Hofree M, Choi D, Linton EL, Turkecul M, Bejnood A, Carver B, Gopalan A, Abida W, Laudone V, Biton M, Chaudhary O, Xu T, Masilionis I, Manova K, Mazutis L, Pe'er D, Regev A, Sawyers CL: Regenerative potential of prostate luminal cells revealed by single-cell analysis. *Science* 2020, 368:497-505.

- [50] Crowley L, Cambuli F, Aparicio L, Shibata M, Robinson BD, Xuan S, Li W, Hibshoosh H, Loda M, Rabadan R, Shen MM: A single-cell atlas of the mouse and human prostate reveals heterogeneity and conservation of epithelial progenitors. *Elife* 2020, 9.
- [51] Kwon OJ, Zhang Y, Li Y, Wei X, Zhang L, Chen R, Creighton CJ, Xin L: Functional Heterogeneity of Mouse Prostate Stromal Cells Revealed by Single-Cell RNA-Seq. *iScience* 2019, 13:328-38.
- [52] Mulholland DJ, Tran LM, Li Y, Cai H, Morim A, Wang S, Plaisier S, Garraway IP, Huang J, Graeber TG, Wu H: Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. *Cancer Cell* 2011, 19:792-804.
- [53] Chan JM, Zaidi S, Love JR, Zhao JL, Setty M, Wadosky KM, Gopalan A, Choo ZN, Persad S, Choi J, LaClair J, Lawrence KE, Chaudhary O, Xu T, Masilionis I, Linkov I, Wang S, Lee C, Barlas A, Morris MJ, Mazutis L, Chaligne R, Chen Y, Goodrich DW, Karthaus WR, Pe'er D, Sawyers CL: Lineage plasticity in prostate cancer depends on JAK/STAT inflammatory signaling. *Science* 2022, 377:1180-91.
- [54] Pouzaud F, Christen MO, Warnet JM, Rat P: [Anethole dithiolethione: an antioxidant agent against tenotoxicity induced by fluoroquinolones]. *Pathol Biol (Paris)* 2004, 52:308-13.
- [55] Detaille D, Pasdois P, Semont A, Dos Santos P, Diolez P: An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals. *PLoS One* 2019, 14:e0216385.
- [56] Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P: Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995, 31:14-24.
- [57] Crowell PD, Fox JJ, Hashimoto T, Diaz JA, Navarro HI, Henry GH, Feldmar BA, Lowe MG, Garcia AJ, Wu YE, Sajed DP, Strand DW, Goldstein AS: Expansion of Luminal Progenitor Cells in the Aging Mouse and Human Prostate. *Cell Rep* 2019, 28:1499-510 e6.
- [58] Liu X, Grogan TR, Hieronymus H, Hashimoto T, Mottahedeh J, Cheng D, Zhang L, Huang K, Stoyanova T, Park JW, Shkhyan RO, Nowroozizadeh B, Rettig MB, Sawyers CL, Elashoff D, Horvath S, Huang J, Witte ON, Goldstein AS: Low CD38 Identifies Progenitor-like Inflammation-Associated Luminal Cells that Can Initiate Human Prostate Cancer and Predict Poor Outcome. *Cell Rep* 2016, 17:2596-606.
- [59] Strand DW, Jiang M, Murphy TA, Yi Y, Konvinse KC, Franco OE, Wang Y, Young JD, Hayward SW: PPARgamma isoforms differentially regulate metabolic networks to mediate mouse prostatic epithelial differentiation. *Cell Death Dis* 2012, 3:e361.
- [60] Federer-Gsponer JR, Muller DC, Zellweger T, Eggimann M, Marston K, Ruiz C, Seifert HH, Rentsch CA, Bubendorf L, Le Magnen C: Patterns of stemness-associated markers in the development of castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 2020, 80:1108-17.
- [61] Burger PE, Gupta R, Xiong X, Ontiveros CS, Salm SN, Moscatelli D, Wilson EL: High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells. *Stem Cells* 2009, 27:2220-8.

- [62] Freeland J, Crowell PD, Giafaglione JM, Boutros PC, Goldstein AS: Aging of the progenitor cells that initiate prostate cancer. *Cancer Lett* 2021, 515:28-35.
- [63] Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of A: Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging. J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:724-31.
- [64] Yang Y, Hu S, Liu J, Cui Y, Fan Y, Lv T, Liu L, Li J, He Q, Han W, Yu W, Sun Y, Jin J: CD8+ T cells promote proliferation of benign prostatic hyperplasia epithelial cells under low androgen level via modulation of CCL5/STAT5/CCND1 signaling pathway. *Sci Rep* 2017, 7:42893.
- [65] Jin BR, Lim CY, Kim HJ, Lee M, An HJ: Antioxidant mitoquinone suppresses benign prostatic hyperplasia by regulating the AR-NLRP3 pathway. *Redox Biol* 2023, 65:102816.
- [66] Jin BR, Kim HJ, Na JH, Lee WK, An HJ: Targeting benign prostate hyperplasia treatments: AR/TGF-beta/NOX4 inhibition by apocynin suppresses inflammation and proliferation. *J Adv Res* 2023.
- [67] Nagano T, Takeyama M: Enhancement of salivary secretion and neuropeptide (substance P, alpha-calcitonin gene-related peptide) levels in saliva by chronic anethole trithione treatment. *J Pharm Pharmacol* 2001, 53:1697-702.
- [68] Schiodt M, Oxholm P, Jacobsen A: Treatment of xerostomia in patients with primary Sjogren's syndrome with sulfarlem. *Scand J Rheumatol Suppl* 1986, 61:250-2.
- [69] Parisotto M, Metzger D: Genetically engineered mouse models of prostate cancer. *Mol Oncol* 2013, 7:190-205.
- [70] Roberts RO, Jacobson DJ, Rhodes T, Klee GG, Leiber MM, Jacobsen SJ: Serum sex hormones and measures of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2004, 61:124-31.

**Table 1.** In vivo experimentation

Experiment	Mice	Housing
Urodynamic tests		
- Pb-PRL phenotype	17 Pb-PRL <i>versus</i> 15 WT (4-7-month-old, i.e. established BPH)	CREFRE (Toulouse), SOPF health status
- ATT treatment	11 ATT-treated Pb-PRL <i>versus</i> 12 vehicle-treated Pb-PRL (12-14-month-old, i.e. advanced BPH)	
scRNAseq	2 vehicle-treated Pb-PRL (#504, #756) <i>versus</i> 2 ATT-treated Pb-PRL (#506, #748) (6-8-month-old, i.e. established BPH)	LEAT (Broussais site), conventional health status
Affymetrix of sorted epithelial cells	3 Pb-PRL mice (6-8-month-old, i.e. established BPH)	
Other studies (organoids, RT-qPCR, immunoblots, IHC, cell sorting)	Pb-PRL and WT mice (6-8-month-old, i.e. established BPH)	LEAT (Broussais & Necker sites), conventional health status

**Table 2.** Antibodies for immunohistochemistry

Proteins	Species Dilution	Demasking	DAB	Clone, reference
Ki67	Rabbit 1/150	20 min, 95°C	1 min	SP6, RBK02705, Diagomics
KRT4	Rabbit 1/150	30 min, 95°C	30 s	2F9, bsm-52062R, Bioss Antibodies (Nanterre, France)
P-Stat5	Rabbit 1/300	20 min 90°C	10 min	C11C5, Cell Signaling Technology
Anti-Rabbit	1/1,000	30 min, RT	NA	BA-1400 Vector laboratories

**Table 3.** Primers for quantitative RT-PCR

Mouse genes		Sequence
<i>Actin</i>	Forward	5'-GATGTATGAAGGCTTTGGTC-3'
	Reverse	5'-TGTGCACTTTTATTGGTCTC-3'
<i>Gpx4</i>	Forward	5'-TGGATAAGTACAGGGGTTTC-3'
	Reverse	5'-TAGCTGAGTGTAGTTTACGTC-3'
<i>Sod1</i>	Forward	5'-CACTCTAAGAAACATGGTGG-3'
	Reverse	5'-GATCACACGATCTTCAATGG-3'
<i>Sod2</i>	Forward	5'-CCATTTTCTGGACAAACCTG-3'
	Reverse	5'-GACCTTGCTCCTTATTGAAG-3'
<i>Cat</i>	Forward	5'-CTCCATCAGGTTTCTTTCTTG-3'
	Reverse	5'-CAACAGGAAGTTTTTGATG-3'
<i>Nrf2</i>	Forward	5'-TGATGGACTTGGAGTTGCC-3'
	Reverse	5'-TCAAACACTTCTCGACTTACTCC-3'
<i>Ar</i>	Forward	5'-GAGAGAGGCAGCTTGTGCAT-3'
	Reverse	5'-TACTGAATGACCGCCATCTG-3'
Human genes		
<i>ACTIN</i>	Forward	5'-AAGACCTGTACGCCAACACA-3'
	Reverse	5'-TGATCTCCTTCTGCATCCTG-3'
<i>KRT4</i>	Forward	5'-GTACAGAATGTCTGGAGAATG-3'
	Reverse	5'-TGGTAGAGATGATCTTGCTG-3'
<i>PPARg1</i>	Forward	5'-AAAGAAGCCGACACTAAACC-3'
	Reverse	5'-CTTCCATTACGGAGAGATCC-3'

**Table 4.** Antibodies for western blotting

Antigen	Species Dilution	Clone, reference
GAPDH	Mouse 1/1000 in non-fat milk 5 %	Sc-47324, Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
P21	Mouse 1/1000 in non-fat milk 5 %	Sc-6246, Santa Cruz Biotechnology
PPAR $\gamma$	Rabbit 1/1000 in BSA %	C26H12, Cell Signaling Technology
FABP4	Rabbit 1/1000 in non-fat milk 5 %	2120S, Cell Signaling Technology
MDA	Mouse 1/1000 in BSA 5 %	Ab-243066, 11E3, Abcam (Paris, France)
Anti-Rabbit	1/10,000 in non-fat milk 5%	7074S, Cell Signaling Technology
Anti-Mouse	1/10,000 in non-fat milk 5%	7076S, Cell Signaling Technology

# SUPPLEMENTA DATA

**Table S1: Transcriptomic signatures**

Name of the signature	PID_IL2_STATS_PATHWAY	AR-up	AR-down	Club	Hillock	LSCmed_like progenitor cells	PRL-reactome	Glutathione antioxidant signature	
Reference	<a href="http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/PID_IL2_STATS_PATHWAY">http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/PID_IL2_STATS_PATHWAY</a>	<a href="https://doi.org/10.1002/path.4924">https://doi.org/10.1002/path.4924</a>	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620777/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620777/</a>	<a href="https://doi.org/10.1002/path.4924">https://doi.org/10.1002/path.4924</a>	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.24020">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.24020</a>	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.24020">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.24020</a>	<a href="https://www.mdpi.com/2072-6694/14/15/3775">https://www.mdpi.com/2072-6694/14/15/3775</a>	<a href="https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/REACTOME_PROLACTIN_RECEPTOR_SIGNALING">https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/REACTOME_PROLACTIN_RECEPTOR_SIGNALING</a>	List of anti-oxidative enzymes generated by the authors
IL2RA	AR	GBP2	APBB1IP	SCGB3A1	KRT13	Krt4	BTRC	GPX1	
CCND2	SRD5A1	SPARCL1	CA3	TFF1	S100P	Psca	CSH1	GPX2	
IL4	SRD5A2	OSMR	ZFP62	MMP7	GDF15	Wfdc2	CUL1	GPX3	
PRF1	SRD5A3	CH25H	CDKN1C	RARRES1	CXCL17	Cyp2f2	GH1	GPX4	
BCL2L1	PSP94 - MSMB	ZFP36L1	AHR	AGR2	CSTB	Gsta4	GH2	GPX7	
GRB2	HSPA5	CASP4	LUM	AZGP1	CLDN4	Cbr2	GHR	GPX8	
LCK	PBSN	GADD45B	JCHAIN	GDF15	LYPD3	Tspan8	JAK2	SOD1	
CCND3	BPGM	IFIT3	RYR1	CLDN3	GPX2	Ciu	PRL	SOD2	
JAK1	GNMT	INHBB	H19	WFDC2	PLAUR	Krt19	PRLR	SOD3	
JAK3	SVS4	IGFBP3	MYL3	ZG16B	GPRC5A	Klf5	PTPN11	GSR	
ELF1	DNAJB11	AW112010	LY86	CD24	SERPINB1	Anxa3	RBX1	HMOX1	
STAT5B	FKBP11	CA8	BCL2A1	ANKRD36C	SLPI	Ppp1r1b	SH2B1	NRF2	
BCL2	SLC22A1	MGST1	IL13RA1	ELF3	ANXA1	S100a11	SKP1	FOXO	
PTPN11	PDIA6	CFH	CCL5	LMO7	SDCBP2	Krt8	STAT5A	CAT	
SOS1	PDIA4	BHLHE40	ARHGEF3	CRABP2	IL1RN	Atp1b1	STAT5B	Nqo1	
SHC1	FAM3B	CXADR	SLC22A23	ALDH1A3	MUC4			Prdx1	
CCNA2	MCOLN2	HLA-DRB5	CXCL6	LURAP1L	CLDN7			Prdx2	
LTA	TST	TACSTD2	BC12A1C	TSPAN8	EMP1			Prdx3	
IL2	AZGP1	TGIF1	ANKX8/ANKX8L1	TMCS	RAB11FIP1			Prdx4	
PIK3CA	CRABP1	THBS1	TEM45A	ADIRF	TACSTD2			Prdx5	
FOXP3	SSR3	AHNAK	IDH1	LIPI	HEBP2			Prdx6	
MYC	HSP90B1	CADPS	VSP41	TSPAN1	SDC1			Duox1	
GAB2	CRELD2	TCF21	RIN2	GPRC5A	DUSP5			Txnrd1	
IL2RG	RCN1	APOD	ANPEP	CYP3A5	WFDC2			Txnrd2	
STAT5A	APOF	CPE	CTSS	SERF2	GLUL			Txnrd3	
PIK3R1	CDO1	NDRG1	ETS2	PPDPF	C9orf16			Ogg1	
CDK6	PGAP2	F3	CMBL	RASEF	ELF3			GSTP1	
SP1	NKX3.1	LGALS3	SOWAHA	SLC44A4	ASS1			GSTM1	
FASL	MSMB	TYROBP	CA2	CLDN4	MAL2			GSTT1	
IL2RB	SERPINE2	DBP	ALOX12	MAL2	KRT19			GSTA1	
	MME	UCHL1	CD59A	LGALS3	AQP3			GSTK1	
	MT2	SNCG	MYOM1	C1B1	PIM1			DUOXA1	
	MT1	MDF1C	ABLIM11	TMPPRS2	SERPINB5			SRXN1	
	RABEPK	SPSB1	PYGM	RAB11FIP1	ADGRF1			CCS	
	TMEM97	CD72	ZFAND5	TSPAN13	PHLDA2			FMO2	
	SVS5	PLA2G7	CFD	SPINT2	CLDN1			FTH1	
	NANS	INMT	NR1D2	BACE2	TMPPRS4			GCLC	
	PAPSS2	PER2	C1CA3A1/C1CA3A2	SMIM14	C19orf33			GCLM	
	CD52	GSTT1	DHRS3	ABHD2	TMSB4X			GSS	
	DNSE1L2	ADIPOQ	CYTIP	CLDN7	PHLDA3			TXN1	
	FKBP5	ADSSL1	SCGB1B27	ERBB3	DENND2C			TXNIP	
	NFIL3	HLA-DQA1	SNAP25	MYO6	DAPP1				
	MTHFD2	HLA-DQB1	RTN1	CHMP4B	S100A6				
	GARS	CD74	LST1	H2AFJ	ST14				
	PSAT1	MUP1	PNLI PRP1	FXYD3	MT-CO1				
	ACTA1	C1QTNF3	CCL21	TSTD1	NECTIN4				
	CRISP1/CRISP3	CLIP4	MARCKS	ATP6V1G1	EZR				
			LYZ		MACC1				
					SH3BGR13				
					CEACAM1				
					EPS8L1				
					GSTP1				
					EFHD2				
					PRDX5				
					AGR2				
					FXYD3				
					PERP				
					ANXA11				
					MT-CO2				
					MT-CO3				
					MT-CYB				

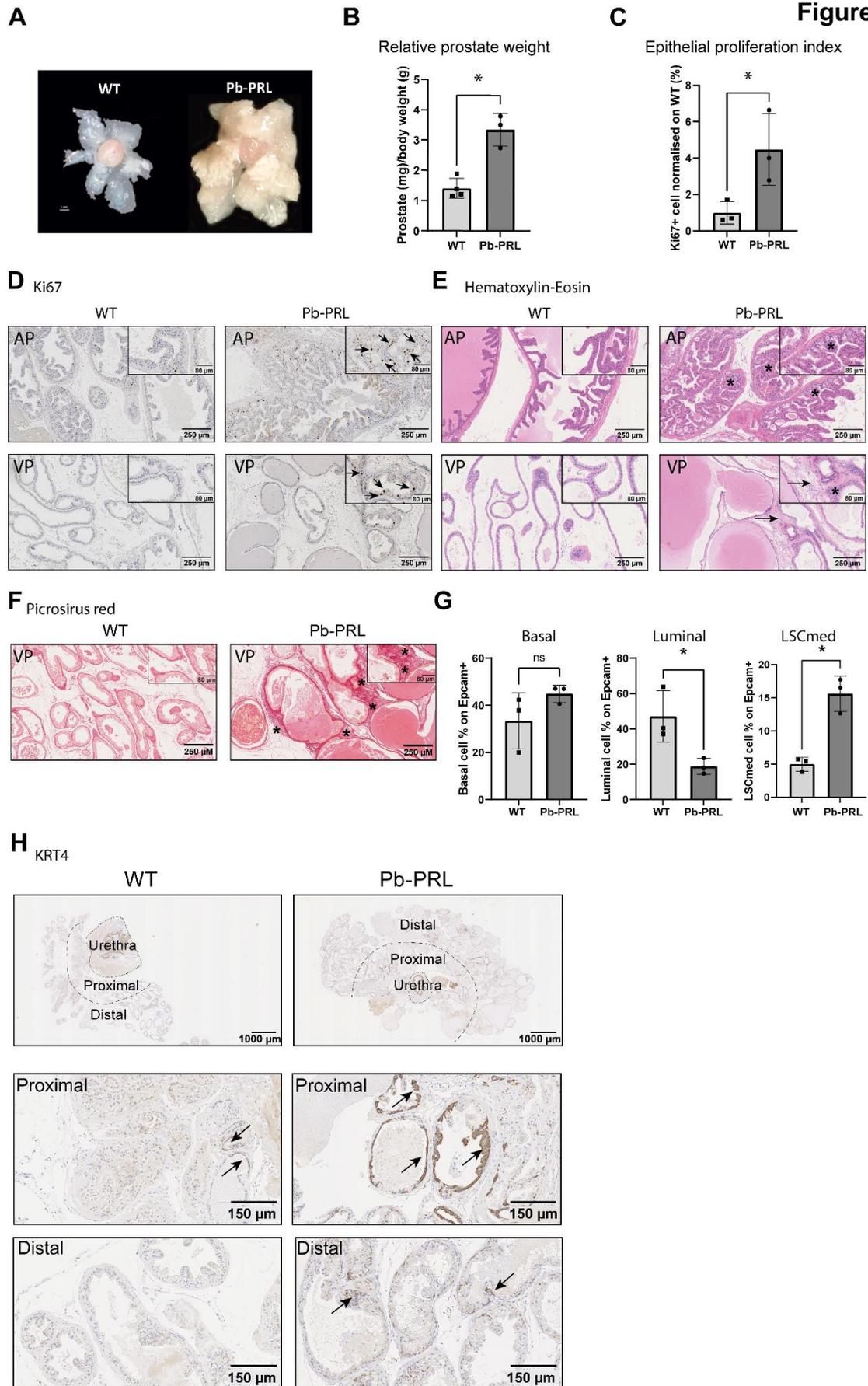
**Table S2: Enriched pathways in epithelial, immune and stromal populations from the MsigDb**

mouse collection	
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB</a>
HALLMARK_HYPOXIA	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_HYPOXIA">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_HYPOXIA</a>
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION</a>
HALLMARK_APOPTOSIS	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_APOPTOSIS">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_APOPTOSIS</a>
HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS</a>
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE</a>
HALLMARK_P53_PATHWAY	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_P53_PATHWAY">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_P53_PATHWAY</a>
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP</a>
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING</a>
HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING</a>
HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_G2M_CHECKPOINT">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_G2M_CHECKPOINT</a>
HALLMARK_E2F_TARGETS	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_E2F_TARGETS">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_E2F_TARGETS</a>
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE</a>
HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_MYC_TARGETS_V1">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_MYC_TARGETS_V1</a>
HALLMARK_APICAL_SURFACE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_APICAL_SURFACE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_APICAL_SURFACE</a>
HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING</a>
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_MTORC1_SIGNALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_MTORC1_SIGNALING</a>
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP</a>
HALLMARK_DNA_REPAIR	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_DNA_REPAIR">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_DNA_REPAIR</a>
HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE</a>
HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION</a>
GOBP_KERATINOCYTE_DIFFERENTIATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_KERATINOCYTE_DIFFERENTIATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_KERATINOCYTE_DIFFERENTIATION</a>
GOBP_SKIN_DEVELOPMENT	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_SKIN_DEVELOPMENT">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_SKIN_DEVELOPMENT</a>
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_EPIDERMAL_CELL_DIFFERENTIATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_EPIDERMAL_CELL_DIFFERENTIATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_EPIDERMAL_CELL_DIFFERENTIATION</a>
GOBP_INFLAMMATORY_RESPONSE_TO_WOUNDING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_INFLAMMATORY_RESPONSE_TO_WOUNDING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_INFLAMMATORY_RESPONSE_TO_WOUNDING</a>
GOBP_MIRNA_TRANSCRIPTION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_MIRNA_TRANSCRIPTION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_MIRNA_TRANSCRIPTION</a>
GOBP_SKIN_EPIDERMIS_DEVELOPMENT	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_SKIN_EPIDERMIS_DEVELOPMENT">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_SKIN_EPIDERMIS_DEVELOPMENT</a>
GOBP_WOUND_HEALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_WOUND_HEALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_WOUND_HEALING</a>
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_WOUND_HEALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_WOUND_HEALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_WOUND_HEALING</a>
GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE</a>
GOBP_GRANULOCYTE_CHEMOTAXIS	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_GRANULOCYTE_CHEMOTAXIS">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_GRANULOCYTE_CHEMOTAXIS</a>
GOBP_SKELETAL_MUSCLE_CELL_DIFFERENTIATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_SKELETAL_MUSCLE_CELL_DIFFERENTIATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_SKELETAL_MUSCLE_CELL_DIFFERENTIATION</a>
GOBP_REGULATION_OF_WOUND_HEALING	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_WOUND_HEALING">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_WOUND_HEALING</a>
GOBP_EPITHELIAL_CELL_PROLIFERATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_EPITHELIAL_CELL_PROLIFERATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_EPITHELIAL_CELL_PROLIFERATION</a>
GOBP_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE</a>
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_DEATH	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_DEATH">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_DEATH</a>
GOBP_MONONUCLEAR_CELL_DIFFERENTIATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_MONONUCLEAR_CELL_DIFFERENTIATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_MONONUCLEAR_CELL_DIFFERENTIATION</a>
GOBP_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT</a>
GOBP_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT</a>
GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_ANTIMICROBIAL_HUMORAL_RESPONSE</a>
GOBP_REGULATION_OF_HEMOPOIESIS	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_HEMOPOIESIS">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_REGULATION_OF_HEMOPOIESIS</a>
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_MONONUCLEAR_CELL_MIGRATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_MONONUCLEAR_CELL_MIGRATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_MONONUCLEAR_CELL_MIGRATION</a>
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_POPULATION_PROLIFERATION	<a href="http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_POPULATION_PROLIFERATION">http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/mouse/geneset/GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_POPULATION_PROLIFERATION</a>

---

**Figure S1: Main histopathological phenotypes of Pb-PRL mouse prostates.**

At 6 months of age, the prostates from Pb-PRL mice have been shown to exhibit the following phenotypes compared to age-matched WT mice (see Results sections in main text for references): (A) macroscopic prostate hypertrophy; (B) 2-3 fold increased prostate/body weight ratio; (C,D) increased epithelial proliferation index assessed by Ki-67 immunostaining (shown for AP and VP; examples of immunostained nuclei are indicated by arrows); (E) various histological alterations e.g. mainly in AP (and DP, not shown), hyperplastic and tufting epithelium including PIN lesions (\*) that progressively fill out the lumen of the gland, and mainly in VP, marked gland distension (with flatter luminal edges and only focal epithelial tufting or in-folding), abundant and homogenous eosinophilic secretions and increased stromal cellularity (arrows); (F) fibrosis assessed by increased picosirius red staining (\*); (G,H) enrichment in LSC<sup>med</sup> cells assessed by i) cell sorting using SCA-1 and CD49F (see Figure 2A for representative examples of FACS profiles), quantified in panel G from 3 independent experiments each involving 3 mice pooled by genotype; and ii) increased KRT4 immunostaining shown with arrows (H). Brightness/contrast of the four images in panel D were identically adjusted using ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>; version for windows64bits downloaded on 1<sup>st</sup> December 2022) to optimize immunostaining visibility. Error bars in panels B, C and G represent standard deviations and stars denote significant differences (\*p<0.05, ns: not significant) in Mann-Whitney test. Scale bars = 1000  $\mu$ m in A, 250  $\mu$ m (main images) and 80  $\mu$ m (insets) in D-F, and 1000  $\mu$ m (upper panels) and 150  $\mu$ m (middle/lower panels) in H.

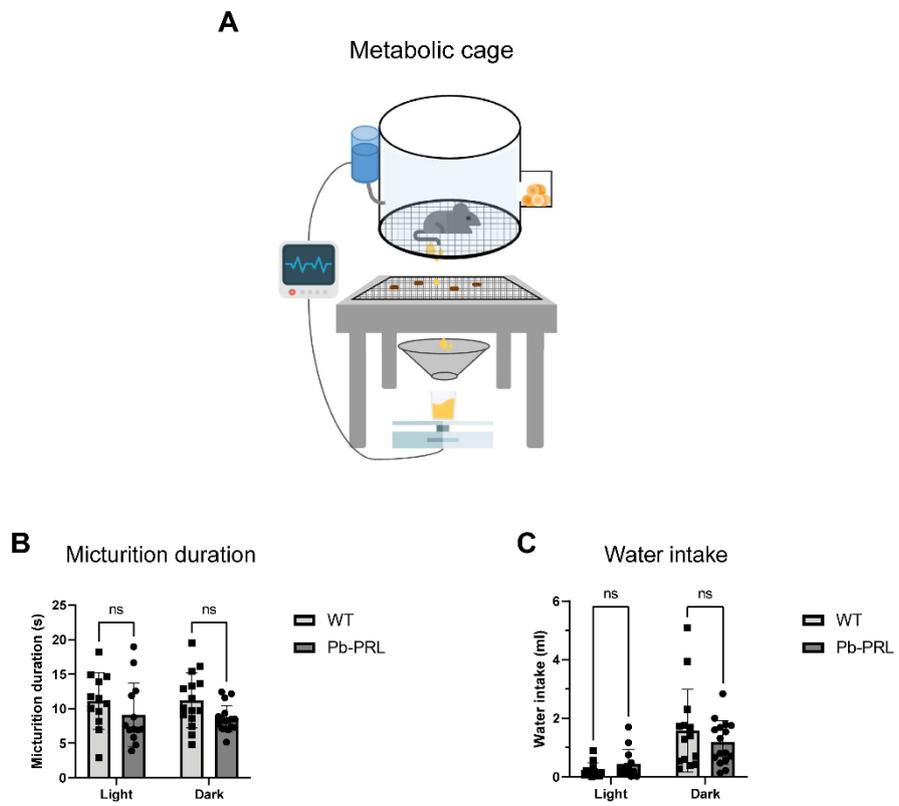
**Figure S1**

---

**Figure S2: Measurement of mouse urodynamic parameters.**

(A) schematic representation of individual metabolic/urination cages (SHINFACTORY, Fukuoka, Japan). The floor of each cage consists of a mesh made of special materials. This special mesh allows urine to pass through but traps feces. A square-shaped water-repellent funnel positioned below the mesh directs voided urine that passes through it into a container located on a precise balance meter (GX-1003A; A&D Company Ltd., Japan). Quantities of water and food sufficient to last for a few days were prepared for administration through the supply line and feeder box, respectively. Each mouse was provided with free access to food and water. (B,C) Measurement of micturition duration and water intake of Pb-PRL *versus* WT mice during the light or the dark, as indicated. Error bars represent standard deviations and ns denotes not significant difference in a two-way ANOVA statistical analysis. Figure complementary to Figure 1A-D.

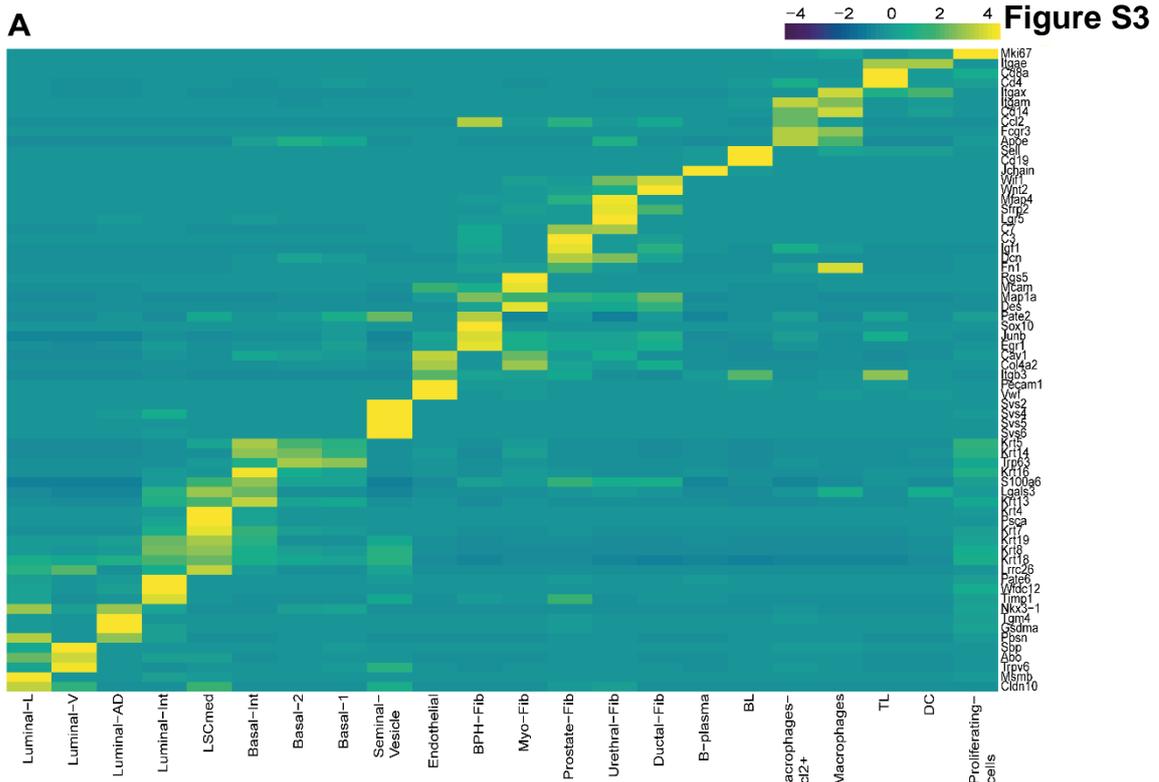
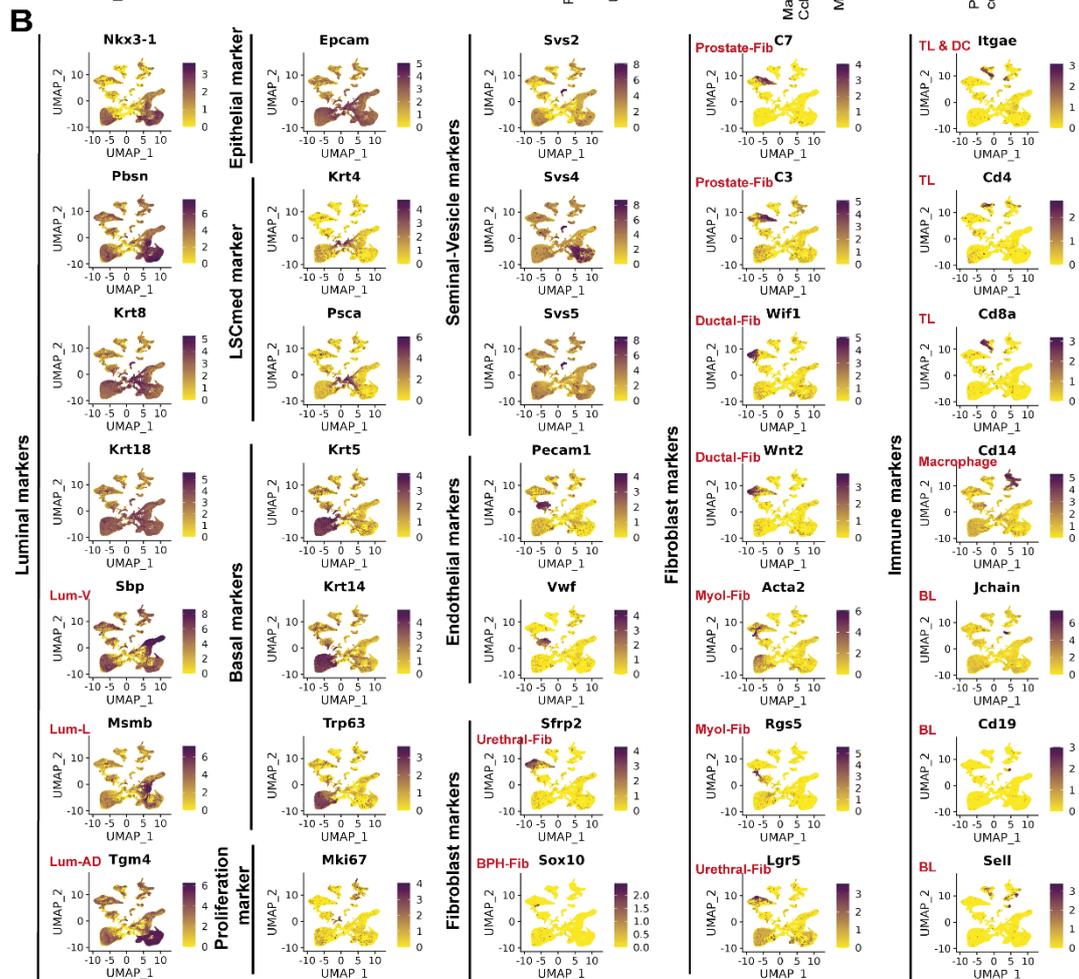
Figure S2



---

**Figure S3: Cell cluster annotation of mouse prostate.**

The expression of the cell type markers used to annotate the clusters in the mouse dataset (n=7 mice) is reported as heatmap (A) and feature plot (B). The values in the heatmap are pseudo-bulk obtained by averaging the expression of all the cells in the clusters. Figure complementary to Figure 1E.

**A****Figure S3****B**

---

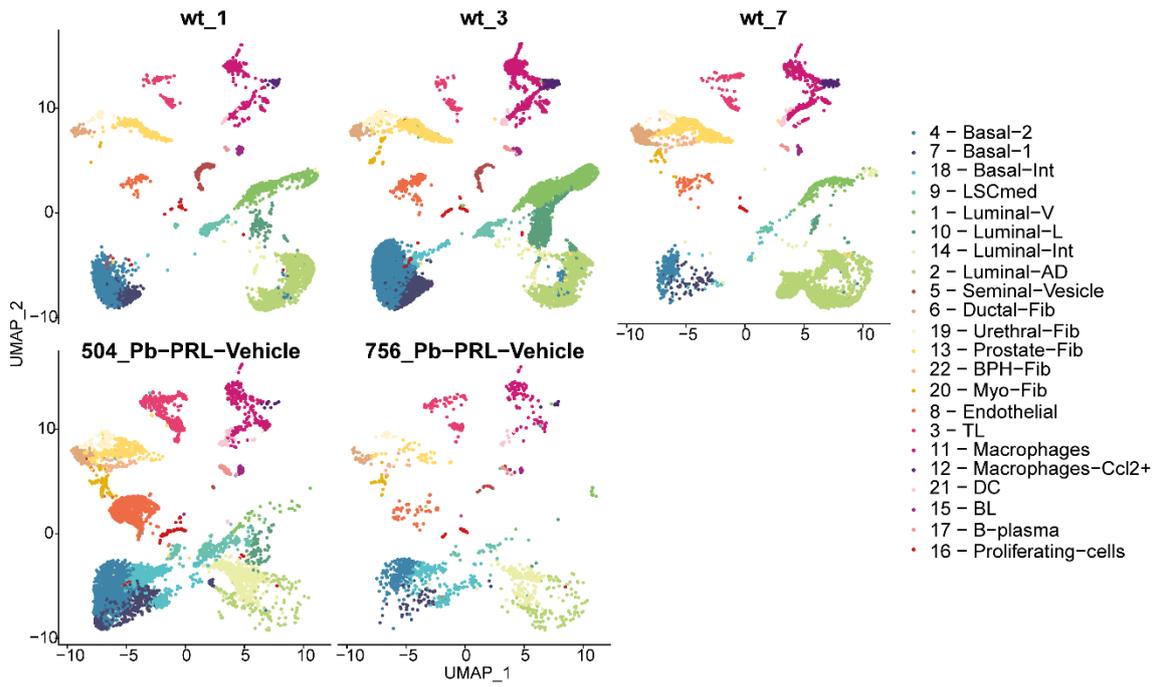
**Figure S4: Single cell analysis of Pb-PRL versus WT mouse prostates.**

(A) UMAP of the cells in WT and Pb-PRL mice, colored by annotated clusters and split by sample identity. (B) Heatmap of the pseudo-bulk expression of secretory genes identified by Kwon et al [Ref 25 in main text] (n=7 mice).

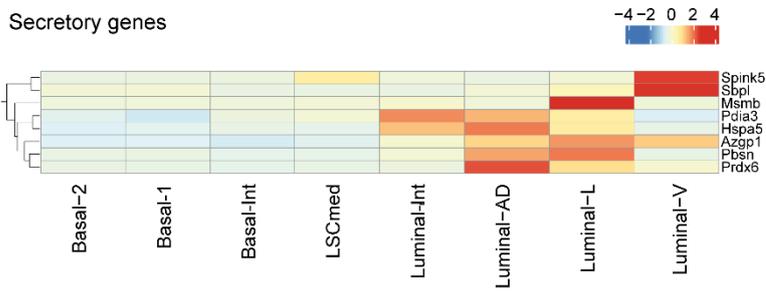
Figure complementary to Figures 1G and 1J.

Figure S4

A



B



---

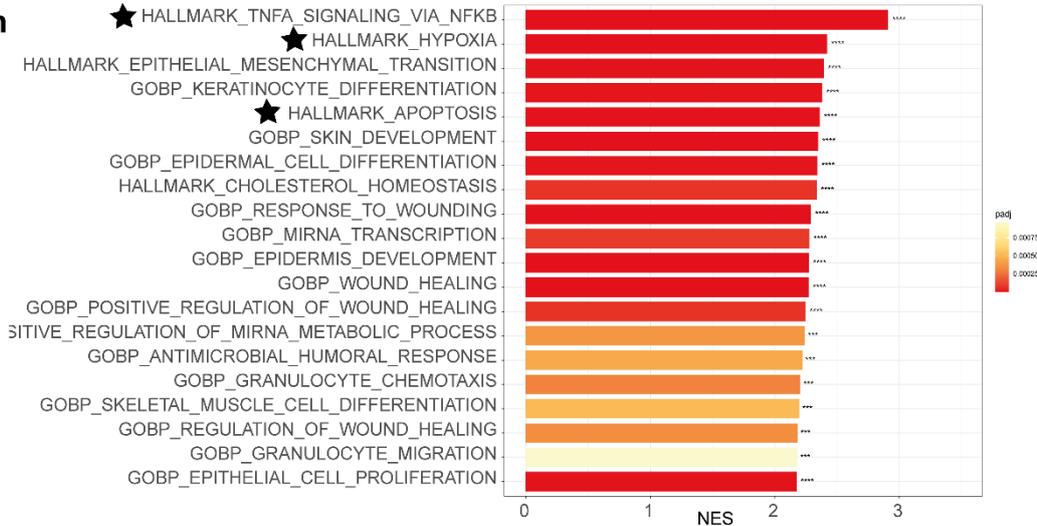
**Figure S5. Pathway enrichment analysis of Pb-PRL versus WT mouse prostate**

Bar plots showing GSEA analysis of curated gene sets from the MsigDB mouse collection (3 WT vs 2 Pb-PRL Vehicle) using the fgsea package on the differentially expressed genes in the epithelial, stromal and immune cell compartments, as indicated. Top 20 enriched pathways are shown and ranked according to their normalised enrichment score (NES), and colored based on the adjusted p-value. To highlight the most enriched pathways, asterisks have been added next to the bars based on the adjusted p-value: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Stars on the left indicate pathways common to all three cell compartments as highlighted in the Results section. See supplementary Table S2 for gene lists of these pathways.

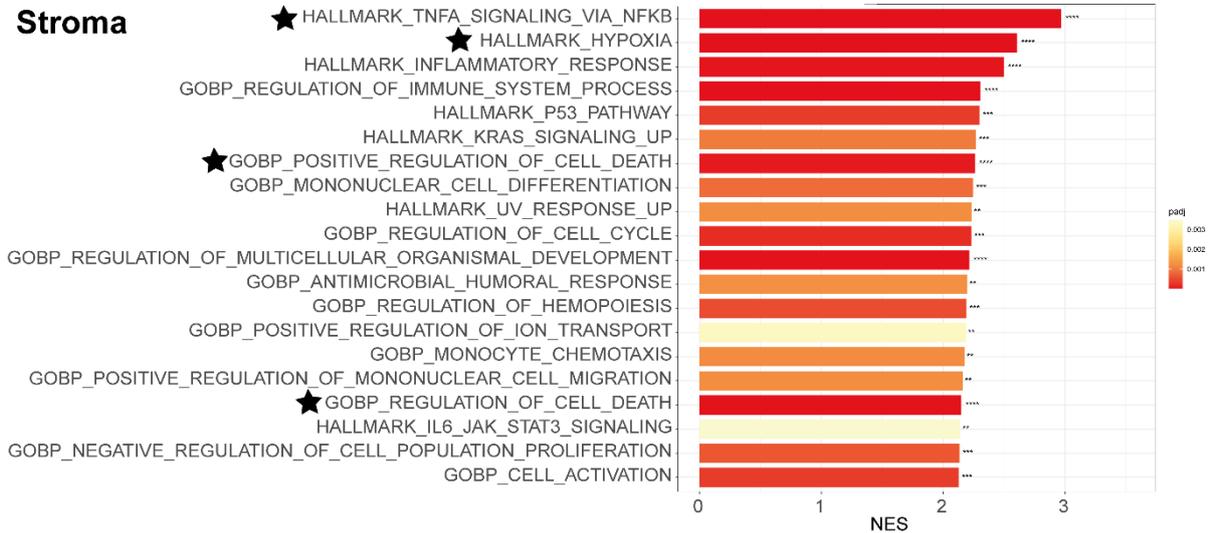
TOP 20 Pathways in Pb-PRL (Vehicle) vs WT prostates

Figure S5

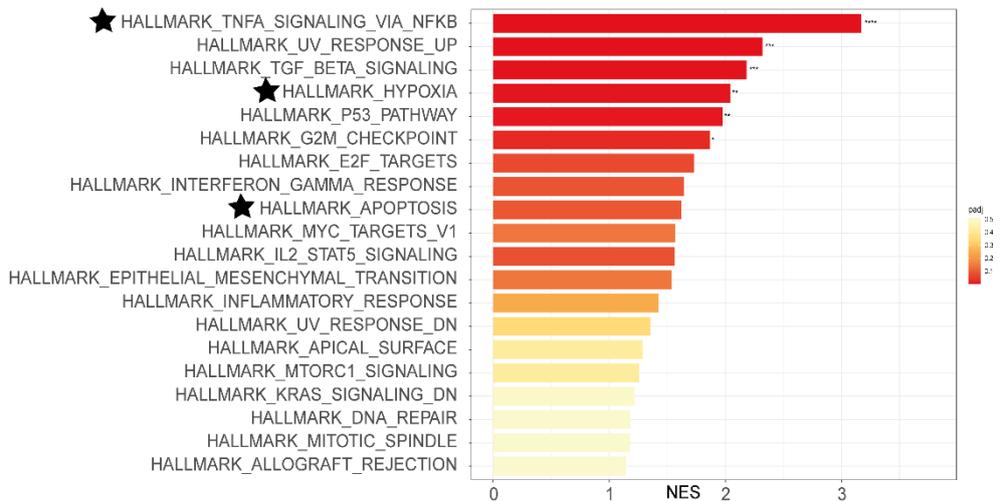
**Epithelium**



**Stroma**



**Immune**



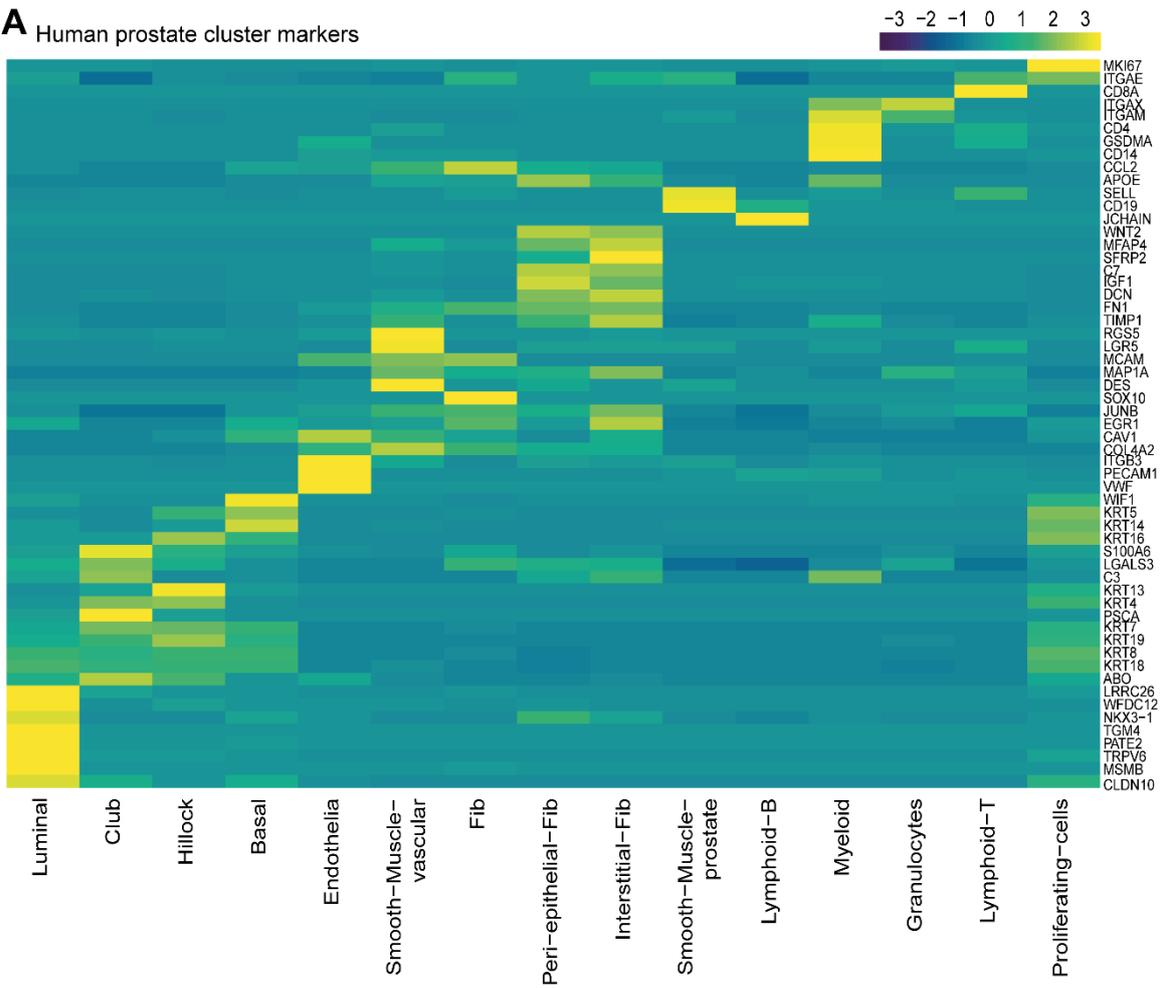
---

**Figure S6: Cell cluster annotation of human prostate.**

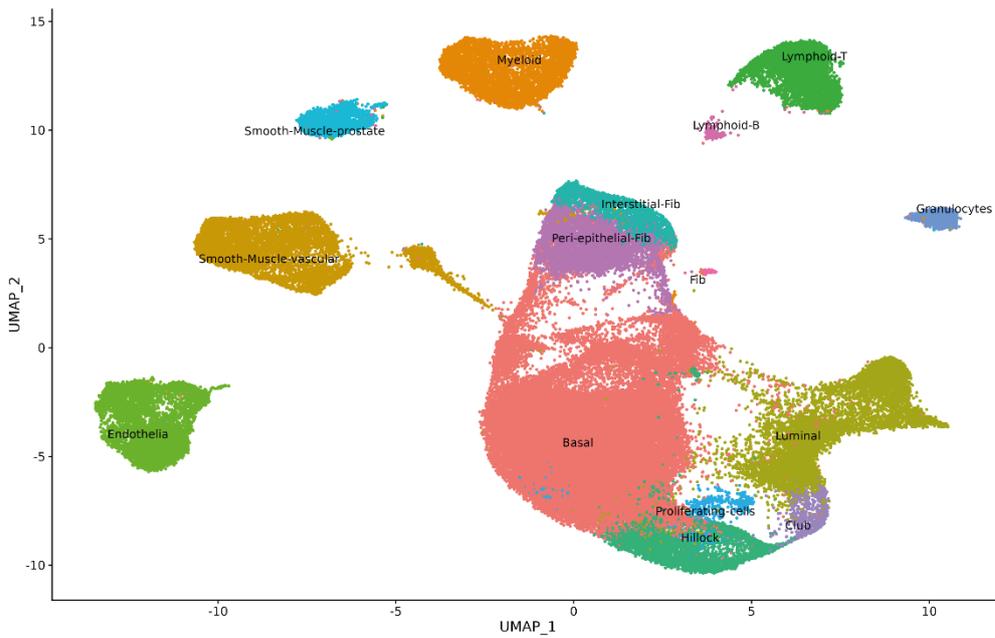
(A) Human healthy and BPH prostate sample datasets were downloaded from GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>, accession number GSE172357, last accessed date 9<sup>th</sup> July 2021) and integrated using the same pipeline used for the mouse samples. (B) 14 clusters were identified, and they were annotated using markers shown in A.

**Figure S6**

**A** Human prostate cluster markers



**B** Human prostate clusters



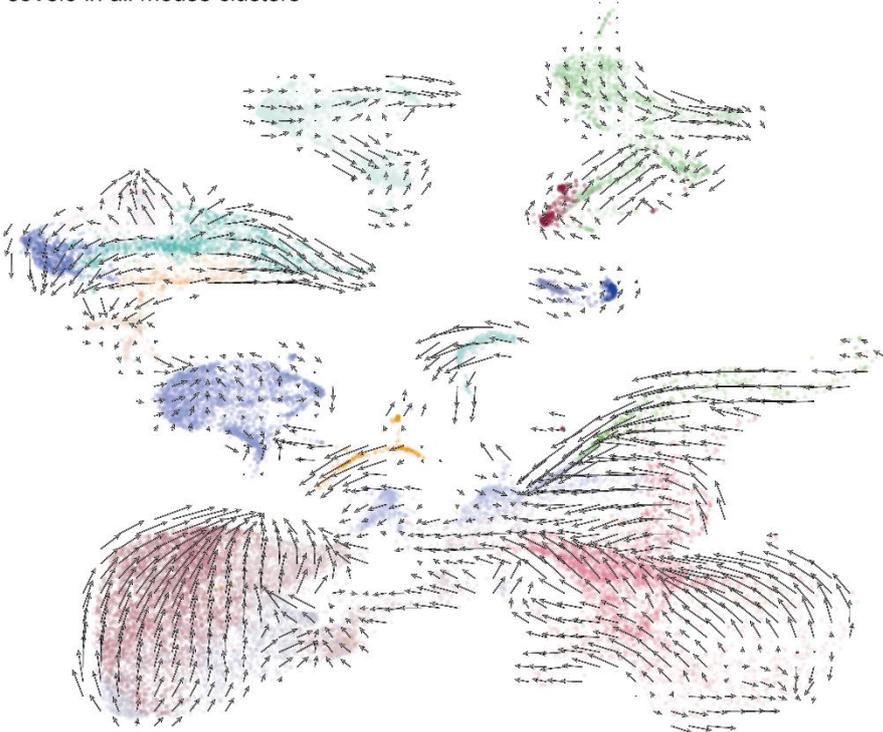
---

**Figure S7. Prediction of cell plasticity in the mouse prostate.**

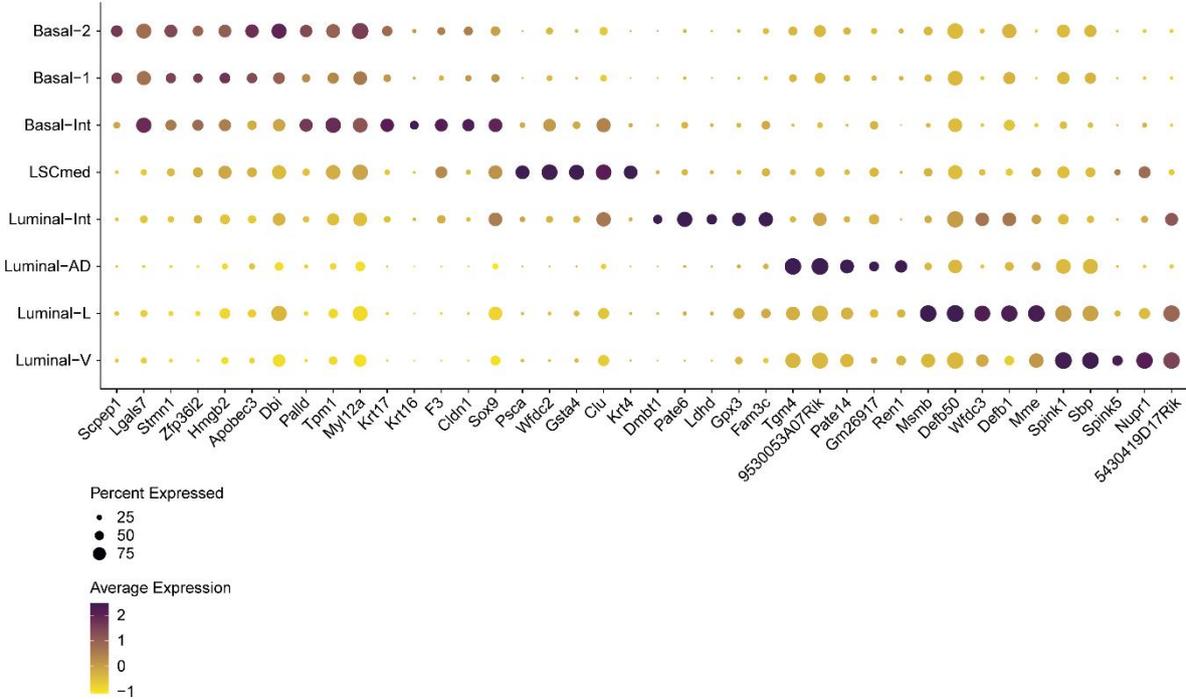
(A) Fine-grained resolution of the velocity vector field from scVelo using the mouse dataset (n=7 mice). Each arrow shows the direction and speed of movement of the individual cells. The movements are in line with the cell type expectation (naive to mature) and reveal the intermediate role of the LSC<sup>med</sup>-positive cells within the epithelial compartment. (B) Dot plot of the 5 top differentially expressed genes in each epithelial cluster (n=7 mice), ordered by expression, from Basal-1 to Luminal-AD. Figure complementary to Figure 4B.

**A** scVelo in all mouse clusters

**Figure S7**



**B** TOP5 epithelial expressed genes

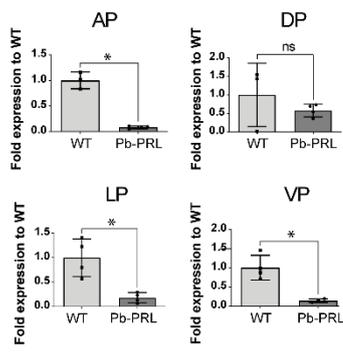


---

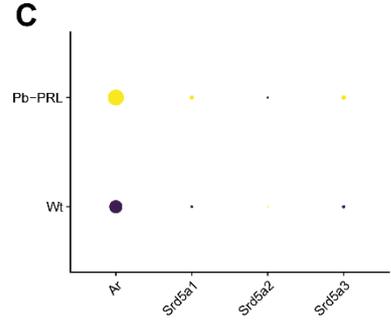
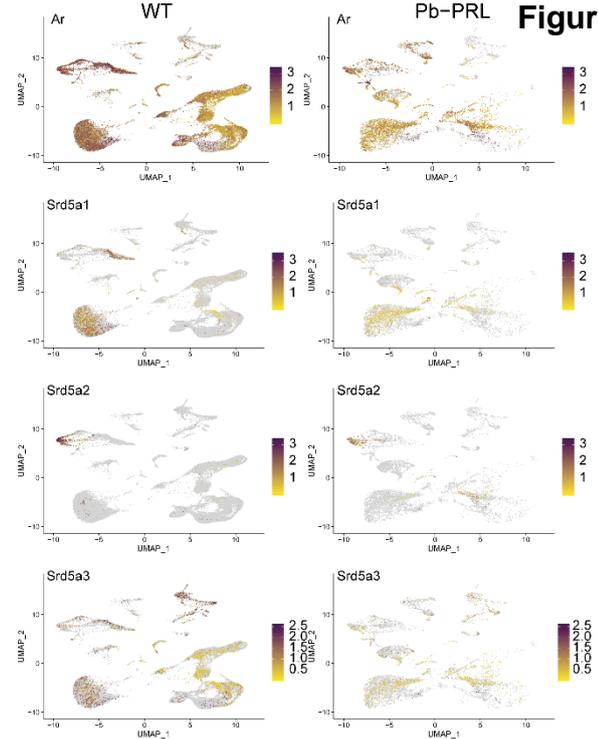
**Figure S8. Androgen signalling is reduced in Pb-PRL mouse prostates.**

(A) RT-qPCR of androgen receptor (*Ar*) in the 4 lobes of WT (n=3) and Pb-PRL (n=2) mouse prostates. Error bars represent standard deviations and stars denote significant differences (\* $p < 0.05$ , ns: not significant) in Mann-Whitney test. (B,C) The expression of *Ar* and *srd5a* (isoforms 1, 2 and 3) is shown in the UMAP (B) and as dot plot in which the clusters have been grouped by genotype (3 WT vs 2 Pb-PRL) (C). Panels in D show dot plot expression of AR-downregulated and AR-upregulated genes grouped by genotype in all epithelial clusters (3 WT vs 2 Pb-PRL). Genes of AR signatures are listed in Table S1. Figure complementary to Figure 4E.

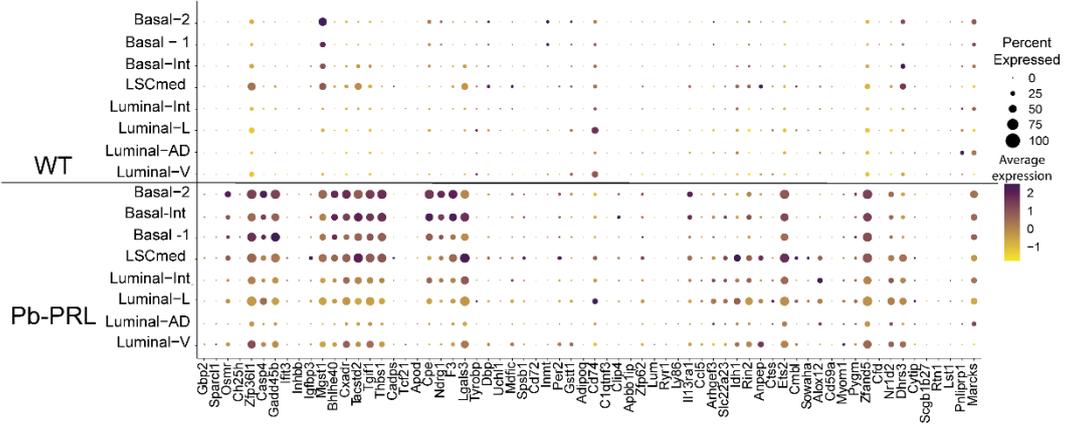
**A** AR lobe specific expression (qPCR)



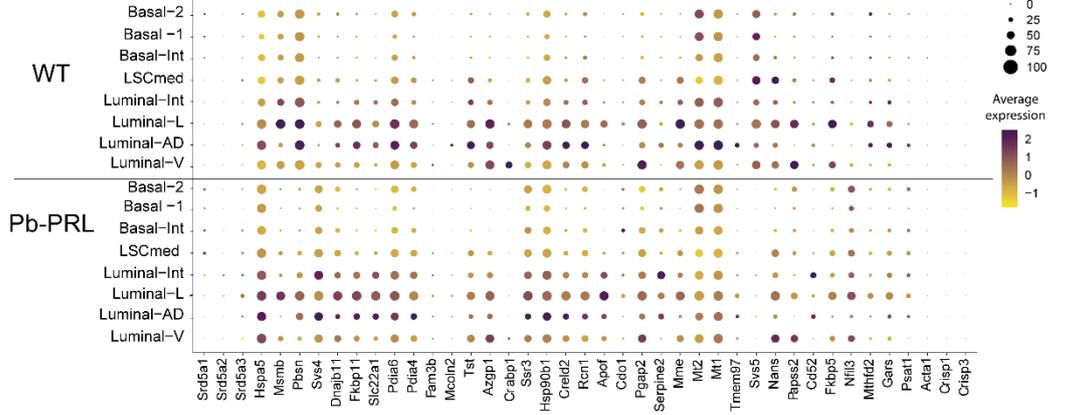
**B** **Figure S8**



**D** AR-downregulated gene expression



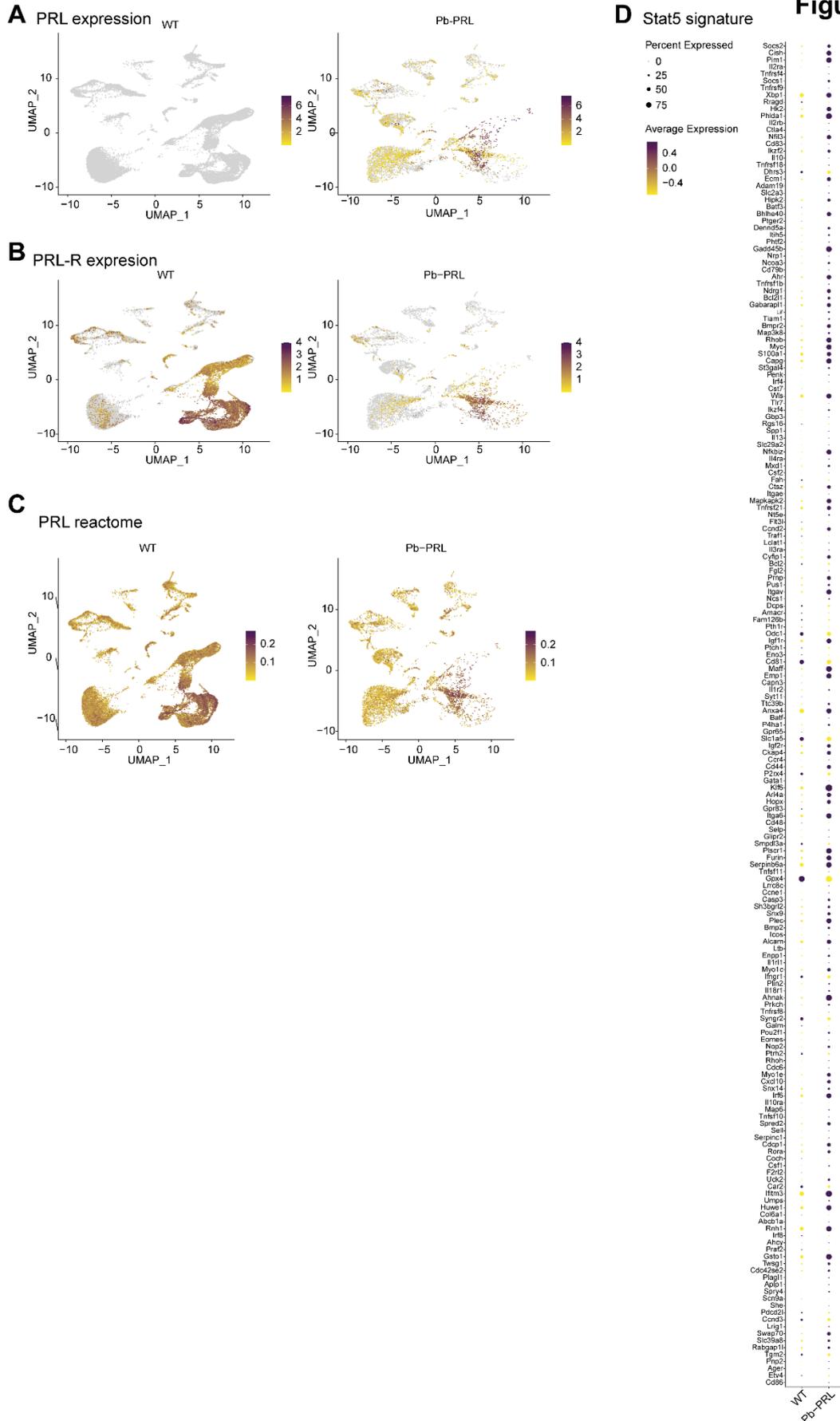
AR-upregulated gene expression



---

**Figure S9. PRL-STAT5 signaling is increased in Pb-PRL mouse prostates.**

Prl (A) and Prlr (B) expression, together with PRL signaling pathway signature from the REACTOME database (C), in 3 WT and 2 Pb-PRL mice, visualised on the UMAP for all the cell populations. (D) Dot plot representation of the expression of genes involved in the STAT5 signaling pathway grouped by genotype (3 WT vs 2 Pb-PRL). Genes of the STAT5 signature are listed in Table S1.

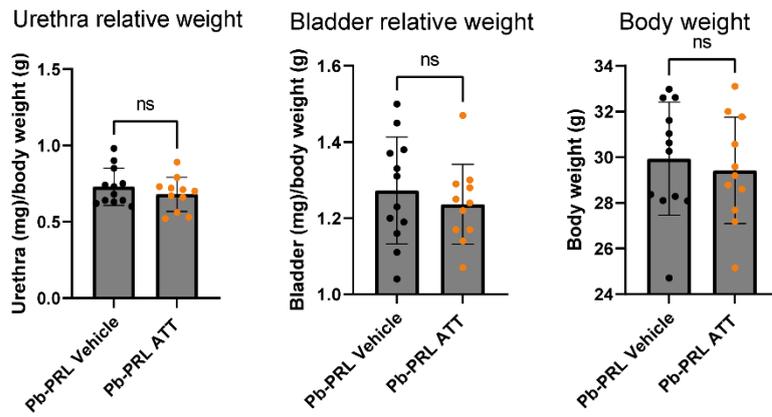


---

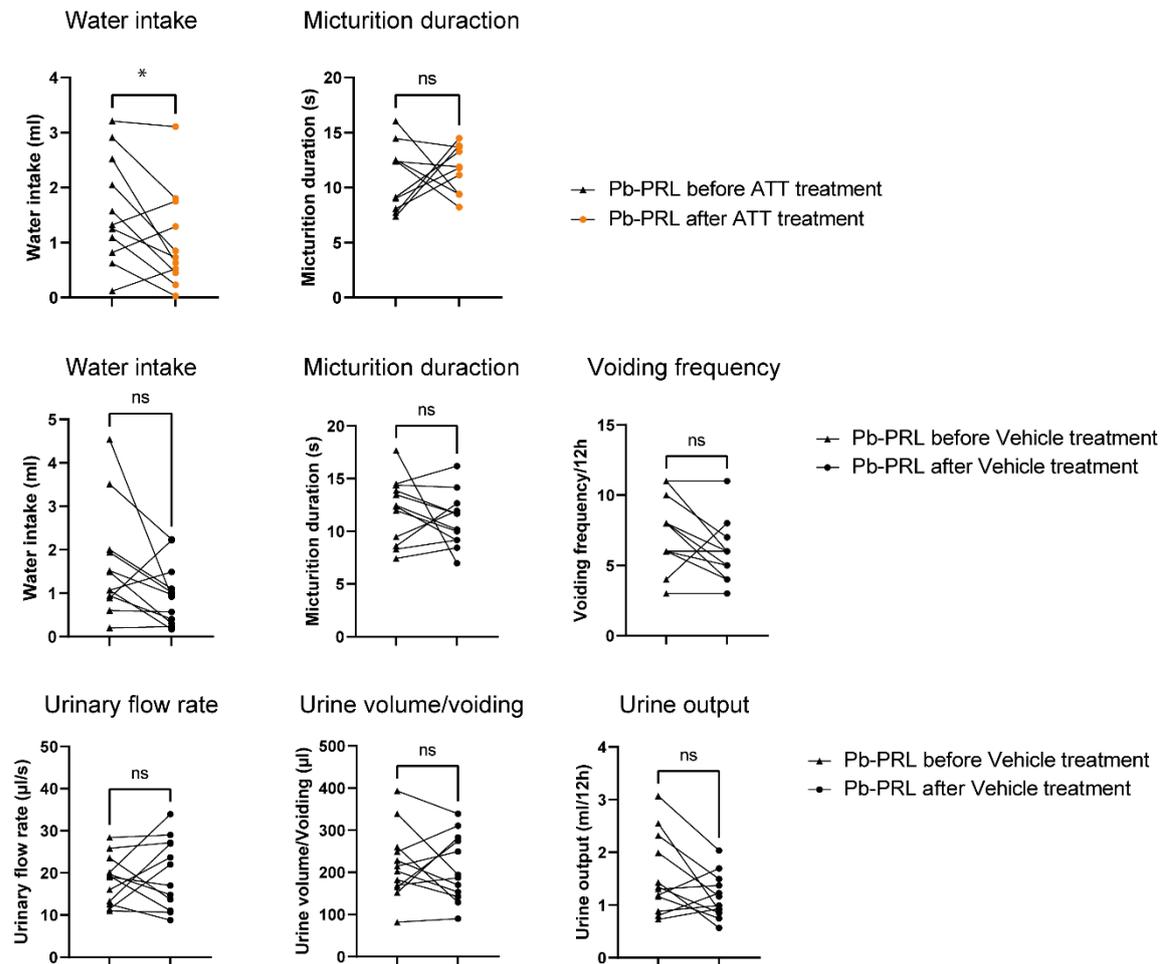
**Figure S10. Effects of ATT on urodynamic parameters of Pb-PRL mice.**

(A) Urethra, bladder and body weight measurement in Pb-PRL mice treated for 30 days with ATT *versus* vehicle. Error bars represent standard deviations and ns denote not significant differences in Mann-Whitney test. (B) Comparison of various parameters (as indicated) measured on Pb-PRL mice before and after ATT (top panels) or vehicle (bottom panels) treatment. Stars represent significant differences (\* $p < 0.05$ , ns: not significant) in Wilcoxon test. Figure complementary to Figures 5C to 5G.

**A** Pb-PRL Vehicle vs ATT after treatment



**B** Comparison before and after treatment

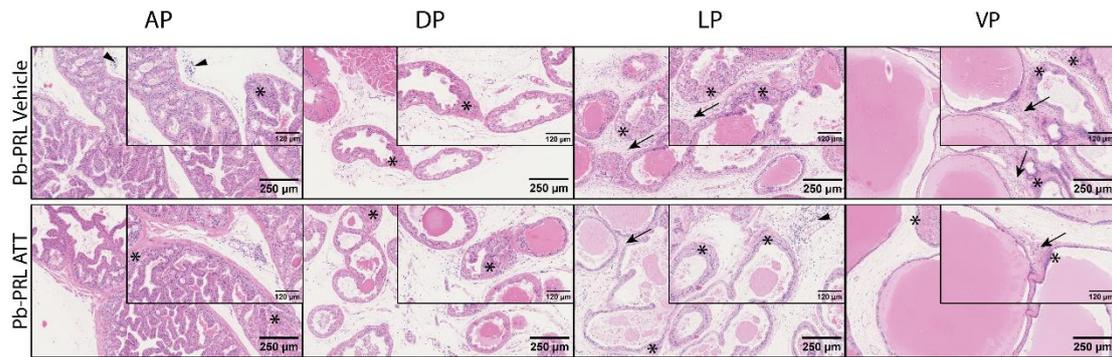


---

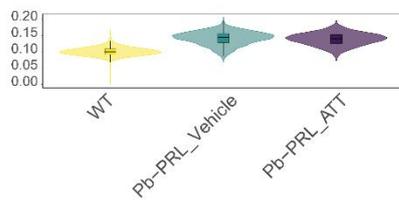
**Figure S11. ATT treatment of Pb-PRL mice has minor effect on prostate histopathology, STAT5 and AR signalling**

(A) Histopathology (H&E staining) of the four prostate lobes of Pb-PRL mice treated with ATT *versus* vehicle. Symbols represent PINs (\*), immune infiltration (arrowheads) and dense periglandular stroma (arrows). (B-D) STAT5 signaling illustrated by violin plots of STAT5 signature in the whole epithelium (B) and immunostaining of p-STAT5 (C), with examples of pSTAT5+ nuclei indicated by arrows. The epithelial index of nuclear p-STAT5 in each lobe is quantified in panel D. Error bars represent standard deviations and stars denote significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant) in two-way ANOVA analysis. (E-G) AR signaling illustrated by violin plots of AR upregulated and downregulated signatures in the whole epithelium (E) and immunostaining of AR (F), with examples of AR+ nuclei indicated by arrows. The epithelial index of nuclear AR in each lobe is quantified in panel G. Error bars represent standard deviations and ns denote not significant differences in two-way ANOVA analysis. Scale bars = 250  $\mu\text{m}$  in main images (A, C and F), and in insets, 120  $\mu\text{m}$  (A) and 60  $\mu\text{m}$  (C,F).

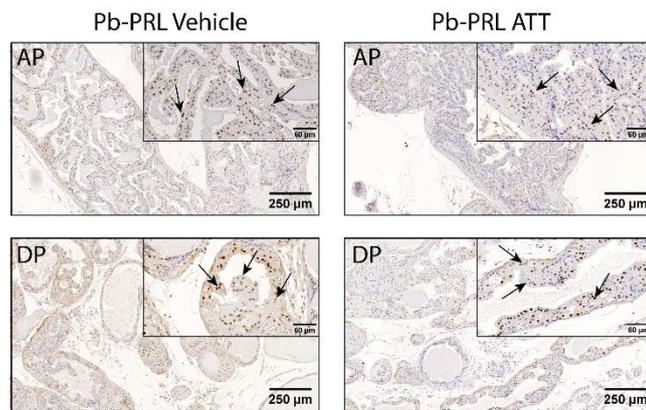
**A** Hematoxylin -Eosin stain



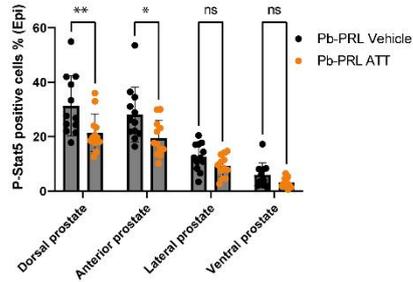
**B** Stat5 signature on the epithelium



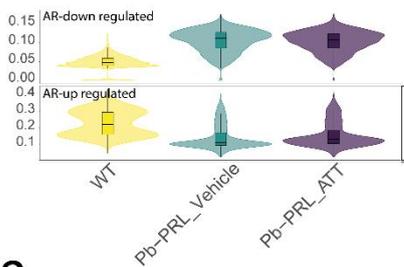
**C** Nuclear P-Stat5



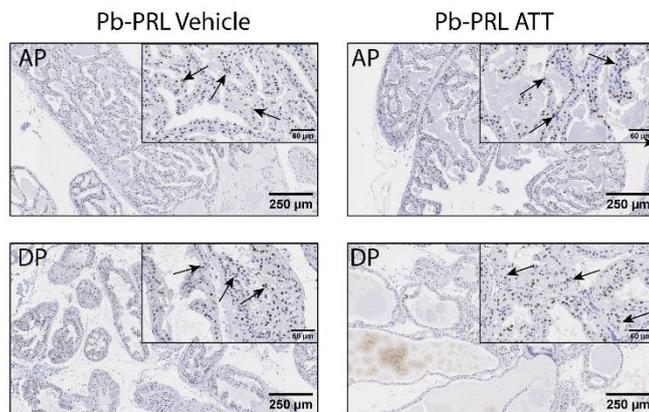
**D** Nuclear P-Stat5 quantification



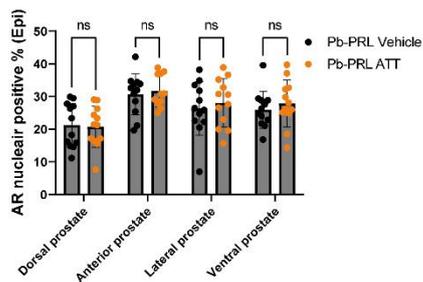
**E** AR signature on the epithelium



**F** Nuclear AR



**G** Nuclear AR quantification

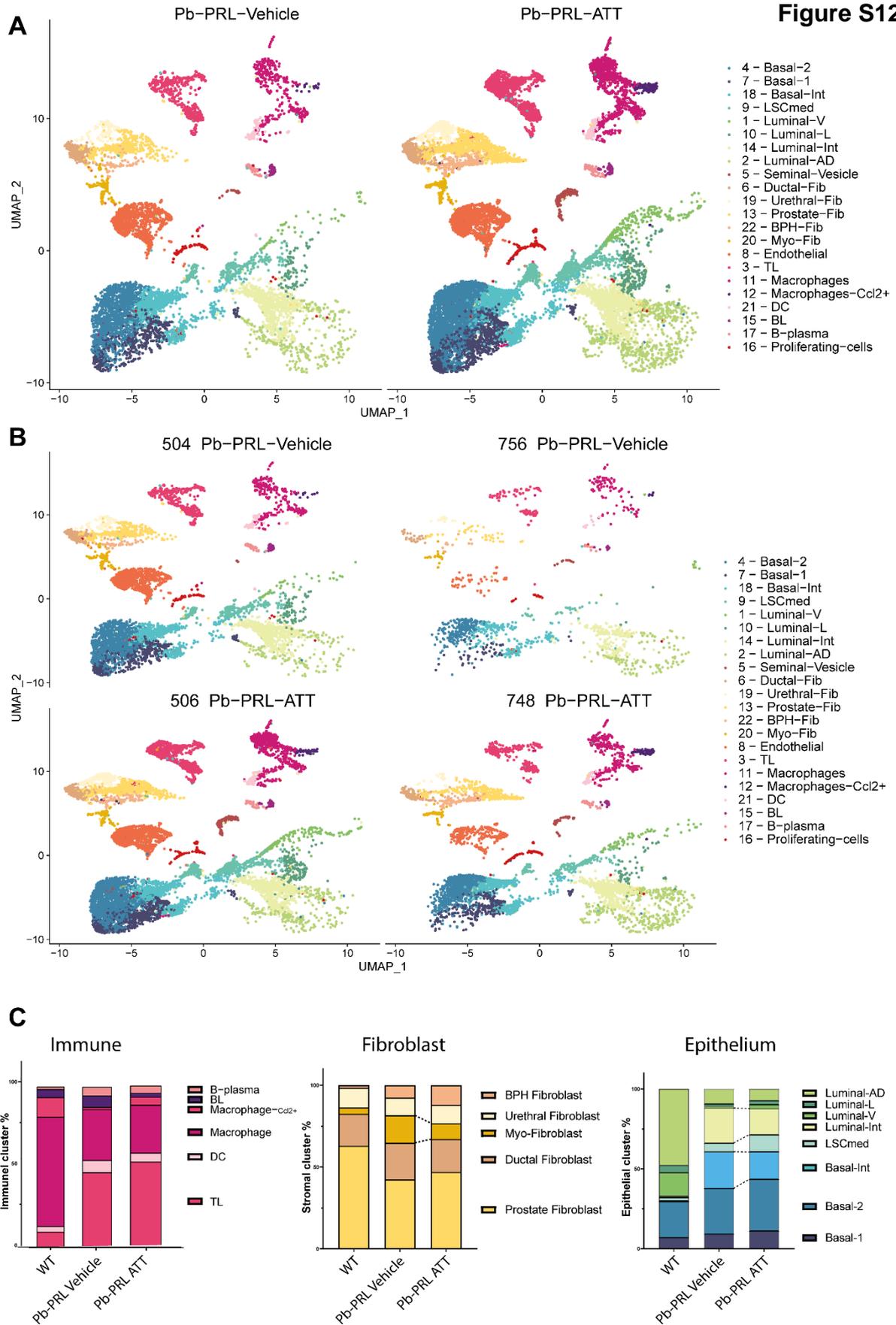


---

**Figure S12. scRNAseq analysis of prostates from Pb-PRL mice treated with vehicle or ATT.**

Annotated clusters of Pb-PRL mice split by genotype (A) and by sample identity (B). (C) Proportion of the cell type within the immune, fibroblast, and epithelial cell populations (bars color-coded according to panels A and B).

**Figure S12**



---

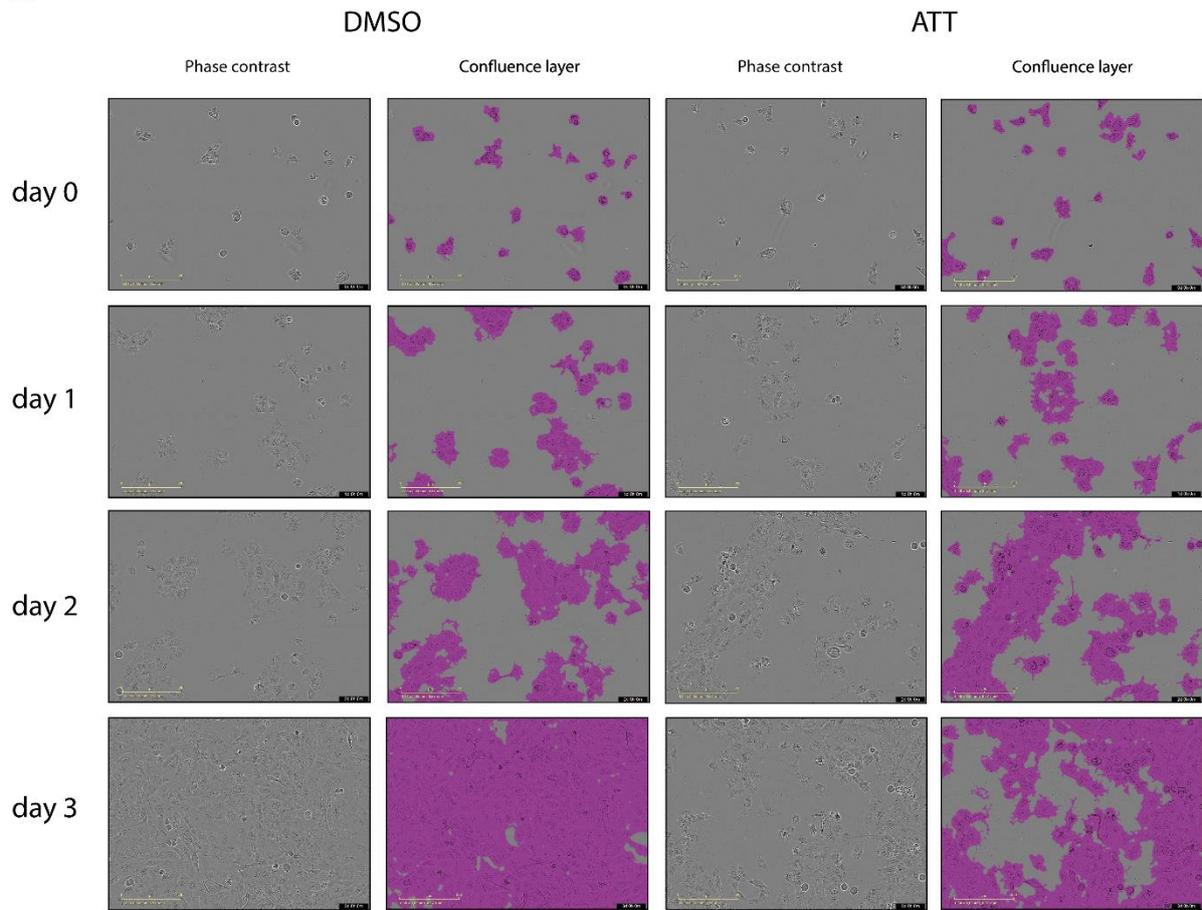
**Figure S13. Effect of ATT on BPH-1 cell proliferation.**

(A) Images from Incucyte showing confluence areas of BPH-1 cells treated with ATT versus DMSO for 3 days. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ . Confluence layers (pink) were used to quantify cell growth shown in Figure 6B. (B). Phase contrast images of BPH-1 cells after 7, 14 and 21 days of chronic treatment with ATT versus DMSO (treatment renewed every three days). Brightness/contrast of images in panel B were individually adjusted using ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>; version for windows64bits downloaded on 1<sup>st</sup> December 2022) to optimize the visibility of the cell areas.

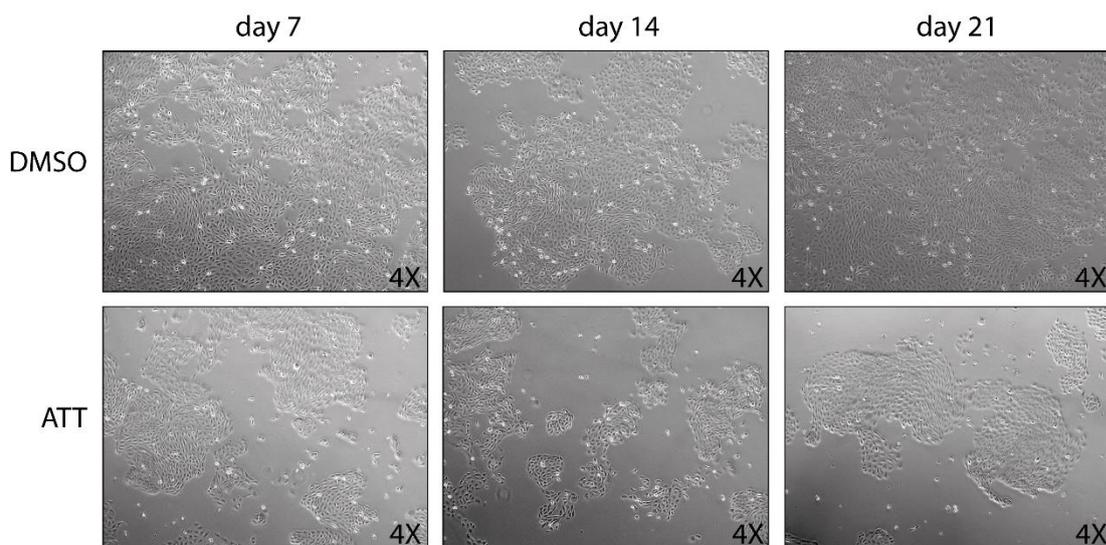
Figure complementary to Figures 6B and 6F.

**Figure S13**

**A**



**B**

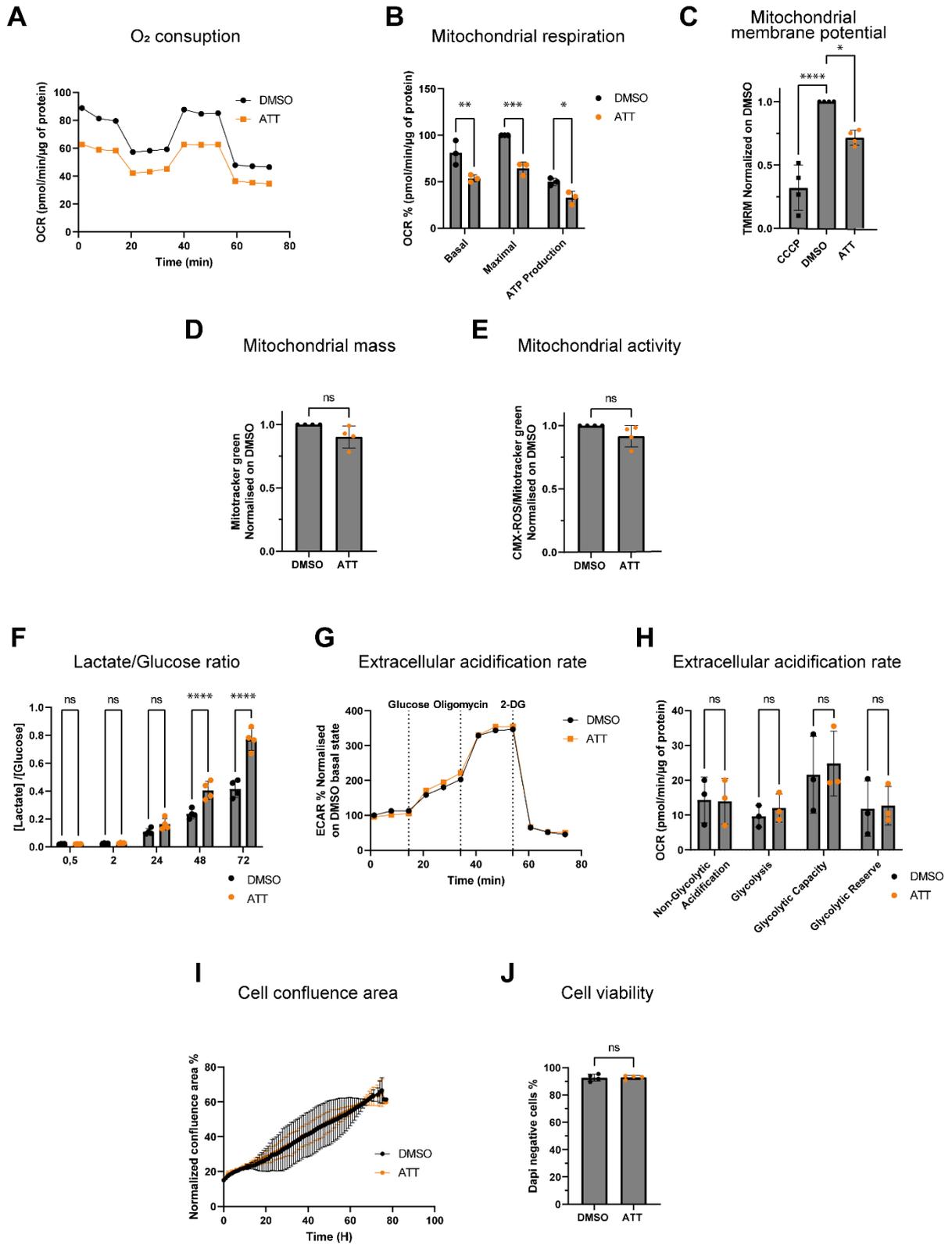


---

**Figure S14. Effect of ATT on stromal WPMY-1 cells.**

(A) Representative WPMY-1 cell O<sub>2</sub> consumption rate (OCR) after 72 h of ATT (10 μM) treatment measured by Seahorse. (B) Quantification of OCR in WPMY-1 cells after 72h of ATT (10 μM) treatment, each point represents the mean OCR measured for 4 to 8 technical replicates and the maximal respiration is normalized to 100 % (n=3). (C-E) Relative median fluorescence intensity (MFI) measured by flow cytometry of TMRM (C), MitotrackerGreen (D) and CMX-ROS (E) probes in WPMY-1 cells after 72h ATT (10 μM) treatment (n=4). Each experiment is normalized to DMSO, and CMX-ROS MFI is also normalized to MitotrackerGreen MFI. (F) Ratio of extracellular lactate / glucose concentration after 30 min, 2 h, 24 h, 48 h and 72 h of ATT (10 μM) treatment (n=4). Each lactate and glucose concentration is normalized to the extracellular protein concentration. (G) Representative WPMY-1 cell extracellular acidification rate (ECAR) after 72 h of ATT (10 μM) treatment measured by Seahorse. Cells were incubated in fresh ATT-free seahorse medium 1 h before recording (T0). (H) Quantification of ECAR in WPMY-1 cells after 72h ATT (10 μM) treatment, each point represents the mean of 4 to 8 technical replicates (n=3). (I) Mean cell confluence area in WPMY-1 cells treated with 10 μM ATT versus DMSO, normalized to day 0 (n=3). Scans were acquired every hour for 72 h using IncuCyte. (J) Percentage of live WPMY-1 cells treated for 72 h with 10 μM ATT *versus* DMSO measured by flow cytometry using DAPI (n=4). Error bars represent standard deviations, and stars denote significant differences (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, ns: not significant) in t-test (D, E, J), one-way (C) or two-way ANOVA (B, F, H, I) analyses.

**Figure S14**

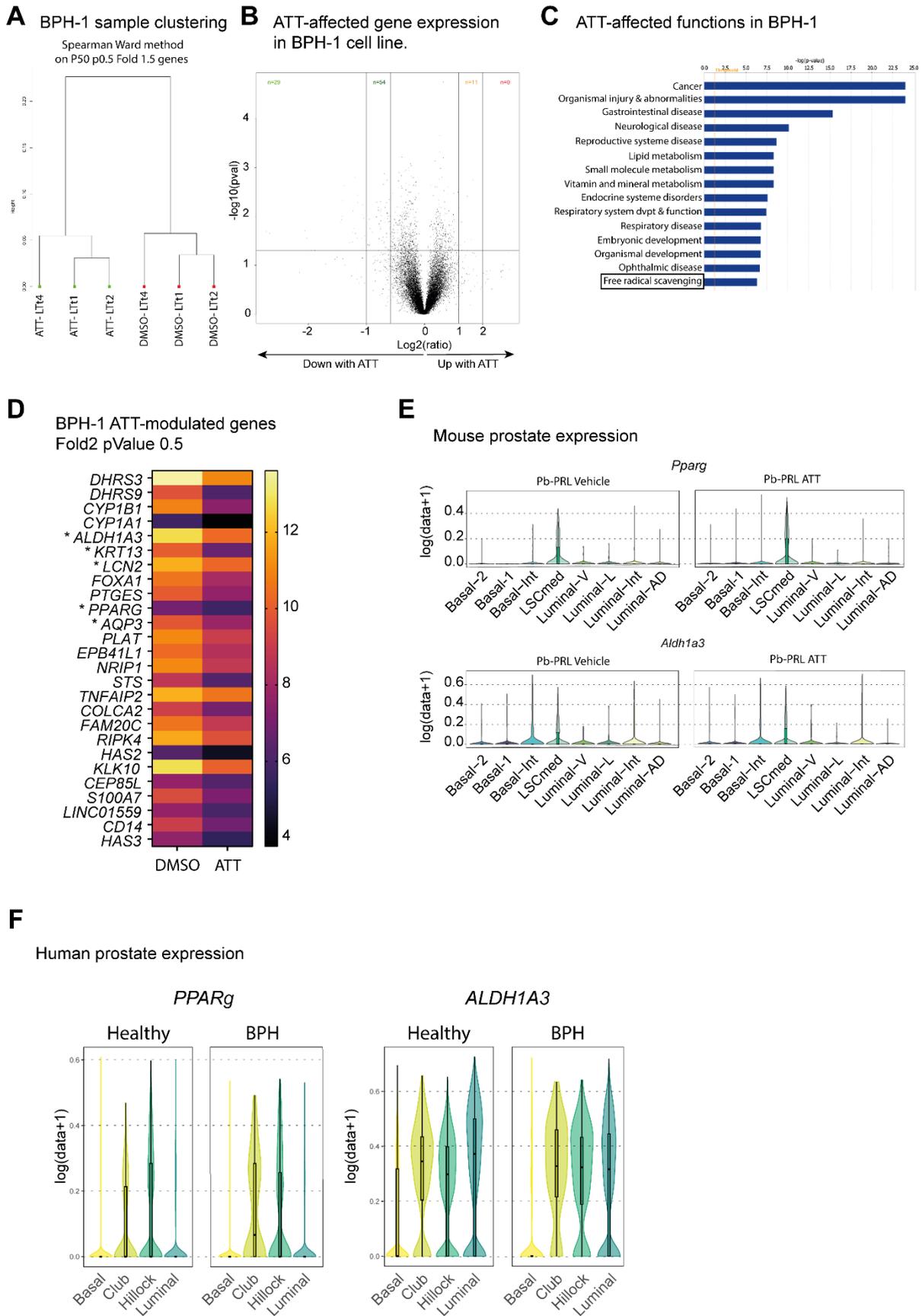


---

**Figure S15. Marker genes of LSC<sup>med</sup>-like cells.**

(A-C). Transcriptomic analysis of BPH-1 cells treated for 3 days with ATT showing unsupervised clustering (A), volcano plot of gene expression (B) and affected Gene Ontology functions (C). (D) Main differentially expressed genes (fold 2, p-value <0.5) include various markers (\*) of LSC<sup>med</sup> (ALDH1A3, PPARg), CD38-low (LCN2) and Hillock (KRT13, AQP3) cells. (E,F) Violin plot of the expression of *Pparg* and *Aldh1a3* in the epithelial cells of Pb-PRL mice grouped by treatment (E), and in the human healthy prostate versus BPH dataset (F). Figure complementary to Figure 7.

**Figure S15**





## II. Résultats complémentaires

### A. MATERIELS ET METHODES

- Quantification des ROS intra-cellulaires dans les lignées humaines

Les cellules BPH-1 et WPMY-1 cultivées en routine, comme décrit dans Dos Santos *et al.* (sous presse), sontensemencées respectivement à raison de 300 000 et 450 000 cellules par puits dans des plaques 6 puits. Le lendemain, les milieux de culture sont remplacés par des milieux frais contenant 10 $\mu$ M d'ATT, de 10mM de NAC (N-Acethyl-Cystéine) ou l'équivalent DMSO. Les cellules sont incubées 24h avec les traitements avant addition dans le milieu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 $\mu$ M pour les WPMY-1 et 500 $\mu$ M pour les BPH-1) pendant deux heures (si aucun stress, cellules contrôles appelées "basal"). Les cellules sont ensuite récupérées, lavées avec du PBS 1X, centrifugées et mises en présence de la sonde DCFDA (C6827, Invitrogen™) à une concentration finale de 4mM dans du DMEM pendant 30min à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées via addition de milieux et centrifugation, puis re-suspendues dans de l'HBSS (Gibco, HBSS, 14175095) contenant 2,5 $\mu$ g/mL de Dapi (D3171, Invitrogen™). La fluorescence des cellules est rapidement quantifiée par cytométrie en flux via l'utilisation du LSRFortessa™ (BD Biosciences) et analysée à l'aide du logiciel FlowJo (FLOWJO, LLC).

- Mesure de la sensibilité au stress oxydant

Les cellules BPH-1 et WPMY-1 sontensemencées respectivement à raison de 8000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Le lendemain, les milieux de cultures sont remplacés par du milieu frais contenant différentes concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La viabilité cellulaire est quantifiée après 72h de traitement à l'aide du kit CellTiterGlo (G7571- Promega). Rapidement, les cellules sont incubées avec de la Luciférine puis lysées. La mesure de la luminescence, reflet de l'activité métabolique, est quantifiée à l'aide du lecteur de plaque Mitras LB 940 (Bethold technologies).

- Quantification de l'ARNm des SOD

L'ARNm est extrait, dosé et converti en ADNc comme décrit dans Dos Santos *et al.* (sous presse). Les CT des qPCR sont quantifiés avec la qTower2.0 (Analytik Jena) et normalisés par rapport à l'expression de l'actine. Les amorces utilisées proviennent de chez Sigma :

Nom	Sens	Antisens
Sod1	GAGCAGAAGGAAAGTAATGG	GATTAAGTGAGGACCTGC
Sod2	ATCATACCCTAATGATCCCAG	AGGACCTTATAGGGTTTTTCAG

- Quantification des ROS intra-cellulaires dans les prostates de souris

Le protocole de dissociation est le même que celui réalisé pour le scRNAseq de l'article. Les souris utilisées ont entre 6 et 8 mois. Le set d'anticorps modifié, les anticorps composant le lin sont remplacés par ces anticorps de chez Invitrogen couplés à l'A700:  $\alpha$ -CD45 (Clone 30-F11),  $\alpha$ -TER119 (clone Ter1) et  $\alpha$ -CD31 (clone 390).

La sonde H2-DCFDA à été ajoutée pendant 15min avant l'addition du set d'anticorps pendant 45min. Les cellules sont ensuite marquées au Cyttox Blue™ avant d'être rapidement triées par cytométrie de flux à du trieur BD FACSAria III. La fluorescence des cellules est quantifiée et analysée à l'aide du logiciel FlowJo (FLOWJO, LLC).

- Tests statistiques et reproductibilité

Les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism9 (<https://www.graphpad.com/>). Les données sont représentées par la moyenne +/- la déviation standard comme indiqué. Les informations concernant les tests statistiques utilisés ainsi que le nombre d'échantillons est indiqué dans la légende.

## B. RESULTATS

Afin de quantifier l'effet antioxydant du composé en condition de stress basal ou induit, les cellules BPH-1 et WPMY-1 ont été traitées pendant 24h avec l'ATT avant de rajouter ou non du peroxyde d'hydrogène directement dans le milieu de culture. L'analyse des cellules montre que dans ces conditions, le traitement ne modifie pas la concentration intracellulaire de ROS des cellules BPH-1 (**Figures 25A et 25B**), mais qu'en revanche l'ATT possède un effet antioxydant sur les cellules WPMY-1. En effet, il est capable de diminuer les ROS intracellulaires en condition basale mais également en condition stressée (**Figures 25C et 25D**). Par ailleurs, il est plus puissant que le NAC puisqu'il est utilisé à une concentration 1000 fois inférieure à ce dernier et induit une diminution similaire de la concentration des ROS. La diminution du stress oxydant induit dans les cellules WPMY-1 pourrait indiquer que l'ATT possède aussi des propriétés chélatrices de ROS.

Les cellules BPH-1 semblent être moins sensibles aux stress oxydant que les cellules WPMY-1, puisque même en étant traitées avec une concentration plus forte en peroxyde d'hydrogène nous ne sommes pas parvenus à augmenter la concentration intracellulaire de ROS. De même ni l'ATT ni le NAC n'ont diminué la concentration de ROS dans ces cellules. Pour confirmer la résistance de ces cellules aux ROS, nous avons traité les deux types cellulaires avec des doses croissantes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et évalué leur viabilité cellulaire après 72h. Effectivement, pour une même concentration, les BPH-1 sont bien plus résistantes au stress oxydant induit que les cellules WPMY-1 (**Figure 25E**).

La concentration des ROS dans la cellule est finement contrôlé par différentes enzymes antioxydantes, parmi lesquelles les superoxydes dismutases. Nous avons donc évalué si l'expression de ces enzymes était plus élevée dans les cellules BPH-1, ce qui pourrait expliquer leur plus forte résistance face à un stress oxydant induit. Les niveaux d'expression des *SOD1* et *SOD2* sont respectivement trois fois et huit fois supérieurs dans les cellules BPH-1 que dans les cellules WPMY-1 (**Figures 25F et 25G**). Par ailleurs dans ces dernières le traitement ATT induit une légère augmentation de la *SOD2* (mitochondriale). Elle n'est cependant pas visible sur cette représentation graphique puisque la différence d'expression avec les cellules BPH-1

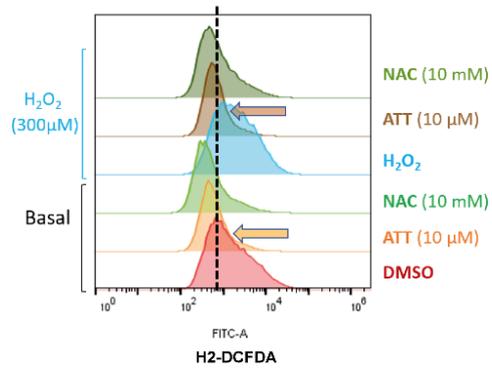
écrase cette petite différence. Ainsi le traitement ATT semble avoir une capacité différente de modulation du stress oxydant dans les lignées prostatiques épithéliale et myofibroblastique. Nous discuterons des éventuelles raisons qui pourrait expliquer ces différences dans le chapitre **II.B** de la discussion.

---

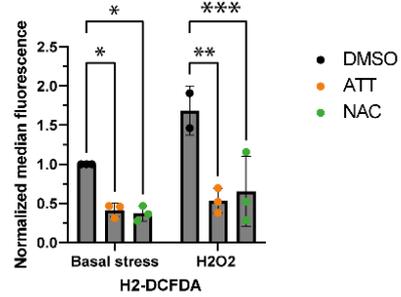
**Figure 25: Evaluation de l'effet de l'ATT sur les lignées BPH-1 et WPMY-1**

Evaluation de la concentration de ROS intracellulaire par FACS à l'aide de la sonde DCFDA après 24h de traitement suivi de l'induction d'un stress oxydant par ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300µM pour les WPMY-1 et 500µM pour les BPH-1). (A et C) Représentations graphiques des intensités de fluorescence d'une expérience type et (B et D) la quantification de 3 (WPMY-1) et 6 expériences (BPH-1) indépendantes. (E) mesure de la viabilité cellulaire des cellules WPMY-1 et BPH-1 (comme indiqué) en fonction de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (F-G) Histogrammes représentant la différence d'expression de la *SOD1* et de la *SOD2* des cellules avec ou sans traitement ATT (valeurs normalisées par rapport à la condition cellules BPH-1 + DMSO). Tests statistiques par Two-way Anova. Les barres d'erreurs représentent la variation standard (\*p <0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0,001 et \*\*\*\* p<0,0001).

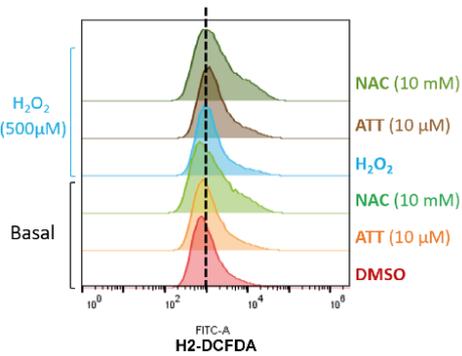
A. Concentration des ROS dans les WPMY-1



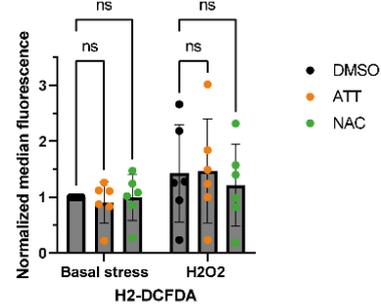
B. Quantification des ROS dans les WPMY-1



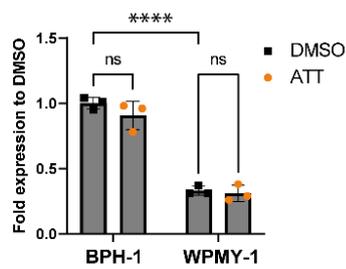
C. Concentration des ROS dans les BPH-1



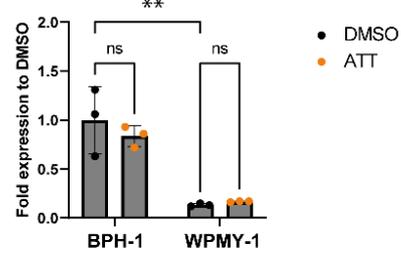
D. Quantification des ROS dans les BPH-1



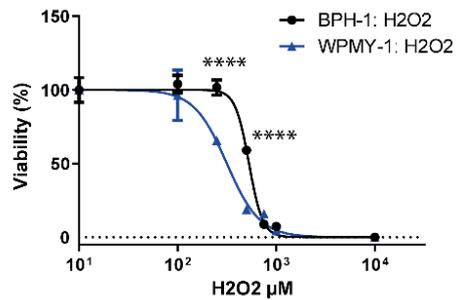
E. Expression de la *SOD1*



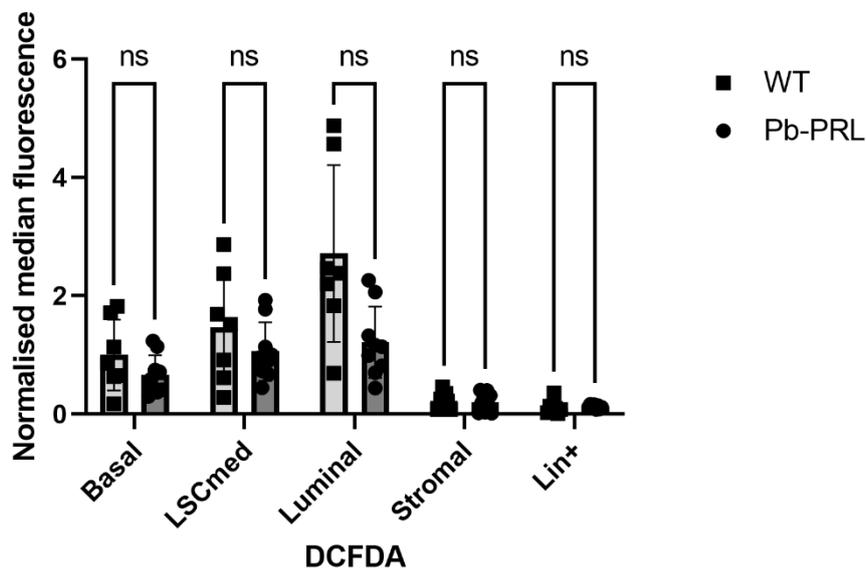
F. Expression de la *SOD2*



G. Evaluation de la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Afin de comparer le stress oxydant dans les différents types cellulaires composant les prostates de souris WT et Pb-PRL. Nous avons modifié notre set habituel de d'anticorps/fluorochromes afin de pouvoir y ajouter le HE-DCFDA. Nous pouvons constater que les cellules épithéliales ont davantage de ROS que les cellules stromales et immunitaires (**Figure 26**). Par ailleurs nous n'avons pas été capables de montrer que les prostates de souris Pb-PRL ont un stress oxydant plus fort (**Figure 26**). Cependant, le protocole de digestion et dissociation cellulaire étant long, il est possible que de légères différences mais cependant significatives du point de vue physiologique, se lissent au cours de la préparation de l'expérience.



**Figure 26: Concentration des ROS dans les cellules prostatiques des souris WT et Pb-PRL**

Evaluation de la concentration de ROS intracellulaire des cellules prostatique de souris réalisé par FACS. Les prostates de souris WT et Pb-PRL ont été digérées par la collagénase, puis les cellules ont été dissociées suivant le même protocole utilisé que pour l'article. Le set d'anticorps/fluorochrome a dû être changé pour pouvoir y ajouter la sonde DCFDA. La moyenne de fluorescence des cellules est normalisée par la moyenne des cellules WT basales dans une même expérience. Chaque point représente une souris (n=4). Test statistique Two-way Anova.

## DISCUSSION

### I. La souris Pb-PRL, un modèle pertinent d'HBP

#### A. SIGNAL ANDROGENIQUE ET PLASTICITE CELLULAIRE DANS L'HBP

Le rôle exact des androgènes dans l'étiologie de l'HBP reste encore mal compris, voire paradoxal. En effet, les androgènes ont des actions distinctes au cours de la vie des hommes. S'ils favorisent la croissance et la différenciation cellulaires lors du développement du tissu prostatique (Chung and Cunha, 1981), après l'adolescence par contre ils maintiennent au contraire son épithélium en quiescence (Evans and Chandler, 1987; Zhang *et al.*, 2016). En cohérence avec ceci, l'HBP se manifeste à des âges où les concentrations sériques d'androgènes diminuent, et il a été montré que les hommes âgés ayant des concentrations androgéniques plus élevées que la moyenne ont moins de risque de développer cette pathologie (Kristal, Schenk, *et al.*, 2008). Cependant, les hommes castrés avant l'adolescence ne développent pas d'HBP en vieillissant (Wilson and Roehrborn, 1999). L'épithélium luminal prostatique subit une croissance importante pendant l'adolescence (Cunha *et al.*, 1987), notamment via une prolifération des cellules luminales. Les hommes castrés se distinguent donc des hommes non castrés par leur prostate restée à l'état « prépubère ». Nous connaissons maintenant l'action de la diminution des androgènes sur la prostate adulte. Ainsi, la prostate des hommes non castrés est enrichie en cellules luminales pouvant, à la suite de la diminution des androgènes, se différencier en cellules luminales progénitrices. Si on considère l'hypothèse (discutée en chapitre **I.C** de Discussion) que ces cellules sont impliquées dans l'HBP humaine, nous pouvons supposer que ce phénomène de plasticité contribue directement à l'HBP chez l'homme.

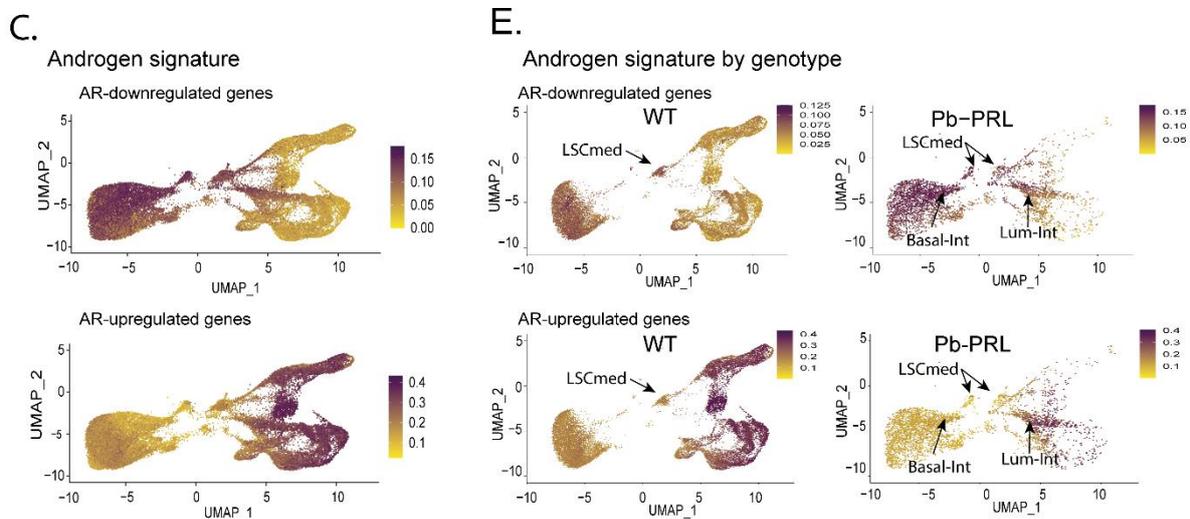
Se pose alors la question des mécanismes régulant l'action des androgènes au cours de la vie. Certaines hypothèses suggèrent que ce changement d'action serait lié à la modification du ratio androgènes/oestrogènes. En effet, suite à la diminution des niveaux d'androgènes avec l'âge, ce ratio diminue au cours du temps (Roberts *et al.*, 2004). L'injection combinée de testostérone et d'oestradiol chez le rat est d'ailleurs une des stratégies expérimentales

utilisées pour induire l'hyperplasie prostatique dans des modèles précliniques (Nicholson *et al.*, 2012). De surcroît, lorsque la concentration sérique en androgènes dépasse la valeur médiane de 49,8ng/dl, la concentration en œstradiol est positivement corrélée aux SBAU, alors que sous ce seuil, il n'y a plus de corrélation, suggérant un effet synergique des deux hormones dans l'étiologie de l'HBP (Roberts *et al.*, 2004).

Dans notre modèle Pb-PRL, des études antérieures du laboratoire avaient montré que la signalisation androgénique de la prostate était altérée. De plus, bien que les cellules LSC<sup>med</sup> expriment le récepteur AR (ARNm) à des niveaux similaires à ceux observés dans les cellules luminales différenciées, la localisation de la protéine est majoritairement cytoplasmique, traduisant *de facto* une diminution de son activité transcriptionnelle (Sackmann Sala *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'indice de prolifération de l'épithélium de ces souris est plus élevé que celui d'une souris sauvage. Nos résultats obtenus par analyses scRNAseq montrent que cette diminution du signal androgénique tissulaire est notamment liée à la perte des cellules luminales différenciées, possédant une signature androgénique forte, au profit des cellules LSC<sup>med</sup>, dont l'androgéno-indépendance résulte d'une signalisation androgénique intrinsèquement faible (Sackmann Sala *et al.*, 2017). En plus de la déplétion des cellules luminales différenciées, l'expression de la signature androgénique diminue aussi dans l'ensemble des cellules du compartiment luminal des prostates de souris Pb-PRL comparativement aux cellules équivalentes dans la souris contrôle (via une augmentation de l'expression des gènes réprimés par AR). Cette composition cellulaire particulière de l'épithélium prostatique des souris Pb-PRL était évocatrice d'une possible plasticité des cellules luminales, et d'un lien potentiel de cette plasticité avec la baisse de signalisation androgénique. Nous nous sommes donc interrogés sur cette hypothèse.

Depuis plusieurs décennies, il est admis que la castration induit une apoptose massive des cellules luminales androgéno-dépendantes, alors que les cellules basales, androgéno-indépendantes, survivent et sont supposées régénérer l'épithélium luminal lors du traitement des animaux castrés par des androgènes (Bruchovsky *et al.*, 1976; Sugimura, Cunha and Donjacour, 1986; English, Santen and Isaacs, 1987; Evans and Chandler, 1987). Récemment, la répétition de ces expériences de castrations-régénérations et leur analyse par des

approches modernes de scRNAseq couplées à des algorithmes bio-informatiques puissants, ont quelque peu revisité cette vision dogmatique. En effet, si une grande partie des cellules luminales différenciées meurent effectivement suite à la diminution drastique des androgènes circulants, une partie non négligeable d'entre elles survivent et se différencient en cellules "LSC<sup>med</sup>-like" indépendantes des androgènes (Karthaus *et al.*, 2020). Dans le modèle Pb-PRL, la baisse du signal androgénique, certes moins drastique que dans un contexte castré, est concomitante de l'augmentation du contingent de cellules LSC<sup>med</sup> par rapport à des souris contrôles, et cette tendance s'accroît encore après la castration (Sackmann Sala *et al.*, 2017). Nos analyses par scRNAseq confirment cette caractéristique phénotypique de l'épithélium de la Pb-PRL par rapport aux souris sauvages. En accord avec la publication de Karthaus et collègues (2020), nos analyses bio-informatiques de trajectoires par l'algorithme scVelo suggèrent qu'il existe un continuum entre les cellules luminales différenciées, androgéno-dépendantes, et les cellules LSC<sup>med</sup>, androgéno-indépendantes. De manière intéressante, la signature androgénique s'amenuise progressivement à mesure que les cellules luminales sont proches du *cluster* LSC<sup>med</sup> (Figure 27).



**Figure 27: Expression des gènes activés et réprimés par AR dans les prostates de souris**

UMAPs représentant l'expression des gènes activés (*AR-upregulated genes*) et réprimés (*AR-downregulated genes*) par AR au sein des épithéliums de souris WT et Pb-PRL combinées (C) ou par génotype (E). La signature androgénique est forte dans les cellules luminales différenciées, moyenne dans les cellules luminales intermédiaires (Lum-Int) et très faible dans les cellules LSC<sup>med</sup> et basales. Figure issue de Dos Santos *et al.* (sous presse).

Ainsi, la dédifférenciation semble associée à une diminution du signal androgénique dans les cellules, en cohérence avec les observations de Karthaus et collègues dans le processus temporel de dédifférenciation induit par la castration chez les souris sauvages. Malgré une prévalence différente des cellules LSC<sup>med</sup> dans les différents lobes prostatiques des souris Pb-PRL, les profils UMAP et l'analyse SC-Velo des prostates de souris Pb-PRL montrent que les cellules luminales appartenant à tous les lobes de la prostate peuvent se dédifférencier en cellules LSC<sup>med</sup>. Bien que ces observations mettent en lumière une corrélation entre signalisation androgénique et dédifférenciation épithéliale, il est difficile actuellement d'affirmer une relation causale entre ces deux phénomènes. En effet, l'élément déclencheur de la plasticité cellulaire pourrait bien être la baisse du signal androgénique, mais la confirmation de cette hypothèse requiert l'identification du mécanisme induisant cette baisse de la signalisation AR. Alternativement, la diminution du signal androgénique observée dans les prostates Pb-PRL pourrait être simplement le reflet de l'enrichissement en cellules LSC<sup>med</sup>, lequel pourrait en réalité être induit par d'autres mécanismes, comme par exemple la signalisation STAT5. Ceci est discuté dans le chapitre suivant.

## B. LA VOIE DE SIGNALISATION PRL/STAT5 DANS L'HBP

Des études anciennes avaient montré que la concentration sérique de la PRL était positivement corrélée à l'âge mais pas à l'HBP chez l'homme (diagnostiquée par la présence de SBAU) (Hammond *et al.*, 1977; Ron *et al.*, 1981). Aussi, le récepteur de la PRL (PRL-R) est exprimé par les cellules épithéliales luminales des prostates humaines et murines, ainsi que par les fibroblastes (Dos Santos *et al.*, sous presse ; et Bole-Feysot *et al.*, 1998). Cependant l'expression de PRL *in situ* est observée dans les cellules épithéliales de la prostate humaine saine (Nevalainen *et al.*, 1997), suggérant qu'une boucle autocrine-paracrine pourrait contribuer à la prolifération cellulaire. Cette expression locale de PRL est également retrouvée dans 54% des cancers hormono-résistants (Dagvadorj *et al.*, 2007). Une vieille étude avait observé que l'expression sérique de la PRL dans les tissus récupérés après chirurgie pour HBP, ne reflétait pas la concentration prostatique. Cependant, la comparaison de la concentration *in situ* de la PRL entre des hommes sains et souffrant d'HBP n'est à notre connaissance pas

documentée, et il serait intéressant de l'étudier afin d'évaluer son éventuelle corrélation à la maladie.

La signalisation de la PRL et la signalisation androgénique ont été décrites comme ayant des actions synergiques chez le rat (Nevalainen *et al.*, 1997). De manière physiologique, la PRL est exprimée dans les cellules luminales de la prostate de rat et la protéine est retrouvée dans les granules de sécrétion de ces cellules (Nevalainen *et al.*, 1997). Chez le rat, l'expression de la PRL est perdue suite à la castration, mais son expression est restaurée lorsque ces rats castrés sont traités avec des androgènes. Ces données suggèrent que l'expression prostatique de PRL est régulée par les androgènes. Il n'est actuellement pas connu si l'inverse est vrai, à savoir si la signalisation PRL pourrait réguler le signal androgénique, et en l'occurrence contribuer à sa diminution observée dans la prostate des souris Pb-PRL. Par ailleurs, une étude récente réalisée chez la gerbille a montré qu'un traitement court par la PRL suffit à restaurer le poids des prostates chez des animaux castrés (Zanatelli *et al.*, 2021). Les auteurs montrent que la castration induit chez cette espèce une augmentation de la quantité de ER $\alpha$  (action pro-proliférative dans la prostate) ainsi qu'une diminution de la quantité d'AR dans les cellules épithéliales. La PRL peut donc, du moins en partie, compenser une baisse de signal androgénique, ce qui est en phase avec le modèle Pb-PRL, dont l'hypertrophie prostatique est induite dans un contexte de surexpression de PRL et de faible signal androgénique.

Bien que le PRL-R soit capable d'activer de nombreuses voies de signalisation dans différents tissus (JAK2/STAT1-3-5, MAPK, PI3K/Akt, Src kinases, etc), la voie JAK2/STAT5 est considérée comme la voie canonique de ce récepteur (Bole Feysot 1998). Dans la prostate, c'est d'ailleurs la seule qui soit réellement détectée au sein des cellules luminales suite à une stimulation par la PRL (Rouet *et al.*, 2010; Goffin *et al.*, 2011; Sackmann-Sala *et al.*, 2014) Cette voie joue un rôle prépondérant dans le phénotype d'HBP des souris Pb-PRL puisque notre équipe a montré que la délétion du gène *Stat5* dans les cellules luminales prostatiques réduisait les principaux phénotypes liés à l'HBP, dont l'hypertrophie, la déplétion des cellules luminales et l'inflammation (Boutillon *et al.*, 2019). Dans la souris Pb-PRL, notre analyse par scRNAseq montre que l'expression épithéliale du PRL-R et du réactome PRL-R se cantonne essentiellement au *cluster* luminal intermédiaire, où la voie STAT5 est également activée (Dos

Santos *et al.*, sous presse- **Figures 3F et 3G**). La signalisation PRL/STAT5 pourrait donc jouer un rôle actif dans la plasticité du compartiment épithélial en favorisant l'étape initiale de la dédifférenciation luminale au profit de cellules moins différenciées (Lum-int). Même si l'expression de PRL-R (ARNm) n'est pas retrouvée dans les cellules LSC<sup>med</sup>, la signalisation PRL/STAT5 pourrait donc contribuer à l'étiologie et la résistance au traitement de l'HBP en favorisant l'amplification de compartiments cellulaires indépendants des androgènes.

En contexte cancéreux, il a été montré que la voie de signalisation JAK/STAT est également associée à la plasticité des cellules lumineales vers un profil de cellules progénitrices indépendantes des androgènes (Chan *et al.*, 2022). L'inhibition aussi bien génétique que pharmacologique de cette voie resensibilise d'ailleurs les cellules aux thérapies anti-androgéniques puissantes telles que l'enzalutamide (Deng *et al.*, 2022). En contexte physiologique, une fraction de cellules lumineales dites IDH1<sup>+</sup> et LTF<sup>+</sup>, présentant un phénotype transcriptomique intermédiaire entre les cellules totalement différenciées (KLK3<sup>+</sup>) et les cellules Club/Hillock, présentent une signalisation androgénique plus faible et une signalisation STAT5 plus forte que ces cellules lumineales sécrétoires KLK3<sup>+</sup> (Yan *et al.*, 2022). Ce n'est pas sans rappeler le phénotype des cellules Lum-Int dans notre modèle Pb-PRL. Ainsi, il est tout à fait possible que les voies gouvernant la dédifférenciation au sein des prostates humaines et de souris soient conservées entre ces deux espèces. Ce serait là une caractéristique supplémentaire faisant des souris Pb-PRL un modèle pertinent pour l'étude de l'étiologie de l'HBP.

Une des faiblesses de notre étude résulte de l'absence de connaissances approfondies sur les gènes cibles de STAT5 dans la prostate. En effet, la signalisation STAT5 est surtout documentée dans le sein et les cellules immunitaires. C'est d'ailleurs une signature de signalisation immunitaire (IL2-STAT5) que nous avons utilisée pour nos recherches bio-informatiques, tout comme d'autres auteurs l'ont fait récemment (Chan *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2022). Déterminer les cibles transcriptomiques de la voie de signalisation STAT5 dans la prostate et l'interaction transcriptionnelle et/ou fonctionnelle de cette voie avec la signalisation androgénique, est aujourd'hui nécessaire pour mieux comprendre les réponses cellulaires qui en résultent. Il est également nécessaire de caractériser le statut de la voie de signalisation STAT5 dans les tissus

HBP afin de renforcer son rôle éventuel dans la pathologie. Ce sont là des axes de recherche qui ont été ouverts dans notre laboratoire.

### C. IMPLICATION DES CELLULES LUMINALES PROGENITRICES DANS L'HBP

L'augmentation de la prévalence des cellules Club et Hillock dans l'HBP humaine a été documentée par scRNAseq par au moins deux équipes (Joseph *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022). Si leur localisation préférentielle en zone de transition suggère un rôle dans la pathologie, leur implication causale dans l'étiologie de l'HBP reste cependant à démontrer, de même que les mécanismes sous-jacents. Certains éléments permettent de formuler des hypothèses. Les organoïdes (et prostasphères) issus des cellules LSC<sup>med</sup> sont plus gros que ceux issus des cellules luminales (Sackmann-Sala *et al.*, 2014; Baures *et al.*, 2022), c'est un constat que nous faisons régulièrement au laboratoire. La taille de ces structures 3D étant généralement associée à la prolifération cellulaire, on pourrait imaginer que les cellules luminales progénitrices - LSC<sup>med</sup> chez la souris et les Club et Hillock chez l'homme – contribuent à l'hyperplasie prostatique en raison de leur plus forte capacité proliférative. En accord avec cette hypothèse, les marquages immunohistochimiques de KRT4 (cellules LSC<sup>med</sup>) (Sackmann-Sala *et al.*, 2014) et Ki-67 (cellules en prolifération) sont plus élevés dans le modèle Pb-PRL que dans la souris sauvage (Dos Santos *et al.*, sous presse). Les deux anticorps étant produits tout deux chez la même espèce (lapin), il ne nous a cependant pas été possible de réaliser un co-marquage KRT4/Ki-67 pour affirmer que ce sont bien les cellules LSC<sup>med</sup> qui prolifèrent dans la prostate des souris Pb-PRL. Des marquages réalisés sur des coupes sériées permettraient d'avancer sur cette hypothèse. Une méthode alternative serait de quantifier le marquage Ki-67 par FACS.

Les cellules progénitrices sont connues pour être généralement en quiescence dans les organes adultes, et pour ne s'activer que sous l'action de certaines stimulations pour renouveler (réparer) les tissus endommagés. C'est par exemple le cas dans la prostate lors de cycles de castrations-régénérations. Parmi les autres stimulations connues figure le stress

oxydant, qui promeut la prolifération des cellules progénitrices de différents organes (Tan and Suda, 2018). Chez l'homme, les taux de marqueurs de stress oxydant, comme le MDA ou le 8oxoG, sont plus élevés dans l'épithélium prostatique des patients atteints d'HBP que des hommes sains (Merendino *et al.*, 2003; Zabaïou *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019). Nos données préliminaires obtenues par FACS suggèrent que les cellules ayant des capacités souches/progénitrices (LSC<sup>med</sup> et basales) ont des concentrations en ROS plus importantes que les cellules luminales ou encore stromales (**Figure 26**). Bien que, dans ces expériences, nous n'ayons pas observé de concentrations de ROS plus importantes dans les cellules issues de prostates de souris Pb-PRL par rapport aux souris sauvages (**Figure 26**), nous avons montré par scRNAseq que leur système antioxydant était plus faiblement exprimé, ce qui pourrait leur conférer une plus grande sensibilité à un même stress oxydant (Dos Santos *et al.*, sous presse—**Figures 4A, 4B et 4H**)

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de quantifier divers marqueurs de stress oxydant. La détection des protéines oxydées par oxyblot et la détection des 8oxoG n'ayant pas donné de résultats convaincants (négatifs ou peu reproductibles), une autre possibilité serait la détection des lipides peroxydés comme le 4HNE ou le MDA, par IHC ou WB. Ces expériences restent à faire.

En conclusion de cette première partie, l'HBP semble intrinsèquement enrichie en cellules luminales androgéno-indépendantes de type cellules Club, et notre modèle animal, par l'amplification des cellules LSC<sup>med</sup>, reflète bien cette caractéristique. La proportion relative de ces cellules au sein des HBP pourrait donc contribuer à l'efficacité variable des 5ARI observée chez les patients. De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment (Chapitre **I.D**), la baisse de la signalisation androgénique, par les 5ARI, contribue à augmenter la proportion des cellules Club par plasticité des cellules luminales. Ce cercle vicieux (les 5ARI augmentant le contingent de cellules qui leur sont résistantes) pourrait peut-être expliquer la perte progressive d'efficacité des 5ARI chez certains patients souffrant d'HBP, ce qui renforce le besoin de thérapies alternatives. Ce mécanisme pourrait également avoir un impact sur le développement de cancers de la prostate chez les patients âgés. En effet, l'étude REDUCE a montré que le traitement par 5ARI de patients à risque de développer un cancer de la prostate

(50-75 ans, PSA entre 2.5 et 10 ng/mL, biopsie négative) diminuait le risque de détection d'un cancer prostatique, mais par contre, augmentait la détection de cancers de haut grade (Andriole *et al.*, 2010). Rien à l'époque ne permettait de savoir si cette hausse résultait d'un biais de dépistage renforcé, d'une plus forte probabilité de détection de ces cancers grâce à la réduction de la taille des prostates sous 5ARI, ou à une émergence *stricto sensu* de ces cancers. On peut aujourd'hui émettre l'hypothèse que, si les 5ARI facilitent également la plasticité des cellules luminales dans un contexte cancéreux (le cancer prostatique humain est quasi exclusivement luminal), cela pourrait conduire à un enrichissement en cellules de type "cellules souches cancéreuses" susceptibles de favoriser l'émergence de cancers plus agressifs.

#### D. INTERACTIONS PARACRINES DANS L'HBP

Chez l'homme, l'équipe du Dr. Strand constate une plus grande quantité de fibroblastes au sein de la zone de transition, siège de l'HBP, par rapport à la zone périphérique (Joseph *et al.*, 2021). Au sein de la prostate de souris Pb-PRL, nous constatons également une augmentation de la proportion de myofibroblastes par scRNASeq, ainsi que l'émergence d'une nouvelle population que nous avons dénommée "*BPH-fibroblasts*" car elle n'existe quasiment pas dans la souris sauvage (Dos Santos *et al.*, sous presse). De manière intéressante, l'analyse GSEA révèle que ces cellules surexpriment des voies impliquées dans l'inflammation comme la voie TNF- $\alpha$  ou l'interféron- $\gamma$ , modulant la prolifération épithéliale, ainsi que des facteurs impliqués dans le développement (données préliminaires non montrées).

Ces cellules stromales tissent de fortes connexions avec les cellules épithéliales, et de nombreuses interactions ont été mises en évidence aussi bien lors du développement embryonnaire que dans la prostate adulte, incluant l'HBP (Lee *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2021). Comme discuté précédemment, l'action des androgènes au sein des prostates diffère entre les stades de développement et le stade l'adulte. Cette différence d'action pourrait également

être causée par un changement du micro-environnement. En effet, la délétion de AR dans les myofibroblastes induit une prolifération accrue des cellules luminales (Liu *et al.*, 2022) chez les souris adultes, alors qu'une délétion dans les souris prépubères réduit la prolifération de l'épithélium (Olson *et al.*, 2021).

En contexte HBP, il a été démontré que le stroma est plus réactif que dans un contexte sain (Schauer *et al.*, 2008; Schauer, Ressler and Rowley, 2009). Dans les fibroblastes de souris Pb-PRL, nous avons aussi remarqué l'activation de la voie de signalisation TNF- $\alpha$  (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figure S5**) par rapport aux fibroblastes de souris sauvages. De surcroît, il a été montré que le TNF- $\alpha$  diminue l'expression de la *SRD5A2* et augmente l'expression de l'aromatase dans les fibroblastes permettant la conversion de la testostérone en estrogène (Wang *et al.*, 2017). Ce *switch* pourrait contribuer à la baisse du signal androgénique et favoriser l'hyperplasie épithéliale. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une réduction de l'hyperplasie épithéliale, tant chez l'homme que chez la souris, lors d'un traitement par un antagoniste du récepteur TNF (Vickman *et al.*, 2022). De plus, ce traitement diminue également l'inflammation médiée par les macrophages (Vickman *et al.*, 2022), qui est susceptible elle aussi de stimuler la prolifération épithéliale.

Avec l'âge, et en particulier dans le contexte d'HBP, il est constaté une augmentation de l'infiltration de lymphocyte B et T dans la prostate humaine (Fox *et al.*, 2023). Le compartiment immunitaire joue sans doute un rôle important dans l'étiologie et/ou la progression de L'HBP, certains auteurs considérant même l'HBP comme une maladie auto-immune (Kramer, Mitteregger and Marberger, 2007; Bostanci *et al.*, 2013; M. Zhang *et al.*, 2020; Vickman *et al.*, 2022). A ce titre, il est intéressant de noter les nombreux liens établis entre la PRL et les maladies auto-immunes (Orbach and Shoenfeld, 2007; Goffin and Touraine, 2015; Borba, Zandman-Goddard and Shoenfeld, 2018), dont certains mécanismes pourraient trouver écho dans le modèle Pb-PRL. Comme chez l'homme, les prostates hyperplasiques de ces souris sont inflammatoires, et nous avons constaté une augmentation de la proportion des lymphocytes T par rapport aux prostates de souris sauvage, dans lesquelles les cellules immunitaires résidentes sont très peu nombreuses. Les cellules progénitrices luminales de type LSC<sup>med</sup>/Club/Hillock sont enrichies en voies immunomodulatrices et expriment elles-mêmes

des facteurs activant ces voies, tels que *Pglyrp1*, *Txnip* ou *S100a11* (Baures *et al.*, 2022), des chimiokines *Cxcl17*, *Cxcl13*, *Cxcl15/IL8* et des régulateurs du complément comme *C3* et *C7* (Sackmann Sala *et al.*, 2017). Il a par ailleurs été suggéré que les cellules immunitaires avaient plus d'interactions avec les cellules Club/Hillock qu'avec les autres cellules épithéliales (Yan *et al.*, 2022). Ainsi, l'augmentation conjointe de ces deux compartiments cellulaires dans l'HBP pourrait résulter d'interactions réciproques via des voies de signalisation immunomodulatrices identifiées dans chacun d'eux (Zhang *et al.*, 2016). Enfin, il est à noter que les traitements par 5ARI, qui sont corrélés à une augmentation de la prévalence des cellules Club chez l'homme (Joseph *et al.*, 2021), sont également connus pour induire l'inflammation de la prostate via la sécrétion de diverses chimiokines (Zhang *et al.*, 2016). Les 5ARI pourraient donc également contribuer à l'amplification du compartiment épithélial androgéno-indépendant par le biais d'interactions paracrines impliquant ce compartiment immunitaire, ce qui ne ferait qu'aggraver le cercle vicieux évoqué plus haut.

Chez les gerbilles, le traitement par la PRL diminue l'expression du PRL-R dans les cellules épithéliales, mais l'augmente dans les cellules stromales et immunitaires (Zanatelli *et al.*, 2021). Le PRL-R est également exprimé par certains fibroblastes et cellules immunitaires dans les prostates de souris Pb-PRL (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figure 1H**). La PRL sécrétée dans le microenvironnement des souris Pb-PRL pourrait donc également contribuer à la prolifération de ces deux compartiments cellulaires par des mécanismes paracrines. Afin de décrypter ces dialogues paracrines réciproques, il serait intéressant de stimuler les cellules WPMY-1 *in vitro* avec de la PRL et d'évaluer les changements d'expression dans ces cellules, mais également de déterminer si l'ajout de leurs milieux conditionnés à des cellules BPH-1 ou des organoïdes de souris stimulerait leur prolifération.

## II. Stratégie thérapeutique antioxydante pour l'HBP

### A. EFFETS SYMPTOMATIQUES DE L'ATT SUR LA SOURIS Pb-PRL

Les souris Pb-PRL présentent une baisse globale de la signature d'expression des enzymes antioxydantes par rapport aux souris contrôles (Dos Santos *et al.*, sous presse -**Figures 4A, 4B et 4H**), ce qui est supposé augmenter leur sensibilité au stress oxydant. Bien que le mécanisme responsable de ce phénotype reste à élucider, il pourrait être en partie lié à l'activation de la signalisation STAT5. En effet, il a été décrit que STAT5 pouvait promouvoir le stress oxydatif dans les leucémies myéloïdes chroniques en réprimant l'expression des enzymes antioxydantes, comme la catalase et la glutaredoxin-1 (Bourgeois *et al.*, 2017). Un mécanisme similaire pourrait donc être observé dans les prostates des souris Pb-PRL. Quels que soient les mécanismes impliqués, il était donc pertinent d'utiliser le modèle Pb-PRL pour tester l'éventuel bénéfice d'une thérapie basée sur l'utilisation d'une molécule antioxydant comme l'ATT.

Comme décrit dans notre travail expérimental, la collaboration avec le laboratoire Humana Biosciences (Toulouse) nous a permis de mettre en évidence que les souris Pb-PRL présentaient, par rapport à des souris contrôles, une altération des paramètres urodynamiques durant la nuit (période d'activité des souris), dont une fréquence de miction augmentée, et un volume d'urine par miction et un flux urinaire réduits (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figures 1A-D**), de manière parallèle aux SBAU présents dans l'HBP humaine. Le suivi longitudinal des souris Pb-PRL traitées par ATT a permis de démontrer que la fréquence de miction et le volume d'urine par miction étaient significativement améliorés suite au traitement (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figures 4D-E**), et que le flux urinaire était augmenté chez 8 souris sur 11 (effet global non significatif sur n=11 - **Figure 4F**). Ces effets s'accompagnent d'une réduction significative du poids des prostates (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figure 4C**). Dans ce modèle préclinique, la stratégie anti-oxydante par ATT a donc des effets bénéfiques sur le plan symptomatique.

Quelques études récentes ont testé l'effet de stratégies antioxydantes impliquant d'autres molécules, dont la mitoquinone, l'apocynine et l'extrait de marjolaine (*Origanum majorana*) (Jin, Kim, *et al.*, 2023, 2023; Jin, Lim, *et al.*, 2023). Si ces molécules ont également induit une réduction des poids prostatiques des souris concomitante aux effets anti-prolifératifs et anti-inflammatoires, aucune à notre connaissance n'a démontré un effet bénéfique sur les paramètres urodynamiques des animaux. Nos observations avec l'ATT sont donc en ces sens particulièrement originales.

## B. EFFETS DE L'ATT SUR LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS CELLULAIRES

Afin de comprendre les effets fonctionnels observés *in vivo*, nous avons essayé de décrypter les effets de l'ATT sur les différents compartiments cellulaires prostatiques, en nous focalisant sur les cellules épithéliales, et dans une moindre mesure, stromales et immunitaires.

L'ATT induit une diminution de la prolifération des cellules épithéliales BPH-1, que nous considérons comme un modèle cellulaire "*LSC<sup>med</sup>-like*" puisqu'elles expriment la *KRT4* ainsi que d'autres marqueurs de cellules progénitrices comme *ALDH1A3*, *KRT13*, *LCN2*, *PPARG* et *AQP3* (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figure S15D**). Bien que nous n'ayons pas été en mesure de mettre en évidence une diminution de la prolifération épithéliale chez la souris Pb-PRL traitée par ATT, que ce soit par une approche immunohistochimique (marquages Ki-67) ou bio-informatique (signature de prolifération - données non montrées), nous constatons que le traitement *in vitro* induit une diminution de la taille des organoïdes issus des cellules basales et *LSC<sup>med</sup>* (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figures 6I-K**). L'ATT n'impactant pas la viabilité cellulaire des cellules BPH-1 (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figures 5B et 5F et Figures S13A et S13B**), nous pensons qu'il exerce un effet anti-prolifératif sur les cellules épithéliales, et formulons l'hypothèse qu'un traitement par ATT plus long aurait peut-être permis d'observer une diminution de la prolifération de l'épithélium dans la souris Pb-PRL.

Par ailleurs, le traitement induit également la diminution des caractéristiques progénitrices des cellules épithéliales. En effet, le traitement *in vitro* induit une diminution du nombre d'organoïdes issus des cellules basales. Une observation similaire a été faite sur les organoïdes issus des cellules LSC<sup>med</sup>, leur nombre étant plus faible dans les puits traités que dans les puits contrôle. Le résultat moins robuste que pour les cellules basales (pas de différence significative ; Dos Santos *et al.*, sous presse– **Figures 6I et 6J**) résulte d'une plus grande variabilité dans les trois expériences réalisées. Nous avons dû faire face à une difficulté de génération des organoïdes sur la fin du projet, nous empêchant de pouvoir augmenter le nombre d'expériences sur le plan statistique pour confirmer la tendance observée. Par ailleurs, les marqueurs caractéristiques des cellules LSC<sup>med</sup> exprimés par la lignée cellulaire humaine BPH-1 (listés ci-dessus) voient tous leur expression diminuée sous traitement ATT. Ainsi, nous pouvons penser que certains des effets du traitement ATT sont le résultat d'une action directe sur les propriétés progénitrices de l'épithélium. La contribution de ce compartiment cellulaire dans l'HBP a été discuté dans le chapitre **I.C.**

L'ATT impacte également le compartiment stromal. En effet, dans les prostates de souris Pb-PRL, l'analyse scRNASeq suggère une diminution de la proportion des myofibroblastes suite au traitement par ATT. Afin de confirmer l'analyse scRNAseq, la quantification du nombre de myofibroblastes dans le stroma prostatique des souris se doit d'être réalisée par une approche immunohistochimique dirigée contre l'actine de muscle lisse (SM-actin) ou la décorine (DCN). Si la quantification des myofibroblastes sur coupes de tissu confirmait une diminution du nombre de ces cellules, nous ne pourrions cependant pas savoir si cela traduit une diminution du nombre absolu de ces cellules (effet anti-prolifératif), ou une différenciation en un autre sous-type de fibroblastes. Il est à noter que nous n'avons pas observé de différence de prolifération lors du traitement *in vitro* de la lignée myofibroblastique humaine WPMY-1 par l'ATT (Dos Santos *et al.*, sous presse– **Figure S14I**). Nous pourrions donc penser qu'*in vivo*, l'ATT pourrait agir sur ce compartiment d'une manière indirecte. Par exemple, le traitement pourrait induire la diminution de la sécrétion, par les cellules épithéliales, de facteurs pouvant *in fine* impacter la prolifération des myofibroblastes. Afin de tester cette hypothèse à ce stade très spéculative, nous pourrions envisager de traiter les cellules BPH-1 avec de l'ATT, d'utiliser

leur milieu conditionné pour traiter les cellules WPMY-1 et de quantifier la prolifération de ces dernières.

Comment expliquer les effets différents de l'ATT sur la prolifération des lignées fibroblastique WPMY-1 et épithéliale BPH-1 ? Dans les deux cas, nous avons constaté une diminution de la respiration mitochondriale (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figures 5G-I** et **Figures S14A et S14B**) avec le traitement, associée à une très légère baisse de l'activité mitochondriale, significative uniquement sur cellules BPH-1 (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figures 5H et S14E** CMX-ROS par FACS). Les cellules BPH-1, étant davantage glycolytiques que les cellules WPMY-1 (Rapport OCR/ECAR au Seahorse), il se peut qu'elles ne puissent compenser ce ralentissement de la respiration mitochondriale, leur potentiel glycolytique étant probablement déjà atteint, conduisant à une diminution de leur prolifération. Au contraire des cellules BPH-1, les cellules WPMY-1 semblent compenser la diminution de la respiration mitochondriale par une augmentation de la glycolyse, ce qui pourrait expliquer que leur prolifération n'est pas affectée (Dos Santos *et al.*, sous presse- **Figure S14I**). Une hypothèse alternative serait que l'ATT induirait dans les cellules BPH-1 une diminution de la prolifération, ce qui induirait une diminution des besoins en ATP et donc une diminution de la respiration mitochondriale.

Tous les effets de l'ATT passent-ils par une action sur la mitochondrie ? Le traitement des cellules WPMY-1 par ATT induit une diminution du stress oxydant basal, mais également une diminution du stress induit expérimentalement (Partie résultat II – **Figures 25A et 25B**). En effet, lorsqu'un stress oxydant est induit via l'addition de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dans le milieu, le pré-traitement par l'ATT diminue les concentrations de ROS mesurés par FACS. Ces expériences indiquent que le composé augmente les capacités antioxydantes des cellules myofibroblastiques humaines. Comme c'est le cas pour les cellules murines, le traitement par ATT augmente très légèrement l'expression de la *SOD2* dans ces cellules après 72h de traitement (Partie résultat II – **Figure 25F** -écrasée par la différence BPH-1 vs WPMY-1). Des expériences préliminaires de métabolomique suggèrent par ailleurs une augmentation des voies de synthèse du GSH dans la lignée WPMY-1 traitées par ATT (données non montrées). Enfin, l'ATT est également un donneur de  $H_2S$ , un gaz cytoprotecteur connu pour diminuer

l'inflammation par diminution des niveaux de cytokines, chimiokines, et de TNF- $\alpha$ , ainsi que l'augmentation de l'IL-10 (*Interleukin 10*) (Zhang *et al.*, 2019). Comme évoqué plus tôt, il n'est dès lors pas exclu que l'ATT induise des effets indépendants des ROS, comme la diminution directe de la prolifération cellulaire ou des capacités progénitrices. En effet, dans les cellules BPH-1, ni l'induction du stress oxydant ni un traitement par ATT ou NAC n'induisent de modification de la concentration de ROS intracellulaire (Partie Résultat II - **Figures 25C et 25D**). La concentration de ROS dans ces cellules ainsi que l'expression d'enzymes anti-oxydantes (SOD1 et SOD2) sont plus importantes que dans les cellules WPMY-1 (Partie résultat II - **Figures 25E et 25F**). Notre hypothèse est qu'elles sont *de facto* peu sensibles à l'augmentation du stress oxydant. En effet, pour une même concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté, la viabilité cellulaire des WPMY-1 est davantage impactée que celle des BPH-1 (Partie Résultat II – **Figure 25G**). Il est donc possible que le traitement ATT ait des effets pléiotropes directs et indirects sur l'ensemble des cellules composant la prostate.

## CONCLUSION GENERALE

L'HBP est une pathologie multifactorielle complexe dont l'étiologie exacte n'est pas encore bien comprise. Pour avancer sur ce point, il existe quelques modèles précliniques, mais la plupart ne récapitulent que certaines caractéristiques histologiques ou mécanistiques de la pathologie humaine. De plus, très rares (voire inexistants) sont les modèles pour lesquels une altération urodynamique mimant les SBAU a été démontrée. Au terme de notre étude, nous avons amélioré la caractérisation des phénotypes cellulaires et moléculaires des prostates de souris Pb-PRL et montré qu'il constituait un modèle pertinent d'HBP puisqu'il affiche de grandes ressemblances histologiques, cellulaires, moléculaires aussi bien que fonctionnelles (urodynamiques) avec l'HBP humaine. De plus, comme mentionné en Introduction, ce modèle répond à différents traitements actuellement prescrits pour l'HBP (phytothérapie, 5ARI).

Malgré tout, une souris n'est pas un homme, et nous devons de rester prudents concernant toute extrapolation trop hâtive. En effet, l'anatomie de la prostate est très différente chez ces deux espèces (Introduction - **Figure 4**), et on ne peut distinguer dans celle de souris une région anatomique analogue à la zone de transition de la prostate humaine. De plus, la prostate de souris présente des ratios de cellules basales/luminales et épithélium/stroma différents de la prostate humaine. Ainsi, les effets paracrines et autres caractéristiques des différents compartiments cellulaires peuvent-ils montrer une certaine spécificité d'espèce. Enfin, l'expression du transgène PRL est très élevée dans notre modèle Pb-PRL. Même si la PRL était effectivement impliquée dans la pathologie humaine, ce qui reste à démontrer, la sécrétion de cette hormone devrait sans doute être bien plus modérée que dans notre modèle de souris.

L'ATT a montré des propriétés intéressantes sur les cellules prostatiques humaines *in vitro* aussi bien que dans la souris Pb-PRL, ce qui suggère qu'il pourrait un jour profiter aux patients souffrant d'HBP. L'atout principal de ce traitement est qu'il améliore les paramètres urodynamiques des souris Pb-PRL et qu'il est déjà prescrit chez l'Homme dans d'autres pathologies. Un autre atout majeur est qu'il agit sur au moins deux compartiments cellulaires prostatiques. L'HBP peut être glandulaire, stromale ou les deux à la fois. Dans ce contexte, disposer d'un même traitement étiologique couvrant les divers types histologiques d'HBP, et non seulement le type glandulaire comme actuellement les 5ARI, serait bienvenu.

## PERSPECTIVES

Nos observations expérimentales ont fait émerger de nombreuses questions qui se devront d'être abordées dans la suite de ce travail. Nous en listons quelques-unes ci-dessous.

- Plasticité des cellules basales ?

Dans nos analyses bio-informatiques des données scRNAseq, les cellules LSC<sup>med</sup> sont positionnées sur l'UMAP entre les cellules basales et les cellules luminales (Dos Santos *et al.*, sous presse– **Figure 1E**). Dans ce type de représentation graphique, la position d'une cellule témoigne de son profil transcriptionnel, et plus deux cellules sont proches, plus elles partagent des similitudes transcriptomiques. Au vu de la déplétion importante des cellules luminales observée dans le modèle Pb-PRL, nous nous sommes focalisés sur la plasticité des cellules luminales vers les LSC<sup>med</sup>. Néanmoins, les analyses scVelo suggèrent également une plasticité des cellules basales vers les cellules LSC<sup>med</sup> (Dos Santos *et al.*, sous presse– **Figure 3B**). Cette plasticité est retrouvée aussi bien en contexte sain qu'en contexte cancéreux chez l'homme (Yan *et al.*, 2022; Pérez-González, Bévant and Blanpain, 2023). Il serait intéressant de caractériser cette plasticité dans le contexte HBP, et d'identifier les voies de signalisation associées à cette plasticité dans le modèle Pb-PRL.

- Quel rôle fonctionnel des cytokératines dans la plasticité cellulaire ?

La communauté scientifique utilise les cytokératines afin d'identifier les types cellulaires composant les épithéliums, et c'est dans ce contexte que nous avons identifié récemment la KRT4 comme marqueur spécifique des cellules LSC<sup>med</sup>. En revanche, en dehors de leur fonction de cohésion des épithéliums, peu de choses sont connues sur le rôle de ces cytokératines, aussi bien en physiologie qu'en pathologie. De nombreuses cytokératines sont utilisées comme marqueurs de tissus à forte prolifération ou des tissus cancéreux (Barak *et al.*, 2004). De plus, lors du développement, plusieurs travaux ont mis en évidence l'expression différentielle de ces cytokératines lors de la cytodifférenciation de l'épithélium prostatique

(Signoretto *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Dans l'épiderme, des études de 1996 portant sur la cicatrisation ont suggéré pour la première fois un rôle des cytokératines dans la plasticité cellulaire, puisque certaines d'entre elles (KRT6, KRT16 et KRT17) sont exprimées plus fortement par les kératinocytes en bordure des plaies 24h avant le début de la cicatrisation (Paladini *et al.*, 1996). Depuis, des chercheurs ont montré à partir de tissus sains et issus de cancer gastrique, le rôle de la KRT18 dans l'épissage alternatif de gènes impliqués dans la prolifération et la mort en cellulaire (Chen *et al.*, 2021). Récemment, notre laboratoire a mis en évidence le rôle prédictif d'une nouvelle cytokératine dans l'incidence des métastases osseuses issues de cancer de la prostate, ainsi que la mortalité spécifique par cancer de prostate. En effet, le fort marquage de KRT7 dans les glandes adjacentes à la tumeur est de mauvais pronostic (Darlane *et al.*, 2022). Il est tout à fait envisageable que cette cytokératine soit impliquée dans une étape précoce du processus cancéreux. Ainsi, l'investigation sur les rôles des différentes cytokines de la prostate aboutirait certainement à des découvertes sur leur implication dans la plasticité cellulaire.

- Transidentité et santé prostatique ?

Au vu de l'implication des œstrogènes sur le développement des maladies prostatiques, il convient de surveiller les personnes en transition de genre prenant des traitements hormonaux féminisants. En effet, la prise d'œstrogènes par les femmes transgenres (assignées hommes à la naissance et en transition vers un phénotype féminin) pourrait impacter leur santé prostatique, leur prostate restant en place au cours du processus chirurgical de transition. Contrairement à ce qui était initialement recensé, les cas de cancer prostatique chez les femmes transgenres ne sont pas marginaux (Johnson and Chabbert-Buffet, 2020), même si aucune étude ne montre un risque accru de cancer de la prostate chez ces femmes par rapport aux hommes cisgenres (Kale Edmiston, 2018; McFarlane, Zajac and Cheung, 2018; Sterling and Garcia, 2020). Les faibles taux de PSA sérique chez ces femmes, induits par les traitements féminisants, pourraient retarder un diagnostic de cancer (T'Sjoen *et al.*, 2019). Le manque de connaissances actuelles sur les taux moyens de PSA après traitement féminisant, ainsi que le peu d'études sur la question constituent un frein dans la prise en charge de ces patientes. La poursuite des recherches est fondamentale pour apporter des réponses aussi

bien sur les effets de ces traitements que sur la mise en place d'une stratégie de dépistage adaptée pour ces populations.

- Quel avenir pour le traitement de l'HBP par ATT ?

Bien que toute la lumière sur l'ensemble des effets de l'ATT sur la prostate soit loin d'avoir été faite dans ce travail, son effet bénéfique sur les paramètres urodynamiques de la souris Pb-PRL laisse entrevoir un potentiel bénéfique dans le cadre d'un traitement des SBAU liés à une HBP chez les patients. Ce médicament étant déjà prescrit pour traiter des maladies chroniques, il serait intéressant de savoir si l'incidence ou l'âge de développement de l'HBP est retardé chez les hommes prenant déjà ce traitement. Alternativement, il faudrait rechercher de manière rétrospective dans les différentes études cliniques si un référencement de ce traitement est fait, et si les hommes le prenant développent de l'HBP plus tardivement.

D'un point de vue prospectif, l'utilisation de l'ATT dans le cadre de l'HBP ne devrait pas engendrer plus d'effets secondaires que ceux qui sont déjà recensés. Les recherches menées au laboratoire ont montré une diminution du poids prostatique des souris pouvant traduire des effets de l'ATT sur les compartiments épithélial et stromal. Si ces effets devaient être observés dans la prostate humaine, il pourrait être intéressant de coupler ce traitement avec la prise d'un  $\alpha$ -bloquant. Ainsi, nous pourrions anticiper une réduction du poids prostatique par réduction de l'épithélium, voire des myofibroblastes, et une réduction du tonus musculaire par relaxation de ces derniers. Afin de tester l'efficacité du traitement ainsi que de la bithérapie, l'entreprise partenaire de cette thèse CIFRE pourrait envisager de mettre en place une première étude clinique chez des patients ne répondant plus aux traitements conventionnels, avant d'envisager une prise en charge chirurgicale. Il pourrait alors s'agir de comparer l'efficacité de la prise d' $\alpha$ -bloquant seul, d'ATT seul et de la bithérapie ATT +  $\alpha$ -bloquant. Par ailleurs, la prise d'antagoniste de TNF- $\alpha$  ayant montré des effets antiprolifératifs et anti-inflammatoires, la combinaison de ce traitement avec l'ATT pourrait aussi être envisagée à plus long terme. Enfin, l'ATT ayant un effet sur les propriétés des cellules progénitrices lumineales amplifiées par les 5ARI et supposées contribuer à l'épuisement d'effet de ceux-ci, la combinaison 5ARI +ATT mériterait certainement d'être également envisagée.

## LE MOT DE LA FIN

Notre étude est en accord avec les dernières recherches en date suggérant l'implication des cellules Club et Hillock dans l'HBP. Bien que cette pathologie ne soit pas un facteur de risque de développer un cancer de la prostate, il est curieux de constater que ces mêmes cellules sont également suspectées d'être impliquées dans l'initiation et la récurrence de ce cancer.

Malgré de récentes avancées dans la recherche sur l'HBP, les études sur l'étiologie de cette pathologie demeurent limitées et mériteraient davantage de moyens financiers et humains, ce d'autant que sa prévalence, déjà élevée, ne fera que s'accroître étant donné le vieillissement global des populations occidentales dû à l'allongement de l'espérance de vie. Une meilleure connaissance de cette maladie apparaît dès lors comme un véritable enjeu de santé publique et permettrait de proposer des alternatives thérapeutiques plus satisfaisantes qu'actuellement et moins impactantes sur la sexualité des hommes, tout en repoussant le recours à des interventions chirurgicales permettant de limiter les coûts financier et humain qu'elles impliquent.

\*\*\*\*\*

## ANNEXES

### I. Article & Revues scientifiques

Baures, Manon, Emilia Puig Lombardi, Delphine Di Martino, Wail Zeitouni, Emeline Pacreau, **Leïla Dos Santos**, Charles Dariane, Florence Boutillon, Jacques-Emmanuel Guidotti, et Vincent Goffin. « Transcriptomic Signature and Growth Factor Regulation of Castration-Tolerant Prostate Luminal Progenitor Cells ». *Cancers* 14, n° 15 (3 août 2022): 3775. <https://doi.org/10.3390/cancers14153775>.

Cosialls, Emma, Rima El Hage, **Leïla Dos Santos**, Chang Gong, Maryam Mehrpour, et Ahmed Hamai. « Ferroptosis: Cancer Stem Cells Rely on Iron until “to Die for” It ». *Cells* 10, n° 11 (2 novembre 2021): 2981. <https://doi.org/10.3390/cells10112981>.

El Hout, Mouradi, **Leïla Dos Santos**, Ahmed Hamai, et Maryam Mehrpour. « A Promising New Approach to Cancer Therapy: Targeting Iron Metabolism in Cancer Stem Cells ». *Seminars in Cancer Biology* 53 (décembre 2018): 125-38. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2018.07.009>.

### II. Intervention à des congrès et journées scientifiques

- Congrès international Redox 2020 – Participation active à des chambres virtuelles de discussion avec vidéo, chat en temps réel et partage d’articles sur l’application Whova - 8 & 9 octobre 2020 en distanciel.
- Retraite de l’INEM -Présentation orale de 10 min - 27 septembre 2021
- Forum BioSPC – Présentation orale de 10 min - 14 octobre 2021
- Congrès international, ARTP, Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate- Présentation d’un poster - 17 novembre 2021
- Congrès international, ARTP, Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate- Présentation d’un poster - 16 novembre 2022
- Congrès International ESUR2023, EAU Section of Urological Research - Présentation d’un poster – 19 au 21 octobre 2023.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abate-Shen, C. and Shen, M.M. (2000) 'Molecular genetics of prostate cancer', *Genes & Development*, 14(19), pp. 2410–2434. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.819500>.
- Agarwal, S. *et al.* (2015) 'Identification of Different Classes of Luminal Progenitor Cells within Prostate Tumors', *Cell Reports*, 13(10), pp. 2147–2158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.077>.
- Akbari, M. *et al.* (2019) 'Hydrogen Sulfide: Emerging Role in Bladder, Kidney, and Prostate Malignancies', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/2360945>.
- Andriole, G.L. *et al.* (2010) 'Effect of Dutasteride on the Risk of Prostate Cancer', *n engl j med*, p. 11.
- Anract, J. *et al.* (2019) 'Study of the intra-prostatic arterial anatomy and implications for arterial embolization of benign prostatic hyperplasia', *Progrès en Urologie*, 29(5), pp. 263–269. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.purol.2019.02.007>.
- Arnér, Elias S. J., et Arne Holmgren. « Physiological Functions of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase: Thioredoxin and Thioredoxin Reductase ». *European Journal of Biochemistry* 267, n° 20 (octobre 2000): 6102-9. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>.
- Asare, G.A. *et al.* (2015) 'Antiproliferative Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* L. on the Prostate, BPH-1 Cells, and Some Target Genes', *Integrative Cancer Therapies*, 14(1), pp. 65–74. Available at: <https://doi.org/10.1177/1534735414550198>.
- Austin, J.C. *et al.* (2004) 'A MALE MURINE MODEL OF PARTIAL BLADDER OUTLET OBSTRUCTION REVEALS CHANGES IN DETRUSOR MORPHOLOGY, CONTRACTILITY AND MYOSIN ISOFORM EXPRESSION', *Journal of Urology*, 172(4 Part 1), pp. 1524–1528. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000138045.61378.96>.
- Barak, V. *et al.* (2004) 'Clinical utility of cytokeratins as tumor markers', *Clinical Biochemistry*, 37(7), pp. 529–540. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.009>.
- Baures, M. *et al.* (2022) 'Prostate luminal progenitor cells: from mouse to human, from health to disease', *Nature Reviews Urology*, 19(4), pp. 201–218. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00561-2>.
- Benson, P.J. and Smith, C.S. (1992) 'Cytomegalovirus prostatitis', *Urology*, 40(2), pp. 165–167. Available at: [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(92\)90520-7](https://doi.org/10.1016/0090-4295(92)90520-7).
- Berg, E. *et al.* (2021) 'Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Leads to Impaired Semen Parameters, Increased Sperm DNA Fragmentation and Unfavorable Changes of Sperm Protamine mRNA Ratio', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), p. 7854. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22157854>.
- Bernichtein, S. *et al.* (2015) 'Anti-inflammatory properties of Lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) in a mouse model of prostate hyperplasia: Anti-Inflammatory Effects of Permixon® in Prostate Hyperplasia', *The Prostate*, 75(7), pp. 706–722. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.22953>.
- Berquin, I.M. *et al.* (2005) 'Expression Signature of the Mouse Prostate', *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), pp. 36442–36451. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M504945200>.
- Bhatia-Gaur, R. *et al.* (1999) 'Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer', *Genes & Development*, 13(8), pp. 966–977. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.966>.
- Bianchi-Frias, D. *et al.* (2010) 'The Effects of Aging on the Molecular and Cellular Composition of the Prostate Microenvironment', *PLoS ONE*. Edited by N.D. Leipzig, 5(9), p. e12501. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012501>.
- Birben, E. *et al.* (2012) 'Oxidative Stress and Antioxidant Defense', *World Allergy Organization Journal*, 5(1), pp. 9–19. Available at: <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- Blomqvist, S.R. *et al.* (2006) 'Epididymal expression of the forkhead transcription factor Foxi1 is required for male fertility', *The EMBO Journal*, 25(17), pp. 4131–4141. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601272>.

- Bole-Feysot, C. *et al.* (1998) 'Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice', *19*(3).
- Borba, V.V., Zandman-Goddard, G. and Shoenfeld, Y. (2018) 'Prolactin and Autoimmunity', *Frontiers in Immunology*, *9*, p. 73. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00073>.
- Bostanci, Y. *et al.* (2013) 'Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation', *Current Opinion in Urology*, *23*(1), pp. 5–10. Available at: <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32835abd4a>.
- Bourgeois, J. *et al.* (2017) 'Oncogenic STAT5 signaling promotes oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells by repressing antioxidant defenses', *Oncotarget*, *8*(26), pp. 41876–41889. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11480>.
- Boutillon *et al.* (2019) 'STAT5a/b Deficiency Delays, but does not Prevent, Prolactin-Driven Prostate Tumorigenesis in Mice', *Cancers*, *11*(7), p. 929. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11070929>.
- Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), pp. 394–424. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brendler, C.B. *et al.* (1983) 'Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate.', *Journal of Clinical Investigation*, *71*(5), pp. 1114–1123. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI110861>.
- Brennen, W.N. and Isaacs, J.T. (2018) 'Mesenchymal stem cells and the embryonic reawakening theory of BPH', *Nature Reviews Urology*, *15*(11), pp. 703–715. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0087-9>.
- Broderick, G.A. *et al.* (1994) 'A novel canine model of partial outlet obstruction secondary to prostatic hypertrophy', *World Journal of Urology*, *12*(5). Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00191203>.
- Bruchovsky, N. *et al.* (1976) 'Hormonal Effects on Cell Proliferation in Rat Prostate', in *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 61–102. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60951-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60951-6).
- Bruni-Cardoso, A. and Carvalho, H.F. (2007) 'Dynamics of the Epithelium During Canalization of the Rat Ventral Prostate', *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *290*(10), pp. 1223–1232. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.20591>.
- Burd, C.J., Morey, L.M. and Knudsen, K.E. (2006) 'Androgen receptor corepressors and prostate cancer', *Endocrine-Related Cancer*, *13*(4), pp. 979–994. Available at: <https://doi.org/10.1677/erc.1.01115>.
- Burden, H.P. *et al.* (2006) 'Prostasomes—their effects on human male reproduction and fertility', *Human Reproduction Update*, *12*(3), pp. 283–292. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi052>.
- Burger, P.E. *et al.* (2005) 'Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(20), pp. 7180–7185. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0502761102>.
- Buskin, A. *et al.* (2021) 'A Review of Prostate Organogenesis and a Role for iPSC-Derived Prostate Organoids to Study Prostate Development and Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), p. 13097. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222313097>.
- Cannarella, R. (2021) 'Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts', *Frontiers in Endocrinology*, *12*.
- Chan, J.M. *et al.* (2022) 'Lineage plasticity in prostate cancer depends on JAK/STAT inflammatory signaling', *Science*, *377*(6611), pp. 1180–1191. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abn0478>.
- Chandel, N.S. *et al.* (1998) 'Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(20), pp. 11715–11720. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715>.
- Chen N, Zhou Q. The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res.* 2016 Feb;*28*(1):58-64. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04. PMID: 27041927; PMCID: PMC4779758.

- Chen, B. *et al.* (2021) 'KRT18 Modulates Alternative Splicing of Genes Involved in Proliferation and Apoptosis Processes in Both Gastric Cancer Cells and Clinical Samples', *Frontiers in Genetics*, 12, p. 635429. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.635429>.
- Chen, H. *et al.* (2019) 'Quantitation of Lipid Peroxidation Product DNA Adducts in Human Prostate by Tandem Mass Spectrometry: A Method That Mitigates Artifacts', *Chemical Research in Toxicology*, 32(9), pp. 1850–1862. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00181>.
- Choi, N. *et al.* (2012) 'Adult Murine Prostate Basal and Luminal Cells Are Self-Sustained Lineages that Can Both Serve as Targets for Prostate Cancer Initiation', *Cancer Cell*, 21(2), pp. 253–265. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.005>.
- Christen, M.-O. (1995) '[32] Anethole dithiolethione: Biochemical considerations', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 316–323. Available at: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52034-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52034-1).
- Chua, S.S. *et al.* (2002) 'Ectopic expression of FGF-3 results in abnormal prostate and Woffian duct development', *Oncogene* [Preprint].
- Chung, L.W.K. and Cunha, G.R. (1981) 'INTERACTIONS-I. INDUCTION OF PROSTATIC PHENOTYPE IN UROTHELIUM OF TESTICULAR FEMINIZED', *Journal of steroid biochemistry* [Preprint].
- Church, D.F. and Pryor, W.A. (1985) 'Free-Radical Chemistry of Cigarette Smoke and Its Toxicological Implications', *Environmental Health Perspectives* [Preprint].
- Clark, K.C. *et al.* (2023) 'Cell-Type-Specific Signalling Networks Impacted by Prostate Epithelial-Stromal Intercellular Communication', *Cancers*, 15(3), p. 699. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15030699>.
- Clarkson, J. and Herbison, A.E. (2016) 'Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1688), p. 20150115. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0115>.
- Cleary, K.R. (1983) 'Basal Cell Hyperplasia of the Prostate', 80(6).
- Colao, A. *et al.* (2004) 'Prolactin and Prostate Hypertrophy: A Pilot Observational, Prospective, Case-Control Study in Men with Prolactinoma', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), pp. 2770–2775. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032055>.
- Collins, M.M. and O'Leary, M.P. (1998) 'HOW COMMON IS PROSTATITIS? A NATIONAL SURVEY OF PHYSICIAN VISITS'.
- Collins, Y. *et al.* (2012) 'Mitochondrial redox signalling at a glance', *Journal of Cell Science*, p. 7.
- Consoli, V. *et al.* (2023) 'Evaluation of the Antioxidant and Antiangiogenic Activity of a Pomegranate Extract in BPH-1 Prostate Epithelial Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), p. 10719. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241310719>.
- Cornu, J.-N. *et al.* (2010) 'A Widespread Population Study of Actual Medical Management of Lower Urinary Tract Symptoms Related to Benign Prostatic Hyperplasia Across Europe and Beyond Official Clinical Guidelines', *European Urology*, 58(3), pp. 450–456. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.05.045>.
- Cornu, J.-N. *et al.* (2015) 'A Systematic Review and Meta-analysis of Functional Outcomes and Complications Following Transurethral Procedures for Lower Urinary Tract Symptoms Resulting from Benign Prostatic Obstruction: An Update', *European Urology*, 67(6), pp. 1066–1096. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.06.017>.
- Costello, L.C. and Franklin, R.B. (1994) 'Effect of prolactin on the prostate', *The Prostate*, 24(3), pp. 162–166. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.2990240311>.
- Crowell, P.D. *et al.* (2019) 'Expansion of Luminal Progenitor Cells in the Aging Mouse and Human Prostate', *Cell Reports*, 28(6), pp. 1499–1510.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.007>.
- Crowell, P.D. *et al.* (2020) 'Distinct cell-types in the prostate share an aging signature suggestive of metabolic reprogramming', p. 15.

- Crowley, L. *et al.* (2020) 'A single-cell atlas of the mouse and human prostate reveals heterogeneity and conservation of epithelial progenitors', *eLife*, 9, p. e59465. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.59465>.
- Cunha, G.R. *et al.* (1987) 'The Endocrinology and Developmental Biology of the Prostate\*', *Endocrine Reviews*, 8(3), pp. 338–362. Available at: <https://doi.org/10.1210/edrv-8-3-338>.
- Cunha, G.R. *et al.* (2003) 'Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate', *International Journal of Cancer*, 107(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.11335>.
- Cunha, G.R. *et al.* (2018) 'Development of the human prostate', *Differentiation*, 103, pp. 24–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.08.005>.
- Dagvadorj, A. *et al.* (2007) 'Autocrine Prolactin Promotes Prostate Cancer Cell Growth via Janus Kinase-2-Signal Transducer and Activator of Transcription-5a/b Signaling Pathway', *Endocrinology*, 148(7), pp. 3089–3101. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2006-1761>.
- Dai, G.-C. *et al.* (2017) 'Chemical characterization, anti-benign prostatic hyperplasia effect and subchronic toxicity study of total flavonoid extract of *Pteris multifida*', *Food and Chemical Toxicology*, 108, pp. 524–531. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.010>.
- Darlane, C. *et al.* (2022) 'High Keratin-7 Expression in Benign Peri-Tumoral Prostatic Glands Is Predictive of Bone Metastasis Onset and Prostate Cancer-Specific Mortality', *Cancers*, 14(7), p. 1623. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14071623>.
- Davies, A.H. and Zoubeidi, A. (2016) 'The Androgen Receptor Bridges Stem Cell-Associated Signaling Nodes in Prostate Stem Cells', *Stem Cells International*, 2016, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/4829602>.
- Davies, J.M.S. *et al.* (2017) 'The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases', *GeroScience*, 39(5–6), pp. 499–550. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-017-0002-y>.
- De Marzo, Nelson, W.G. and Coffey, D.S. (1998) 'STEM CELL FEATURES OF BENIGN AND MALIGNANT PROSTATE EPITHELIAL CELLS'.
- Delattre, J., Beaudeau, J.-L. and Bonnefont-Rousselot, D. (2007) *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques*. 2e tirage [corrigé]. Londres Paris New York: Éd. Tec & doc-Éd. médicales internationales.
- Deng, S. *et al.* (2022) 'Ectopic JAK–STAT activation enables the transition to a stem-like and multilineage state conferring AR-targeted therapy resistance', *Nature Cancer*, 3(9), pp. 1071–1087. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00431-9>.
- Descazeaud, A., G. Robert, N.B. Delongchamps, J.-N. Cornu, C. Saussine, O. Hailot, M. Devonec, et al. « Bilan initial, suivi et traitement des troubles mictionnels en rapport avec hyperplasie bénigne de prostate : recommandations du CTMH de l'AFU ». *Progrès en Urologie* 22, n° 16 (décembre 2012): 977-88. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2012.10.001>.
- Detaille, D. *et al.* (2019) 'An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals', *PLOS ONE*. Edited by E.J. Lesnefsky, 14(5), p. e0216385. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216385>.
- Di Silverio, F. *et al.* (2003) 'Distribution of Inflammation, Pre-Malignant Lesions, Incidental Carcinoma in Histologically Confirmed Benign Prostatic Hyperplasia: A Retrospective Analysis', *European Urology*, 43(2), pp. 164–175. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(02\)00548-1](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(02)00548-1).
- Dillner, K. *et al.* (2003) 'Gene Expression Analysis of Prostate Hyperplasia in Mice Overexpressing the Prolactin Gene Specifically in the Prostate', *Endocrinology*, 144(11), pp. 4955–4966. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2003-0415>.
- Doble, A., Harris, J.R.W. and Taylor-Robinson, D. (1991) 'Prostatodynia and herpes simplex virus infection', *Urology*, 38(3), pp. 247–248. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(91\)80355-B](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(91)80355-B).

- Domoslawska, A. *et al.* (2022) 'Oxidative stress biomarkers in dogs with benign prostatic hyperplasia', *Irish Veterinary Journal*, 75(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13620-022-00228-3>.
- Dong, Y. *et al.* (2020) 'Pao Pereira extract suppresses benign prostatic hyperplasia by inhibiting inflammation-associated NFκB signaling', *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), p. 150. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02943-2>.
- Donjacour, A.A., Thomson, A.A. and Cunha, G.R. (1998) 'Enlargement of the ampullary gland and seminal vesicle, but not the prostate in int-2/Fgf-3 transgenic mice', *Differentiation*, 62(5), pp. 227–237. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1998.6250227.x>.
- Dulac, M. *et al.* (2018) 'Metabolism of Anethole Dithiolethione by Rat and Human Liver Microsomes: Formation of Various Products Deriving from Its O -Demethylation and S -Oxidation. Involvement of Cytochromes P450 and Flavin Monooxygenases in These Pathways', *Drug Metabolism and Disposition*, 46(10), pp. 1390–1395. Available at: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.082545>.
- Egea, J. *et al.* (2017) 'European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS)', *Redox Biology*, 13, pp. 94–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.007>.
- El-Alfy, M. *et al.* (2000) 'Unique features of the basal cells of human prostate epithelium', *Microscopy Research and Technique*, 51(5), pp. 436–446. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001201\)51:5<436::AID-JEMT6>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001201)51:5<436::AID-JEMT6>3.0.CO;2-T).
- Elshebin, D.M.A. *et al.* (2022) 'Origanum majorana L. Extract Attenuated Benign Prostatic Hyperplasia in Rat Model: Effect on Oxidative Stress, Apoptosis, and Proliferation', *Antioxidants*, 11(6), p. 1149. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11061149>.
- El-Sherbiny, M. *et al.* (2021) 'Diacerein ameliorates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats: Effect on oxidative stress, inflammation and apoptosis', *International Immunopharmacology*, 100, p. 108082. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108082>.
- English, H.F., Santen, R.J. and Isaacs, J.T. (1987) 'Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement', *The Prostate*, 11(3), pp. 229–242. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.2990110304>.
- Epstein, J.I. *et al.* (2016) 'A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score', *European Urology*, 69(3), pp. 428–435. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.046>.
- Erdemir, Fikret, Andrew Harbin, et Wayne Jg Hellstrom. « 5-Alpha Reductase Inhibitors and Erectile Dysfunction: The Connection ». *The Journal of Sexual Medicine* 5, n° 12 (décembre 2008): 2917-24. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01001.x>.
- Evans, G.S. and Chandler, J.A. (1987) 'Cell proliferation studies in the rat prostate: II. The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory cell proliferation', *The Prostate*, 11(4), pp. 339–351. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.2990110406>.
- Fajardo, A.M. *et al.* (2016) 'Antioxidants Abrogate Alpha-Tocopherylquinone-Mediated Down-Regulation of the Androgen Receptor in Androgen-Responsive Prostate Cancer Cells', *PLOS ONE*. Edited by L.R. Languino, 11(3), p. e0151525. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151525>.
- Forman, H.J. and Torres, M. (2002) 'Reactive Oxygen Species and Cell Signaling: Respiratory Burst in Macrophage Signaling', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(supplement\_1), pp. S4–S8. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.2206007>.
- Fowler, J.E. *et al.* (1999) 'Relationships between prostate-specific antigen and prostate volume in black and white men with benign prostate biopsies', *Urology*, 53(6), pp. 1175–1178. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(99\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(99)00006-0).
- Fox, J.J. *et al.* (2019) 'Mass cytometry reveals species-specific differences and a new level of complexity for immune cells in the prostate'.

- Fox, J.J. *et al.* (2023) 'Highly multiplexed immune profiling throughout adulthood reveals kinetics of lymphocyte infiltration in the aging mouse prostate'.
- Fox, M. (1963) 'The Natural History and Significance of Stone Formation in the Prostate Gland', *Journal of Urology*, 89(5), pp. 716–727. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)64633-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)64633-0).
- Fu W, Chen S, Zhang Z, Chen Y, You X, Li Q. Quercetin in Tonglong Qibi decoction ameliorates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats by regulating Nrf2 signalling pathways and oxidative stress. *Andrologia*. 2022 Oct;54(9):e14502. doi: 10.1111/and.14502. Epub 2022 Jun 20. PMID: 35725022.
- Fuhrmann, D.C. and Brüne, B. (2017) 'Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia', *Redox Biology*, 12, pp. 208–215. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.012>.
- Fuse, H. *et al.* (1995) 'Cryptococcal prostatitis in a patient with Behcet's disease treated with fluconazole', *Mycopathologia*, 130(3), pp. 147–150. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01103097>.
- G. Ploussard, G. Roubaud, E. Barret, J.-B. Beauval, L. Brureau, G. Créhange, C. Dariane, G. Fiard, G. Fromont, M. Gauthé, R. Renard-Penna, F. Rozet, A. Ruffion, P. Sargos, R. Mathieu, M. Rouprêt, French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Management of metastatic disease and castration resistance, *Progrès en Urologie - Volume 32, Issue 15, 2022, Pages 1373-1419, ISSN 1166-7087, <https://doi.org/10.1016/j.purol.2022.07.147>*.
- Georget, V. *et al.* (2002) 'Mechanism of Antiandrogen Action: Key Role of Hsp90 in Conformational Change and Transcriptional Activity of the Androgen Receptor', *Biochemistry*, 41(39), pp. 11824–11831. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi0259150>.
- Giovannucci, E. (2003) 'Nutrition, Insulin, Insulin-like Growth Factors and Cancer', *Horm Metab Res* [Preprint].
- Giovannucci, E. *et al.* (1999) 'THE CAG REPEAT WITHIN THE ANDROGEN RECEPTOR GENE AND BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA'.
- Giustarini, D. *et al.* (2014) 'Anethole dithiolethione lowers the homocysteine and raises the glutathione levels in solid tissues and plasma of rats: A novel non-vitamin homocysteine-lowering agent', *Biochemical Pharmacology*, 89(2), pp. 246–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.03.005>.
- Goffin, V. (2017) 'Prolactin receptor targeting in breast and prostate cancers: New insights into an old challenge', *Pharmacology & Therapeutics*, 179, pp. 111–126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.009>.
- Goffin, V. and Touraine, P. (2015) 'The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: browsing new potential indications', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(9), pp. 1229–1244. Available at: <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1053209>.
- Goffin, V. *et al.* (2011) 'Prolactin regulation of the prostate gland: a female player in a male game', *Nature Reviews Urology*, 8(11), pp. 597–607. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.143>.
- Goldstein, A.S. *et al.* (2008) 'Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), pp. 20882–20887. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0811411106>.
- Gormley (1992) 'Effect of Finasteride in men with BPH', *New England Journal of Medicine*, 78(4), pp. 777–783.
- Goswami, K. *et al.* (2007) 'A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis', *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 10(4), pp. 356–359. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500965>.
- Gray, A. *et al.* (1991) 'Age, Disease, and Changing Sex Hormone Levels in Middle-Aged Men: Results of the Massachusetts Male Aging Study\*', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 73(5), pp. 1016–1025. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-73-5-1016>.
- Guo, W. *et al.* (2020) 'Single-cell transcriptomics identifies a distinct luminal progenitor cell type in distal prostate invagination tips', *Nature Genetics*, 52(9), pp. 908–918. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0642-1>.

Gur, Serap, Philip J Kadowitz, et Wayne Jg Hellstrom. « Effects of 5-Alpha Reductase Inhibitors on Erectile Function, Sexual Desire and Ejaculation ». *Expert Opinion on Drug Safety* 12, n° 1 (janvier 2013): 81-90. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.742885>.

Gyurászová, M. *et al.* (2018) 'Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in the Plasma, Urine and Saliva of Healthy Mice', *Physiological Research*, pp. 921–934. Available at: <https://doi.org/10.33549/physiolres.933866>.

Hajam, Y.A. *et al.* (2022) 'Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives', *Cells*, 11(3), p. 552. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11030552>.

Hamanaka, R.B. *et al.* (2016) 'The Mitochondrial Respiratory Chain Is Required for Organismal Adaptation to Hypoxia', *Cell Reports*, 15(3), pp. 451–459. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.044>.

Hammarsten, J. and Peeker, R. (2011) 'Urological aspects of the metabolic syndrome', *Nature Reviews Urology*, 8(9), pp. 483–494. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.112>.

Hammond, G.L. *et al.* (1977) 'SERUM FSH, LH AND PROLACTIN IN NORMAL MALES AND PATIENTS WITH PROSTATIC DISEASES', *Clinical Endocrinology*, 7(2), pp. 129–135. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1977.tb01304.x>.

Harris, I.S. and DeNicola, G.M. (2020) 'The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer', *Trends in Cell Biology*, 30(6), pp. 440–451. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.002>.

Harry A. Guess, Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer, *Epidemiologic Reviews*, Volume 23, Issue 1, 2001, Pages 152–158, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a000782>

Hawkins, C.L. and Davies, M.J. (2019) 'Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications', *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), pp. 19683–19708. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>.

Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T. and Tew, K.D. (2020) 'Oxidative Stress in Cancer', *Cancer Cell*, 38(2), pp. 167–197. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.

Hayward, S.W. *et al.* (1995) 'Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 31(1), pp. 14–24. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02631333>.

He, B. *et al.* (2002) 'The FXXLF Motif Mediates Androgen Receptor-specific Interactions with Coregulators', *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp. 10226–10235. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111975200>.

Heinlein, C.A. and Chang, C. (2002) 'The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions', *Molecular Endocrinology*, 16(10), pp. 2181–2187. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2002-0070>.

Henry, G. *et al.* (2017) 'Molecular pathogenesis of human prostate basal cell hyperplasia', *The Prostate*, 77(13), pp. 1344–1355. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23394>.

Henry, G.H. *et al.* (2018) 'A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra', *Cell Reports*, 25(12), pp. 3530-3542.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.086>.

Högstedt, J.H., Benkt (1999) 'Clinical, Anthropometric, Metabolic and Insulin Profile of Men with Fast Annual Growth Rates of Benign Prostatic Hyperplasia', *Blood Pressure*, 8(1), pp. 29–36. Available at: <https://doi.org/10.1080/080370599438365>.

Homonnai, Z.T. *et al.* (1978) 'The Cation Composition of the Seminal Plasma and Prostatic Fluid and its Correlation to Semen Quality', *Fertility and Sterility*, 29(5), pp. 539–542. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43281-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43281-4).

Hu, W.-Y. *et al.* (2017) 'Isolation and functional interrogation of adult human prostate epithelial stem cells at single cell resolution', *Stem Cell Research*, 23, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.06.009>.

- Ichihara, K. *et al.* (2015) 'A Randomized Controlled Study of the Efficacy of Tamsulosin Monotherapy and its Combination with Mirabegron for Overactive Bladder Induced by Benign Prostatic Obstruction', *Journal of Urology*, 193(3), pp. 921–926. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.09.091>.
- Ittmann, M. *et al.* (2013) 'Animal Models of Human Prostate Cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee', *Cancer Research*, 73(9), pp. 2718–2736. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4213>.
- Jardin, A. *et al.* (1991) 'Alfuzosin for treatment of benign prostatic hypertrophy', *The Lancet*, 337(8755), pp. 1457–1461. Available at: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93140-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93140-5).
- Jenster, G. *et al.* (1991) 'Domains of the Human Androgen Receptor Involved in Steroid Binding, Transcriptional Activation, and Subcellular Localization', *Molecular Endocrinology*, 5(10), pp. 1396–1404. Available at: <https://doi.org/10.1210/mend-5-10-1396>.
- Jin, B.-R., Kim, H.-J., *et al.* (2023) 'Targeting benign prostate hyperplasia treatments: AR/TGF- $\beta$ /NOX4 inhibition by apocynin suppresses inflammation and proliferation', *Journal of Advanced Research*, p. S2090123223001121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.04.006>.
- Jin, B.-R., Lim, C.-Y., *et al.* (2023) 'Antioxidant mitoquinone suppresses benign prostatic hyperplasia by regulating the AR-NLRP3 pathway', *Redox Biology*, 65, p. 102816. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102816>.
- Jin, S. *et al.* (2019) 'Activation of cGMP/PKG/p65 signaling associated with PDE5-Is downregulates CCL5 secretion by CD8<sup>+</sup> T cells in benign prostatic hyperplasia', *The Prostate*, 79(8), pp. 909–919. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23801>.
- Johnson, N. and Chabbert-Buffet, N. (2020) 'Hormonothérapie féminisante chez les femmes transgenres', *La Presse Médicale Formation*, 1(6), pp. 597–603. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lpmfor.2020.10.030>.
- Joseph, D.B. *et al.* (2020) 'Urethral luminal epithelia are castration-insensitive cells of the proximal prostate', *The Prostate*, 80(11), pp. 872–884. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.24020>.
- Joseph, D.B., Henry, G.H., Malewska, A., Reese, J.C., Mauck, R.J., Gahan, J.C., Hutchinson, R.C., Mohler, J.L., *et al.* (2021) '5- $\alpha$  reductase inhibitors induce a prostate luminal to club cell transition in human benign prostatic hyperplasia', *The Journal of Pathology*, p. path.5857. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.5857>.
- Joseph, D.B., Henry, G.H., Malewska, A., Reese, J.C., Mauck, R.J., Gahan, J.C., Hutchinson, R.C., Malladi, V.S., *et al.* (2021) 'Single cell analysis of mouse and human prostate reveals novel fibroblasts with specialized distribution and microenvironment interactions', *The Journal of Pathology*, p. path.5751. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.5751>.
- Jung, J.H. *et al.* (2019) 'Prostatic urethral lift for the treatment of lower urinary tract symptoms in men with benign prostatic hyperplasia', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Edited by Cochrane Urology Group, 2019(5). Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012832.pub2>.
- Kale Edmiston, E. (2018) 'Transgender health research must serve transgender people', *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 125(12), pp. 1513–1513. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15283>.
- Kaplan *et al.* (1998) 'Is the ratio of transition zone to total prostate volume higher in African-American men than in their Caucasian or', *BJU International*, 82(6), pp. 804–807. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.1998.00882.x>.
- Karthaus, W.R. *et al.* (2014) 'Identification of Multipotent Luminal Progenitor Cells in Human Prostate Organoid Cultures', *Cell*, 159(1), pp. 163–175. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.017>.
- Karthaus, W.R. *et al.* (2020) 'Regenerative potential of prostate luminal cells revealed by single-cell analysis', *Science*, 368(6490), pp. 497–505. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aay0267>.
- Kellokumpu-Lehtinen, P., Santti, R. and Pelliniemi, L.J. (1980) 'Correlation of early cytodifferentiation of the human fetal prostate and leydig cells', *The Anatomical Record*, 196(3), pp. 263–273. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1091960302>.

- Khan, F.U. *et al.* (2017) 'Comprehensive overview of prostatitis', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, pp. 1064–1076. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.016>.
- Khandrika, L. *et al.* (2009) 'Oxidative stress in prostate cancer', *Cancer Letters*, 282(2), pp. 125–136. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.011>.
- Kim, H.-J. *et al.* (2013) 'Pathogenic role of HIF-1 $\alpha$  in prostate hyperplasia in the presence of chronic inflammation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(1), pp. 183–194. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.09.002>.
- Kim, H.-J., Jin, B.-R. and An, H.-J. (2021) 'Umbelliferone Ameliorates Benign Prostatic Hyperplasia by Inhibiting Cell Proliferation and G1/S Phase Cell Cycle Progression through Regulation of STAT3/E2F1 Axis', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), p. 9019. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22169019>.
- Kindblom, J. *et al.* (2003) 'Prostate Hyperplasia in a Transgenic Mouse with Prostate-Specific Expression of Prolactin', *Endocrinology*, 144(6), pp. 2269–2278. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2002-0187>.
- Kinet, S. *et al.* (1996) 'Characterization of Lactogen Receptor-binding Site 1 of Human Prolactin', *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), pp. 14353–14360. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14353>.
- Kramer, G., Mitteregger, D. and Marberger, M. (2007) 'Is Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) an Immune Inflammatory Disease?', *European Urology*, 51(5), pp. 1202–1216. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.12.011>.
- Krieger, J.N. *et al.* (2009) 'Epidemiology of prostatitis'.
- Kristal, A.R., Arnold, K.B., *et al.* (2008) 'Dietary Patterns, Supplement Use, and the Risk of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial', *American Journal of Epidemiology*, 167(8), pp. 925–934. Available at: <https://doi.org/10.1093/aje/kwm389>.
- Kristal, A.R., Schenk, J.M., *et al.* (2008) 'Serum Steroid and Sex Hormone-Binding Globulin Concentrations and the Risk of Incident Benign Prostatic Hyperplasia: Results From the Prostate Cancer Prevention Trial', *American Journal of Epidemiology*, 168(12), pp. 1416–1424. Available at: <https://doi.org/10.1093/aje/kwn272>.
- Kruithof-de Julio, M. *et al.* (2013) 'Canonical Wnt signaling regulates Nkx3.1 expression and luminal epithelial differentiation during prostate organogenesis: Nkx3.1 and Wnt Signals in Prostate', *Developmental Dynamics*, 242(10), pp. 1160–1171. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.24008>.
- Kwon, O.-J. *et al.* (2019) 'Functional Heterogeneity of Mouse Prostate Stromal Cells Revealed by Single-Cell RNA-Seq', *iScience*, 13, pp. 328–338. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.032>.
- Kwon, O.-J., Zhang, L. and Xin, L. (2016) 'Stem Cell Antigen-1 Identifies a Distinct Androgen-Independent Murine Prostatic Luminal Cell Lineage with Bipotent Potential', *Stem Cells*, 34(1), pp. 191–202. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.2217>.
- Lai, K.-P. *et al.* (2012) 'Suppressed Prostate Epithelial Development with Impaired Branching Morphogenesis in Mice Lacking Stromal Fibromuscular Androgen Receptor', *Molecular Endocrinology*, 26(1), pp. 52–66. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2011-1189>.
- Lam, S. *et al.* (2002) 'A Randomized Phase IIb Trial of Anethole Dithiolethione in Smokers with Bronchial Dysplasia', *Journal of the National Cancer Institute*, 94(13).
- Lambeth, J.D. (2007) 'Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy', *Free Radical Biology and Medicine*, 43(3), pp. 332–347. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027>.
- Latil, A. *et al.* (2015) 'Effects of hexanic extract of serenoa repens (permixon<sup>®</sup> 160 mg) on inflammation biomarkers in the treatment of lower urinary tract symptoms related to benign prostatic hyperplasia: Anti-Inflammatory Properties of Permixon<sup>®</sup>', *The Prostate*, 75(16), pp. 1857–1867. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23059>.

- Lawson, D.A. *et al.* (2007) 'Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), pp. 181–186. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0609684104>.
- Lebdai, S. *et al.* (2016) 'Early results and complications of prostatic arterial embolization for benign prostatic hyperplasia', *World Journal of Urology*, 34(5), pp. 625–632. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00345-015-1665-6>.
- Lebdai, S. *et al.* (2019) 'Do patients have to choose between ejaculation and miction? A systematic review about ejaculation preservation technics for benign prostatic obstruction surgical treatment', *World Journal of Urology*, 37(2), pp. 299–308. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2368-6>.
- Lee, D.-H. *et al.* (2020) 'Androgen action in cell fate and communication during prostate development at single-cell resolution', *Development*, p. dev.196048. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.196048>.
- Lee, J.-S. and Surh, Y.-J. (2005) 'Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention', *Cancer Letters*, 224(2), pp. 171–184. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.042>.
- Leong, K.G. *et al.* (2008) 'Generation of a prostate from a single adult stem cell', *Nature*, 456(7223), pp. 804–808. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07427>.
- Lepor, H. *et al.* (1996) 'The Efficacy of Terazosin, Finasteride, or Both in Benign Prostatic Hyperplasia', *New England Journal of Medicine*, 335(8), pp. 533–540. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199608223350801>.
- Li, H. *et al.* (2023) 'A novel co-culture model of human prostate epithelial and stromal cells for androgenic and antiandrogenic screening', *Toxicology in Vitro*, 91, p. 105624. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105624>.
- Li, J. *et al.* (2018) 'Testosterone-induced benign prostatic hyperplasia rat and dog as facile models to assess drugs targeting lower urinary tract symptoms', *PLOS ONE*. Edited by D.L. McCormick, 13(1), p. e0191469. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191469>.
- Li, Y. *et al.* (2022) 'The Prostate-Associated Gene 4 (PAGE4) Could Play a Role in the Development of Benign Prostatic Hyperplasia under Oxidative Stress', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Edited by E. Desideri, 2022, pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/7041739>.
- Liao, C.-H. *et al.* (2012) 'Significant association between serum dihydrotestosterone level and prostate volume among Taiwanese men aged 40–79 years', *The Aging Male*, 15(1), pp. 28–33. Available at: <https://doi.org/10.3109/13685538.2010.550660>.
- Liao, G. *et al.* (2003) 'Regulation of Androgen Receptor Activity by the Nuclear Receptor Corepressor SMRT', *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), pp. 5052–5061. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M206374200>.
- Lim, K.B. (2017) 'Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia', *Asian Journal of Urology*, 4(3), pp. 148–151. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2017.06.004>.
- Litwin, M.S. *et al.* (1999) 'THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CHRONIC PROSTATITIS SYMPTOM INDEX: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW OUTCOME MEASURE', *Journal of Urology*, 162(2), pp. 369–375. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68562-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68562-X).
- Liu, D. *et al.* (2020) 'Integrative multiplatform molecular profiling of benign prostatic hyperplasia identifies distinct subtypes', *Nature Communications*, 11(1), p. 1987. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15913-6>.
- Liu, J. *et al.* (2011) 'Regenerated Luminal Epithelial Cells Are Derived from Preexisting Luminal Epithelial Cells in Adult Mouse Prostate', *Molecular Endocrinology*, 25(11), pp. 1849–1857. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2011-1081>.
- Liu, R. *et al.* (2018) 'Crosstalk between apoptosis and autophagy in prostate epithelial cells under androgen deprivation', *Experimental and Therapeutic Medicine* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5726>.

- Liu, X. *et al.* (2016) 'Low CD38 Identifies Progenitor-like Inflammation-Associated Luminal Cells that Can Initiate Human Prostate Cancer and Predict Poor Outcome', *Cell Reports*, 17(10), pp. 2596–2606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.010>.
- Liu, Y. *et al.* (2022) 'Stromal AR inhibits prostate tumor progression by restraining secretory luminal epithelial cells', *Cell Reports*, 39(8), p. 110848. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110848>.
- Lopez-Barcons, L.-A. (2010) 'Human benign prostatic hyperplasia heterotransplants as an experimental model', *Asian Journal of Andrology*, 12(2), pp. 157–163. Available at: <https://doi.org/10.1038/aja.2009.77>.
- Lukacs, B. *et al.* (2013) 'Management of Lower Urinary Tract Symptoms Related to Benign Prostatic Hyperplasia in Real-life Practice in France: A Comprehensive Population Study', *European Urology*, 64(3), pp. 493–501. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.02.026>.
- MacDonald, R. *et al.* (2012) 'Serenoa repens monotherapy for benign prostatic hyperplasia (BPH): an updated Cochrane systematic review: SERENOA REPENS MONOTHERAPY FOR BPH', *BJU International*, 109(12), pp. 1756–1761. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11172.x>.
- Maggio, M. *et al.* (2006) 'Circulating Inflammatory Cytokine Expression in Men With Prostate Cancer Undergoing Androgen Deprivation Therapy', *Journal of Andrology*, 27(6), pp. 725–728. Available at: <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000141>.
- Mailleux, A.A., Overholtzer, M. and Brugge, J.S. (2008) 'Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models', *Cell Cycle*, 7(1), pp. 57–62. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5150>.
- Malkowicz, S.B. *et al.* (1986) 'Acute Biochemical and Functional Alterations in The Partially Obstructed Rabbit Urinary Bladder', *Journal of Urology*, 136(6), pp. 1324–1329. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)45331-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)45331-6).
- Martins, Airton C., Miriam B. Virgolini, Daiana Silva Ávila, Pablo Scharf, Jung Li, Alexey A. Tinkov, Anatoly V. Skalny, Aaron B. Bowman, João B. T. Rocha, et Michael Aschner. « Mitochondria in the Spotlight: C. Elegans as a Model Organism to Evaluate Xenobiotic-Induced Dysfunction ». *Cells* 12, n° 17 (22 août 2023): 2124. <https://doi.org/10.3390/cells12172124>.
- Matityahou, A., Rosenzweig, N. and Golomb, E. (2003) 'Rapid Proliferation of Prostatic Epithelial Cells in Spontaneously Hypertensive Rats: A Model of Spontaneous Hypertension and Prostate Hyperplasia', *Journal of Andrology*, 24(2), pp. 263–269. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02671.x>.
- Matthay MA, Geiser T, Matalon S, Ischiropoulos H. Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1999 Sep;27(9):2028-30. doi: 10.1097/00003246-199909000-00055. PMID: 10507639.
- Mc Neal, J.E. (1972) 'The Prostate and Prostatic Urethra: A Morphologic Synthesis', *Journal of Urology*, 107(6), pp. 1008–1016. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)61195-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)61195-9).
- McConnell, J.D. *et al.* (2003) 'The Long-Term Effect of Doxazosin, Finasteride, and Combination Therapy on the Clinical Progression of Benign Prostatic Hyperplasia', *New England Journal of Medicine*, 349(25), pp. 2387–2398. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030656>.
- McConnell, J.D., Lieber, M. and Nickel, J.C. (1998) 'The Effect of Finasteride on the Risk of Acute Urinary Retention and the Need for Surgical Treatment among Men with Benign Prostatic Hyperplasia', *The New England Journal of Medicine*, p. 7.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049-55. PMID: 5389100.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) 'Superoxide Dismutase', *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), pp. 6049–6055. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- McFarlane, T., Zajac, J.D. and Cheung, A.S. (2018) 'Gender-affirming hormone therapy and the risk of sex hormone-dependent tumours in transgender individuals-A systematic review', *Clinical Endocrinology*, 89(6), pp. 700–711. Available at: <https://doi.org/10.1111/cen.13835>.

- McKay, T.C. *et al.* (1994) 'Cytomegalovirus prostatitis: Case report and review of the literature', *International Urology and Nephrology*, 26(5), pp. 535–540. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02767655>.
- McNeal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol.* 1978 Jan;15(4):340-5. PMID: 75197.
- McNeal, J.E. (1968) 'Regional Morphology and Pathology of The Prostate', *American Journal of Clinical Pathology*, 49(3), pp. 347–357. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcp/49.3.347>.
- McVary, K.T., Rogers, T. and Roehrborn, C.G. (2019) 'Rezüm Water Vapor Thermal Therapy for Lower Urinary Tract Symptoms Associated With Benign Prostatic Hyperplasia: 4-Year Results From Randomized Controlled Study', *Urology*, 126, pp. 171–179. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2018.12.041>.
- Merendino, R.A. *et al.* (2003) 'Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker?', *Mediators of Inflammation*, 12(2), pp. 127–128. Available at: <https://doi.org/10.1080/0962935031000097745>.
- Mevel, R. *et al.* (2020) 'RUNX1 marks a luminal castration-resistant lineage established at the onset of prostate development', *eLife*, 9, p. e60225. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.60225>.
- Mills, E.L. *et al.* (2016) 'Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages', *Cell*, 167(2), pp. 457-470.e13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.064>.
- Mitchell, S. *et al.* (2001) 'Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines: CHARACTERIZATION OF HUMAN PROSTATIC CELL LINES', *BJU International*, 85(7), pp. 932–944. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00606.x>.
- Moad, M. *et al.* (2017) 'Multipotent Basal Stem Cells, Maintained in Localized Proximal Niches, Support Directed Long-Ranging Epithelial Flows in Human Prostates', *Cell Reports*, 20(7), pp. 1609–1622. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.061>.
- Mononen, N. *et al.* (2002) 'Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk', *Human Genetics*, 111(2), pp. 166–171. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0776-5>.
- Montgomery, J.S., Price, D.K. and Figg, W.D. (2001) 'The androgen receptor gene and its influence on the development and progression of prostate cancer', *The Journal of Pathology*, 195(2), pp. 138–146. Available at: [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(200109\)195:2<138::AID-PATH961>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1096-9896(200109)195:2<138::AID-PATH961>3.0.CO;2-Y).
- Mori, F. *et al.* (2009) 'New Histopathological Experimental Model for Benign Prostatic Hyperplasia: Stromal Hyperplasia in Rats', *Journal of Urology*, 181(2), pp. 890–898. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.067>.
- Morrison, C., Thornhill, J. and Gaffney, E. (2000) 'The connective tissue framework in the normal prostate, B.P.H and prostate cancer: analysis by scanning electron microscopy after cellular digestion', *Urological Research*, 28(5), pp. 304–307. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002400000123>.
- Muller, W.J. *et al.* (1990) 'The int-2 gene product acts as an epithelial growth factor in transgenic mice.', *The EMBO Journal*, 9(3), pp. 907–913. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08188.x>.
- Mulligan, T. *et al.* (1999) 'Two-week pulsatile gonadotropin releasing hormone infusion unmasks dual (hypothalamic and Leydig cell) defects in the healthy aging male gonadotropic axis', *European Journal of Endocrinology*, pp. 257–266. Available at: <https://doi.org/10.1530/eje.0.1410257>.
- Nagano, T. and Takeyama, M. (2010) 'Enhancement of salivary secretion and neuropeptide (substance P,  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide) levels in saliva by chronic anethole trithione treatment', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(12), pp. 1697–1702. Available at: <https://doi.org/10.1211/0022357011778098>.
- Nakabeppu, Y. (2014) 'Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), pp. 12543–12557. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms150712543>.
- Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* 1997 Sep 15;57(18):3963-71. PMID: 9307280.

- Nash, C. *et al.* (2019) 'Genome-wide analysis of androgen receptor binding and transcriptomic analysis in mesenchymal subsets during prostate development', *Disease Models & Mechanisms*, 12(7), p. dmm039297. Available at: <https://doi.org/10.1242/dmm.039297>.
- Nelson, P.S. *et al.* (2002) 'The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), pp. 11890–11895. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.182376299>.
- Nevalainen, M.T. *et al.* (1997) 'Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture.', *The FASEB Journal*, 11(14), pp. 1297–1307. Available at: <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.14.9409549>.
- Nicholson, T.M. *et al.* (2012) 'Testosterone and 17 $\beta$ -Estradiol Induce Glandular Prostatic Growth, Bladder Outlet Obstruction, and Voiding Dysfunction in Male Mice', *Endocrinology*, 153(11), pp. 5556–5565. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1522>.
- Nickel, J.C. *et al.* (2008) 'The Relationship between Prostate Inflammation and Lower Urinary Tract Symptoms: Examination of Baseline Data from the REDUCE Trial', *European Urology*, 54(6), pp. 1379–1384. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.11.026>.
- Nicolaï Johnson, Nathalie Chabbert-Buffet, Hormonothérapie féminisante chez les femmes transgenres, La Presse Médicale Formation, Volume 1, Issue 6, 2020, Pages 597-603, ISSN 2666-4798, <https://doi.org/10.1016/j.lpmfor.2020.10.030>.
- Nightingale, J.A., Rogers, D.F. and Barnes, P.J. (1999) 'Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects', *Thorax* [Preprint].
- Nitti, V.W. *et al.* (2013) 'Urodynamics and Safety of the  $\beta_3$ -Adrenoceptor Agonist Mirabegron in Males with Lower Urinary Tract Symptoms and Bladder Outlet Obstruction', *Journal of Urology*, 190(4), pp. 1320–1327. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.05.062>.
- Niu, Y. *et al.* (2011) 'Increased CK5/CK8-Positive Intermediate Cells with Stromal Smooth Muscle Cell Atrophy in the Mice Lacking Prostate Epithelial Androgen Receptor', *PLoS ONE*. Edited by I. Agoulnik, 6(7), p. e20202. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020202>.
- Oelke, M. *et al.* (2012) 'Monotherapy with Tadalafil or Tamsulosin Similarly Improved Lower Urinary Tract Symptoms Suggestive of Benign Prostatic Hyperplasia in an International, Randomised, Parallel, Placebo-Controlled Clinical Trial', *European Urology*, 61(5), pp. 917–925. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.01.013>.
- Olinski, R. *et al.* (1995) 'DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia', *Free Radical Biology and Medicine*, 18(4), pp. 807–813. Available at: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00171-F](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00171-F).
- Oliva, R., Martínez-Heredia, J. and Estanyol, J.M. (2008) 'Proteomics in the Study of the Sperm Cell Composition, Differentiation and Function', *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54(1), pp. 23–36. Available at: <https://doi.org/10.1080/19396360701879595>.
- Olson, A.W. *et al.* (2021) 'Stromal androgen and hedgehog signaling regulates stem cell niches in pubertal prostate development', *Development*, 148(19), p. dev199738. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.199738>.
- Orbach, H. and Shoenfeld, Y. (2007) 'Hyperprolactinemia and autoimmune diseases', *Autoimmunity Reviews*, 6(8), pp. 537–542. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.10.005>.
- Ousset, M. *et al.* (2012) 'Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development', *Nature Cell Biology*, 14(11), pp. 1131–1138. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb2600>.
- Ozden, C. *et al.* (2007) 'The correlation between metabolic syndrome and prostatic growth in patients with benign prostatic hyperplasia.' Available at: <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2006.05.040>.
- Paladini, D. *et al.* (1996) 'Onset of Re-epithelialization After Skin Injury Correlates with a Reorganization of Keratin Filaments in Wound Edge Keratinocytes: Defining a Potential Role for Keratin 16'.

- Pérez-González, A., Bévant, K. and Blanpain, C. (2023) 'Cancer cell plasticity during tumor progression, metastasis and response to therapy', *Nature Cancer* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00595-y>.
- Pigat, N. *et al.* (2019) 'Combined Sabal and Urtica Extracts (WS® 1541) Exert Anti-proliferative and Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Benign Prostate Hyperplasia', *Frontiers in Pharmacology*, 10, p. 311. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00311>.
- Pletcher, A. and Shibata, M. (2022) 'Prostate organogenesis', *Development*, 149(12), p. dev200394. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.200394>.
- Pointis, G. *et al.* (1979) 'Regulation of testosterone synthesis in the fetal mouse testis', *Journal of Steroid Biochemistry*, 11(5–6), pp. 1609–1612. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90357-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90357-1).
- Popovics, P. *et al.* (2017) 'Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit proliferation induced by inflammation in prostatic epithelial cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(6), pp. 1359–1364. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1620884114>.
- Porpiglia, F. *et al.* (2019) 'Second-generation of temporary implantable nitinol device for the relief of lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia: results of a prospective, multicentre study at 1 year of follow-up', *BJU International*, 123(6), pp. 1061–1069. Available at: <https://doi.org/10.1111/bju.14608>.
- Pouzaud, F. (2004) 'L'anethole dithiolethione : un agent cytoprotecteur contre la ténotoxicité induite par les fluoroquinolones', *Pathologie Biologie*, p. 6.
- Powell, C.R., Dillon, K.M. and Matson, J.B. (2018) 'A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications', *Biochemical Pharmacology*, 149, pp. 110–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014>.
- Prescott, J. and Coetzee, G.A. (2006) 'Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor', *Cancer Letters*, 231(1), pp. 12–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.037>.
- PRICE D. COMPARATIVE ASPECTS OF DEVELOPMENT AND STRUCTURE IN THE PROSTATE. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1963 Oct;12:1-27. PMID: 14072991.
- Rannikko, S. and Adlercreutz, H. (1983) 'Plasma estradiol, free testosterone, sex hormone binding globulin binding capacity, and prolactin in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer', *The Prostate*, 4(3), pp. 223–229. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.2990040302>.
- Rebello, R.J. *et al.* (2021) 'Prostate cancer', *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), p. 9. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>.
- Reddy, B.S. *et al.* (1993) 'Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Organosulfur Compounds', p. 7.
- Ribeiro DL, Caldeira EJ, Cândido EM, Manzato AJ, Taboga SR, Cagnon VH. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur J Histochem*. 2006 Jan-Mar;50(1):51-60. PMID: 16584985.
- Robert, G. *et al.* (2009) 'Inflammation in benign prostatic hyperplasia: A 282 patients' immunohistochemical analysis: BPH and Inflammation', *The Prostate*, 69(16), pp. 1774–1780. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.21027>.
- Roberts, R.O. *et al.* (1998) 'PREVALENCE OF A PHYSICIAN-ASSIGNED DIAGNOSIS OF PROSTATITIS: THE OLMSTED COUNTY STUDY OF URINARY SYMPTOMS AND HEALTH STATUS AMONG MEN'.
- Roberts, R.O. *et al.* (2004) 'Serum sex hormones and measures of benign prostatic hyperplasia', *The Prostate*, 61(2), pp. 124–131. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.20080>.
- Roehrborn, C.G. (2008) 'Pathology of benign prostatic hyperplasia', *International Journal of Impotence Research*, 20(S3), pp. S11–S18. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijir.2008.55>.
- Roehrborn, C.G. and ALTESS Study Group (2006) 'Alfuzosin 10 mg once daily prevents overall clinical progression of benign prostatic hyperplasia but not acute urinary retention: results of a 2-year placebo-controlled study', *BJU International*, 97(4), pp. 734–741. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06110.x>.

- Roehrborn, C.G. *et al.* (2010) 'The Effects of Combination Therapy with Dutasteride and Tamsulosin on Clinical Outcomes in Men with Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia: 4-Year Results from the CombAT Study', *European Urology*, 57(1), pp. 123–131. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.09.035>.
- Rohr, H.P. and Bartsch, G. (1980) 'Human benign prostatic hyperplasia: A stromal disease? New perspectives by quantitative morphology', *Urology*, 16(6), pp. 625–633. Available at: [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(80\)90577-4](https://doi.org/10.1016/0090-4295(80)90577-4).
- Ron, M. *et al.* (1981) 'Prolactin concentration in prostates with benign hypertrophy', *Urology*, 17(3), pp. 235–237. Available at: [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(81\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0090-4295(81)90036-4).
- Rouet, V. *et al.* (2010) 'Local prolactin is a target to prevent expansion of basal/stem cells in prostate tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), pp. 15199–15204. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0911651107>.
- Sackmann Sala, L. *et al.* (2017) 'A rare castration-resistant progenitor cell population is highly enriched in Pten-null prostate tumours: Castration-resistant progenitors are enriched in Pten<sup>-/-</sup> prostates', *The Journal of Pathology*, 243(1), pp. 51–64. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.4924>.
- Sackmann-Sala, L. *et al.* (2014) 'Prolactin-Induced Prostate Tumorigenesis Links Sustained Stat5 Signaling with the Amplification of Basal/Stem Cells and Emergence of Putative Luminal Progenitors', *The American Journal of Pathology*, 184(11), pp. 3105–3119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.07.020>.
- Sackmann-Sala, L. *et al.* (2015) 'Human and murine prostate basal/stem cells are not direct targets of prolactin', *General and Comparative Endocrinology*, 220, pp. 133–142. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.04.007>.
- Sakata, K. and Morita, T. (2012) 'Investigation of ejaculatory disorder by silodosin in the treatment of prostatic hyperplasia', *BMC Urology*, 12(1), p. 29. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2490-12-29>.
- Salm, S.N. *et al.* (2005) 'TGF- $\beta$  maintains dormancy of prostatic stem cells in the proximal region of ducts', *Journal of Cell Biology*, 170(1), pp. 81–90. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200412015>.
- Sapoval, Marc, Nicolas Thiounn, Aurélien Descazeaud, Carole Déan, Alain Ruffion, Gaële Pagnoux, Ricardo Cudas Duarte, et al. « Prostatic Artery Embolisation versus Medical Treatment in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia (PARTEM): A Randomised, Multicentre, Open-Label, Phase 3, Superiority Trial ». *The Lancet Regional Health - Europe* 31 (août 2023): 100672. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2023.100672>.
- Schauer, I.G. and Rowley, D. (2011) 'The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia.' Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.05.007>.
- Schauer, I.G. *et al.* (2008) 'Elevated Epithelial Expression of Interleukin-8 Correlates with Myofibroblast Reactive Stroma in Benign Prostatic Hyperplasia', *Urology*, 72(1), pp. 205–213. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2007.11.083>.
- Schauer, I.G., Ressler, S.J. and Rowley, D.R. (2009) 'Keratinocyte-derived chemokine induces prostate epithelial hyperplasia and reactive stroma in a novel transgenic mouse model: KC/IL-8 Induces Prostate Epithelial Hyperplasia', *The Prostate*, 69(4), pp. 373–384. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.20886>.
- Selman, S.H. (2011) 'The McNeal Prostate: A Review', *Urology*, 78(6), pp. 1224–1228. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.07.1395>.
- Shah, A. *et al.* (2021) 'Mechanistic targets for BPH and prostate cancer—a review', *Reviews on Environmental Health*, 36(2), pp. 261–270. Available at: <https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0051>.
- Shappell, S.B. *et al.* (2004) 'Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee', *Cancer research* [Preprint].
- Shappell, S.B. *et al.* (no date) 'Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee', p. 37.

- Shibata, M. *et al.* (2020) 'Bipotent Progenitors Do Not Require Androgen Receptor for Luminal Specification during Prostate Organogenesis', *Stem Cell Reports*, 15(5), pp. 1026–1036. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.10.004>.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2016) 'Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), pp. 7–30. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21332>.
- Siejka, A., Schally, A. and Barabutis, N. (2013) 'The Effect of LHRH Antagonist Cetrorelix in Crossover Conditioned Media from Epithelial (BPH-1) and Stromal (WPMY-1) Prostate Cells', *Hormone and Metabolic Research*, 46(01), pp. 21–26. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1349127>.
- Sies, H. and Jones, D.P. (2020) 'Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), pp. 363–383. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
- Sies, H., Berndt, C. and Jones, D.P. (2017) 'Oxidative Stress'.
- Signoretti, S. *et al.* (2000) 'p63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development', *The American Journal of Pathology*, 157(6), pp. 1769–1775. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64814-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64814-6).
- Siiteri, P.K. and Wilson, J.D. (1974) 'Testosterone Formation and Metabolism During Male Sexual Differentiation in the Human Embryo', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 38(1), pp. 113–125. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-38-1-113>.
- Silver, R.I. *et al.* (1994) 'Cell Type Specific Expression of Steroid 5 $\alpha$ -Reductase 2', *Journal of Urology*, 152(2 Part 1), pp. 438–442. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)32758-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)32758-1).
- Singh, P. *et al.* (2023) 'Human prostate organoid generation and the identification of prostate development drivers using inductive rodent tissues', *Development*, 150(13), p. dev201328. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.201328>.
- Sorrentino, C. *et al.* (2011) 'Androgen Deprivation Boosts Prostatic Infiltration of Cytotoxic and Regulatory T Lymphocytes and Has No Effect on Disease-Free Survival in Prostate Cancer Patients', *Clinical Cancer Research*, 17(6), pp. 1571–1581. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2804>.
- Spassov, S.G. *et al.* (2017) 'Hydrogen Sulfide Prevents Formation of Reactive Oxygen Species through PI3K/Akt Signaling and Limits Ventilator-Induced Lung Injury', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/3715037>.
- Spencer, N.Y. and Engelhardt, J.F. (2014) 'The Basic Biology of Redoxosomes in Cytokine-Mediated Signal Transduction and Implications for Disease-Specific Therapies', *Biochemistry*, 53(10), pp. 1551–1564. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi401719r>.
- Steger, R.W. *et al.* (1998) 'Neuroendocrine and Reproductive Functions in Male Mice with Targeted Disruption of the Prolactin Gene', 139(9).
- Sterling, J. and Garcia, M.M. (2020) 'Cancer screening in the transgender population: a review of current guidelines, best practices, and a proposed care model', *Translational Andrology and Urology*, 9(6), pp. 2771–2785. Available at: <https://doi.org/10.21037/tau-20-954>.
- Stohs, S. (1995) 'Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions', *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), pp. 321–336. Available at: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).
- Stohs, S.J. *et al.* (1986) 'Effects of oltipraz, BHA, ADT and cabbage on glutathione metabolism, DNA damage and lipid peroxidation in old mice', *Mechanisms of Ageing and Development*, 37(2), pp. 137–145. Available at: [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(86\)90071-0](https://doi.org/10.1016/0047-6374(86)90071-0).
- Strand, D.W. *et al.* (2017) 'Targeting phenotypic heterogeneity in benign prostatic hyperplasia', *Differentiation*, 96, pp. 49–61. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2017.07.005>.

- Sugimura, Y., Cunha, G.R. and Donjacour, A.A. (1986) 'Morphological and Histological Study of Castration-Induced Degeneration and Androgen-Induced Regeneration in the Mouse Prostate1', *Biology of Reproduction*, 34(5), pp. 973–983. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.973>.
- Sung, Hyun Hwan, Jiwoong Yu, Su Jeong Kang, Mee Ree Chae, Insuk So, Jong Kwan Park, et Sung Won Lee. « Persistent Erectile Dysfunction after Discontinuation of 5-Alpha Reductase Inhibitor Therapy in Rats Depending on the Duration of Treatment ». *The World Journal of Men's Health* 37, n° 2 (2019): 240. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180082>.
- Syms, A.J., Harper, M.E. and Griffiths, K. (1985) 'The effect of prolactin on human BPH epithelial cell proliferation', *The Prostate*, 6(2), pp. 145–153. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.2990060204>.
- T'Sjoen, G. *et al.* (2019) 'Endocrinology of Transgender Medicine', *Endocrine Reviews*, 40(1), pp. 97–117. Available at: <https://doi.org/10.1210/er.2018-00011>.
- Takeda, H., Suematsu, N. and Mizuno, T. (1990) 'Transcription of prostatic steroid binding protein (PSBP) gene is induced by epithelial–mesenchymal interaction', *Development*, 110(1), pp. 273–281. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.110.1.273>.
- Tan, D.Q. and Suda, T. (2018) 'Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function', *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(2), pp. 149–168. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7273>.
- Tapanainen, J. *et al.* (1981) 'Age-Related Changes in Endogenous Steroids of Human Fetal Testis during Early and Midpregnancy\*', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 52(1), pp. 98–102. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-52-1-98>.
- Thomas, J P, M Maiorino, F Ursini, et A W Girotti. « Protective Action of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase against Membrane-Damaging Lipid Peroxidation. In Situ Reduction of Phospholipid and Cholesterol Hydroperoxides. » *Journal of Biological Chemistry* 265, n° 1 (janvier 1990): 454-61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40252-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40252-4).
- Thorson, P. *et al.* (2003) 'Basal Cell Hyperplasia in the Peripheral Zone of the Prostate', *Modern Pathology*, 16(6), pp. 598–606. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000073526.59270.6E>.
- Tian, S. *et al.* (2019) 'Effect of stachydrine hydrochloride to the prostate hyperplasia model in mice', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), pp. 782–789. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.12.012>.
- Tika, E. *et al.* (2019) 'Spatiotemporal regulation of multipotency during prostate development', *Development*, p. dev.180224. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.180224>.
- Timms, B.G. and Hofkamp, L.E. (2011) 'Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia', *Differentiation*, 82(4–5), pp. 173–183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.08.002>.
- Timms, B.G., Mohs, T.J. and Didio, L.J.A. (1994) 'Ductal Budding and Branching Patterns in the Developing Prostate', *Journal of Urology*, 151(5), pp. 1427–1432. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)35273-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)35273-4).
- Toivanen, R. and Shen, M.M. (2017) 'Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification', *Development*, 144(8), pp. 1382–1398. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.148270>.
- Torkko, K.C. *et al.* (2015) 'Prostate Biopsy Markers of Inflammation are Associated with Risk of Clinical Progression of Benign Prostatic Hyperplasia: Findings from the MTOPS Study', *Journal of Urology*, 194(2), pp. 454–461. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.03.103>.
- Tsujimura, A. *et al.* (2002) 'Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis', *The Journal of Cell Biology*, 157(7), pp. 1257–1265. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200202067>.
- Tsujimura, A. *et al.* (2015) 'Histologic Evaluation of Human Benign Prostatic Hyperplasia Treated by Dutasteride: A Study by Xenograft Model With Improved Severe Combined Immunodeficient Mice', *Urology*, 85(1), p. 274.e1-274.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.09.024>.

- Tuong, Z.K. *et al.* (2021) 'Resolving the immune landscape of human prostate at a single-cell level in health and cancer', *Cell Reports*, 37(12), p. 110132. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110132>.
- Tutrone, R.F. *et al.* (1993) 'Benign Prostatic Hyperplasia In A Transgenic Mouse: A New Hormonally Sensitive Investigatory Model', *Journal of Urology*, 149(3), pp. 633–639. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)36169-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)36169-4).
- Untergasser, G., Madersbacher, S. and Berger, P. (2005) 'Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling', *Experimental Gerontology*, 40(3), pp. 121–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.12.008>.
- Vallancien, G. *et al.* (2008) 'Alfuzosin 10 mg once daily for treating benign prostatic hyperplasia: a 3-year experience in real-life practice', *BJU International*, 101(7), pp. 847–852. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.07458.x>.
- Van De Wijngaart, D.J. *et al.* (2012) 'Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding groove', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 352(1–2), pp. 57–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.007>.
- van Kerrebroeck, P. *et al.* (2013) 'Combination Therapy with Solifenacin and Tamsulosin Oral Controlled Absorption System in a Single Tablet for Lower Urinary Tract Symptoms in Men: Efficacy and Safety Results from the Randomised Controlled NEPTUNE Trial', *European Urology*, 64(6), pp. 1003–1012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.07.034>.
- Vasiliou, Vasilis, et Daniel W. Nebert. « Analysis and Update of the Human Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Gene Family ». *Human Genomics* 2, n° 2 (décembre 2005): 138. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-2-2-138>.
- Vela Navarrete, R. *et al.* (2003) 'BPH and Inflammation: Pharmacological Effects of Permixon on Histological and Molecular Inflammatory Markers. Results of a Double Blind Pilot Clinical Assay', *European Urology*, 44(5), pp. 549–555. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(03\)00368-3](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00368-3).
- Vickman, R.E. *et al.* (2022) 'TNF is a potential therapeutic target to suppress prostatic inflammation and hyperplasia in autoimmune disease', *Nature Communications*, 13(1), p. 2133. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29719-1>.
- Vikram, A., Jena, G.B. and Ramarao, P. (2010) 'Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: Linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia: Contractility of Prostate in IR Rats', *The Prostate*, 70(1), pp. 79–89. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.21041>.
- Vilches, J. *et al.* (1982) 'Sem and X-Ray Microanalysis of Human Prostatic Calculi', *Journal of Urology*, 127(2), pp. 371–373. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53784-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53784-2).
- Vital, P., Castro, P. and Ittmann, M. (2016) 'Oxidative stress promotes benign prostatic hyperplasia: Oxidative Stress Promotes BPH', *The Prostate*, 76(1), pp. 58–67. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23100>.
- Wang, B. *et al.* (2015) 'Castration-Resistant Lgr5+ Cells Are Long-Lived Stem Cells Required for Prostatic Regeneration', *Stem Cell Reports*, 4(5), pp. 768–779. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.003>.
- Wang, L., Hsu, C.-L. and Chang, C. (2005) 'Androgen receptor corepressors: An overview', *The Prostate*, 63(2), pp. 117–130. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.20170>.
- Wang, X. *et al.* (2009) 'A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer', *Nature*, 461(7263), pp. 495–500. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08361>.
- Wang, X. *et al.* (2020) 'Identification of a Zeb1 expressing basal stem cell subpopulation in the prostate', *Nature Communications*, 11(1), p. 706. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14296-y>.
- Wang, Y. *et al.* (2001) 'Cell differentiation lineage in the prostate', *Differentiation*, 68(4–5), pp. 270–279. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.680414.x>.
- Wang, Y. *et al.* (2005) 'Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue', *The Prostate*, 64(2), pp. 149–159. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.20225>.

- Wang, Z. *et al.* (2017) 'Androgenic to oestrogenic switch in the human adult prostate gland is regulated by epigenetic silencing of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2: Androgenic to oestrogenic switch in the prostate gland', *The Journal of Pathology*, 243(4), pp. 457–467. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.4985>.
- Wang, Z. *et al.* (2023) 'Simvastatin Improves Benign Prostatic Hyperplasia: Role of Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  and Classic WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), p. 4911. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24054911>.
- Wang, Z., Wu, W., Kim, M.S. *et al.* GnRH pulse frequency and irregularity play a role in male aging. *Nat Aging* 1, 904–918 (2021). <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00116-5>
- Webber, M.M. (1999) 'A human prostatic stromal myofibroblast cell line WPMY-1: a model for stromalepithelial interactions in prostatic neoplasia', *Carcinogenesis*, 20(7), pp. 1185–1192. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/20.7.1185>.
- Wei, X. *et al.* (2019) 'Spatially Restricted Stromal Wnt Signaling Restrains Prostate Epithelial Progenitor Growth through Direct and Indirect Mechanisms', *Cell Stem Cell*, 24(5), pp. 753-768.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.010>.
- Westaby, D. *et al.* (2022) 'A New Old Target: Androgen Receptor Signaling and Advanced Prostate Cancer', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62(1), pp. 131–153. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-052220-015912>.
- Wilhelm, D. and Koopman, P. (2006) 'The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development', *Nature Reviews Genetics*, 7(8), pp. 620–631. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg1903>.
- Wilson, J.D. and Roehrborn, C. (1999) 'Long-Term Consequences of Castration in Men: Lessons from the Skoptzy and the Eunuchs of the Chinese and Ottoman Courts', 84(12).
- Wilson, JeanD. *et al.* (1981) 'Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes', *Human Genetics*, 58(1). Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00284153>.
- Wong, H.-S. *et al.* (2017) 'Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions', *Journal of Biological Chemistry*, 292(41), pp. 16804–16809. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.789271>.
- Wu, C.-T. *et al.* (2007) 'Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), pp. 12679–12684. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0704940104>.
- Wu, X., Gu, Y. and Li, L. (2017) 'The anti-hyperplasia, anti-oxidative and anti-inflammatory properties of Qing Ye Dan and swertiamarin in testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats', *Toxicology Letters*, 265, pp. 9–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.011>.
- Xiao, L. *et al.* (2016) 'The essential role of GATA transcription factors in adult murine prostate', *Oncotarget*, 7(30), pp. 47891–47903. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10294>.
- Xie, Q. *et al.* (2017) 'Dissecting cell-type-specific roles of androgen receptor in prostate homeostasis and regeneration through lineage tracing', *Nature Communications*, 8, p. 14284. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms14284>.
- Xin, L. *et al.* (2007) 'Self-Renewal and Multilineage Differentiation In Vitro from Murine Prostate Stem Cells', *Stem Cells*, 25(11), pp. 2760–2769. Available at: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0355>.
- Xin, L., Lawson, D.A. and Witte, O.N. (2005) 'The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), pp. 6942–6947. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0502320102>.
- Xu, C. *et al.* (2018) 'Effects of metformin on prostatic tissue of rats with metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia', *International Urology and Nephrology*, 50(4), pp. 611–617. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1826-9>.

- Xue, Y. *et al.* (1998) 'Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate', *The Prostate*, 34(4), pp. 292–301. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19980301\)34:4<292::AID-PROS7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19980301)34:4<292::AID-PROS7>3.0.CO;2-J).
- Yamashita, M. *et al.* (2003) 'Determination of percent area density of epithelial and stromal components in development of prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats', *Urology*, 61(2), pp. 484–489. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(02\)02167-2](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(02)02167-2).
- Yan, Q. *et al.* (2022) 'Single-cell RNA-sequencing technology demonstrates the heterogeneity between aged prostate peripheral and transitional zone', *Clinical and Translational Medicine*, 12(10). Available at: <https://doi.org/10.1002/ctm2.1084>.
- Yang, Y. *et al.* (2017) 'CD8+ T cells promote proliferation of benign prostatic hyperplasia epithelial cells under low androgen level via modulation of CCL5/STAT5/CCND1 signaling pathway'. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep42893>.
- Yoo, Y.A. *et al.* (2016) 'Bmi1 marks distinct castration-resistant luminal progenitor cells competent for prostate regeneration and tumour initiation', *Nature Communications*, 7(1), p. 12943. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms12943>.
- Yu, H. *et al.* (2011) 'An examination of the potential effect of lipids on the first-pass metabolism of the lipophilic drug anethol trithione', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), pp. 5048–5058. Available at: <https://doi.org/10.1002/jps.22702>.
- Zabaiou, N. *et al.* (2016) 'Oxidative stress in benign prostate hyperplasia', *Andrologia*, 48(1), pp. 69–73. Available at: <https://doi.org/10.1111/and.12420>.
- Zanatelli, M. *et al.* (2021) 'Prolactin promotes a partial recovery from the atrophy of both male and female gerbil prostates caused by castration', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1), p. 94. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00777-2>.
- Zendehdel, A. *et al.* (2021) 'The effect of vitamin D supplementation on the progression of benign prostatic hyperplasia: A randomized controlled trial', *Clinical Nutrition*, 40(5), pp. 3325–3331. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.005>.
- Zhang, B. *et al.* (2016) 'Non-Cell-Autonomous Regulation of Prostate Epithelial Homeostasis by Androgen Receptor', *Molecular Cell*, 63(6), pp. 976–989. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.025>.
- Zhang, E. *et al.* (2020) 'Differences of the immune cell landscape between normal and tumor tissue in human prostate', *Clinical and Translational Oncology*, 22(3), pp. 344–350. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02128-5>.
- Zhang, Jinlong *et al.* (2019) 'Toxicity, bioactivity, release of H<sub>2</sub>S in vivo and pharmaco-kinetics of H<sub>2</sub>S-donors with thiophosphamide structure', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 176, pp. 456–475. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.017>.
- Zhang, M. *et al.* (2020) 'Chronic inflammation promotes proliferation in the prostatic stroma in rats with experimental autoimmune prostatitis: study for a novel method of inducing benign prostatic hyperplasia in a rat model', *World Journal of Urology*, 38(11), pp. 2933–2943. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00345-020-03090-6>.
- Zhang, X., Na, Y. and Guo, Y. (2004) 'Biologic feature of prostatic hyperplasia developed in spontaneously hypertensive rats', *Urology*, 63(5), pp. 983–988. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2003.11.024>.
- Zhang, Y. and Munday, R. (2008) 'Dithiolethiones for cancer chemoprevention: where do we stand?', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(11), pp. 3470–3479. Available at: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0625>.
- Zhou, Z. *et al.* (2023) 'Upregulation of FGF7 Induced Intravesical Prostatic Protrusion of Benign Prostatic Hyperplasia via the ERK1/2 Signaling Pathway', *Gerontology*, 69(5), pp. 615–627. Available at: <https://doi.org/10.1159/000527929>.
- Ziada, A.S., Smith, M.-S.R. and Côté, H.C.F. (2020) 'Updating the Free Radical Theory of Aging', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p. 575645. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.575645>.

Zou, Y. *et al.* (2017) 'Protective Effects of *Lepidium meyenii* (Maca) Aqueous Extract and Lycopene on Testosterone Propionate-Induced Prostatic Hyperplasia in Mice: Protective effects of Maca extract and lycopene on BPH', *Phytotherapy Research*, 31(8), pp. 1192–1198. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.5838>.