# UNIVERSITÉ DE TOURS

***ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV***

**INSERM UMR 1069 « Nutrition, Croissance et Cancer »**

# THÈSE présentée par :

**Mathilde CANCEL**

soutenue le : **08 décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

# Influences de la pression thérapeutique et du micro-environnement adipeux dans l'agressivité du cancer de prostate

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **Mme FROMONT Gaëlle** | PU-PH, Université de Tours |
| **Mme MAHEO Karine** | PU, Université de Tours |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **Mme DUTERQUE-COQUILLAUD Martine** | DR CNRS, Université de Lille |
| **M OUDARD Stéphane** | PU-PH, Université Paris Descartes |

---

**JURY :**

| | |
|---|---|
| **M BRUYERE Franck** | PU-PH, Université de Tours |
| **M CERALINE Jocelyn** | MCU-PH, Université de Strasbourg |
| **Mme DUTERQUE-COQUILLAUD Martine** | DR CNRS, Université de Lille |
| **Mme FROMONT Gaëlle** | PU-PH, Université de Tours |
| **M LINASSIER Claude** | PU-PH, Université de Tours |
| **Mme MAHEO Karine** | PU, Université de Tours |
| **M OUDARD Stéphane** | PU-PH, Université Paris Descartes |
| **Mme REBILLARD Amélie** | PU, Université de Rennes |

**Président du jury** : M LINASSIER Claude

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.
Je remercie donc le directeur de recherche Martine Duterque-Coquillaud et le professeur Stéphane Oudard d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ainsi que le professeur Amélie Rebillard, le professeur Franck Bruyère, le docteur Jocelyn Ceraline et le professeur Claude Linassier d'avoir accepté d'examiner mes travaux.
Je suis émue à l'idée de retrouver mon jury de thèse de médecine quasiment au complet pour cette occasion.

Je remercie le professeur Christophe Vandier, directeur de l'UMR 1069 « Nutrition, Croissance et Cancer », pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire pour ma thèse d'université.

Je remercie aussi tout particulièrement mes directrices de thèse, les professeurs Gaëlle Fromont et Karine Mahéo. Je vous remercie d'avoir accepté de m'accompagner dans ce projet de thèse, de votre patience et votre compréhension tout au long de ce travail que je me suis efforcée de mener de front au mieux avec mes activités cliniques, d'enseignement et de recherche clinique.

Merci à la « team prostate » : David, Dorine, Olivier, Coralie, Camille, Jean-Baptiste, Amélie. Ça a été un plaisir de retrouver la paillasse à vos côtés. Je crois que c'est vrai finalement : la pipette c'est comme le vélo, ça ne s'oublie pas ! David je ne comprends toujours pas comment tu as réussi à me faire installer R sur mon ordinateur et à m'avoir appris à m'en servir (un peu)… Dorine garde ta bonne humeur et ton humour, c'est comme ça qu'on t'aime !
Merci à l'ensemble de l'équipe du N2C pour votre accueil. J'espère que ce travail de thèse n'est que le premier de nombreux travaux de recherche auxquels je pourrais participer avec vous. Karine, Caro, Gunther, ça a été un plaisir de partager votre bureau ces dernières années, j'espère pouvoir continuer cette cohabitation en alternance par la suite, même si je me doute que ce ne sera pas évident vu la crise du logement actuelle.

Un grand merci à toute l'Onco Med : chef, Bérengère, Catherine, Las Vegas, Maby, Crackotte, Elise, Cécilia, Romaine, Fanny. Je suis tellement fière de faire partie de votre équipe ! Merci de m'avoir déchargée de mon activité clinique quand il a fallu que j'accepte l'idée que je n'allais pas réussir à tout mener de front au cours de cette thèse. Merci pour votre soutien dans ce projet de thèse et sa suite. Votre patience aura eu raison de moi, je vous le promets, à 40 ans je renonce à la carte étudiante !
Chef je tiens à vous remercier d'avoir cru en moi, de m'avoir encouragé à suivre vos pas, je ne serai jamais arrivée jusque-là sans votre disponibilité, votre bienveillance et vos conseils avisés.

Merci à tous ceux qui m'ont donné le goût de la recherche ou l'ont renforcé :
Je garde un souvenir ému de mes premiers pas en recherche au cours de ma maitrise à Montréal, merci Isabelle de m'avoir montré qu'on pouvait allier ingénierie et biologie même si j'ai ensuite bifurqué vers des études de médecine, j'ai fini par retrouver mon chemin vers la recherche translationnelle. Et merci Kareen pour m'avoir enseigné les rudiments du maniement de la pipette !

Merci Agnès pour m'avoir accueilli dans ton équipe de recherche durant deux étés, et pour m'avoir conforté dans l'idée que moi aussi j'aimerai, un jour, allier activités clinique et de recherche.
Merci Thierry pour ta confiance, je n'oublie pas que c'est grâce à toi si Silence a vu le jour et que j'ai l'occasion de découvrir en quoi consiste le montage et la gestion d'un projet de PHRC inter régional. Merci aussi à toute l'équipe de Silence, à votre bienveillance et votre disponibilité pour m'accompagner dans mon premier projet de recherche clinique.
Merci à toute l'équipe d'oncogériatrie, et plus particulièrement à Mr Dorval, pour m'avoir invitée à rejoindre l'aventure Fastoch. Une présentation en oral à l'ASCO, je vais m'en souvenir toute ma vie !

Merci à tous ceux qui me supportent et me soutiennent au quotidien :
Mes amis, et tout particulièrement Julie, Laurianne, Crackotte, Las Vegas, Kareen, Marie, Noémie, Alice, djib : merci pour votre amitié, votre présence, vos conseils avisés et votre écoute, vous êtes des poubelles auditives en or et des coachs de vie fabuleux !
Ma famille, Monette je ne pourrais jamais te remercier assez, non seulement tu es un modèle mais en plus tu es une grand-mère incroyable pour les filles, P'ou merci d'avoir toujours cru en moi, Val, Arthur, Marine, Youyou merci de partager ensemble tous les moments forts de nos vies, les meilleurs comme des moins drôles, et j'attends le prochain rendez-vous fin décembre avec impatience !
Guillaume, merci de me permettre de poursuivre mes rêves, merci de ton soutien au quotidien, et bien sûr de ton don pour la logistique !
Elise et Julia, mes bébés, sachez que vous êtes les personnes que j'aime le plus au monde et que ce dont je suis la plus heureuse et la plus fière, c'est d'être votre maman.

## Avant-propos

Ce travail a été effectué sous la direction du professeur Gaëlle FROMONT et la co-direction du professeur Karine MAHEO du laboratoire INSERM UMR 1069 « Nutrition, Croissance et Cancer » de Tours, dirigé par le professeur Christophe VANDIER et co-dirigé par le professeur Gaëlle FROMONT.
Cette thèse a été réalisée en collaboration avec le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Tours, dirigé par le professeur Gaëlle FROMONT, et le service d'Urologie du CHU de Tours, dirigé par le professeur Franck BRUYERE. Elle a aussi été réalisée en collaboration avec le professeur Amélie REBILLARD du laboratoire EA 7470 "Mouvement, Sport, Santé" de Rennes dirigé par le professeur Benoit BIDEAU.

**Publications en lien avec mon travail de thèse :**
Ce travail a donné lieu à la publication d'un article original :
Cancel M., Castellier C., Debiais-Delpech C., Charlese T., Rozet F., Rioux-Leclercq N., Mathieu R., Beltjensi F., Cormier L., Bruyere F. and Fromont G. "Specificities of small cell neuroendocrine prostate cancer: Adverse prognostic value of TTF1 expression" *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (2021) 39 : 74.e17−74.e23

Un deuxième article a été resoumis le 11 octobre 2023 à *The Prostate*, après révisions :
Cancel M., Crottes D., Bellanger D., Bruyère F., Mousset C., Pinault M., Mahéo K. and Fromont G. "Variable effects of periprostatic adipose tissue on prostate cancer cells: role of adipose tissue lipid composition and cancer cells related factors".

De plus, ce travail a donné lieu à la publication d'un article de revue :
Cancel M., Pouillot W., Mahéo K., Fontaine A., Crottès D. and Fromont G. "Interplay between Prostate Cancer and Adipose Microenvironment: A Complex and Flexible Scenario" *International Journal of Molecular Sciences* (2022), 23 (18) : 10762

**Publications liées à mes activités de recherche au laboratoire :**
Bery, F.; Cancel, M.; Chantôme, A.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Rozet, F.; Mahéo, K.* and Fromont, G*. "The Calcium-Sensing Receptor Is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer" Cancers (Basel) (2020), 12 (4) : 860

Bery, F.*; Cancel, M.*; Gueguinou, M.; Vandier C.; Potier-Cartereau, M.; Chantome A.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Fromont, G.* and Mahéo, K.* "Zeb1 and SK3 Channel Are Up-Regulated in Castration-Resistant Prostate Cancer and Promote Neuroendocrine Differentiation" Cancers (Basel) (2021) 13 (12) : 2947

**Communications affichées :**

Cancel M., Crottès D., Bellanger D., Bruyère F., Mousset C., Pinault M., Mahéo K. and Fromont G. "Variable effects of periprostatic adipose tissue on prostate cancer cells: role of adipose tissue lipid composition and cancer cell related factors" FEBS, Tours, 2023

Cancel M., Crottès D., Bellanger D., Bruyère F., Mousset C., Pinault M., Mahéo K. and Fromont G. « Hétérogénéité des effets du tissu adipeux périprostatique sur les cellules de cancer de prostate : rôle de la composition lipidique du tissu adipeux » Journée Cancéropôle Grand Ouest, Vannes, 2023

**Formation d'étudiants :**

Durant ce travail de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à l'encadrement de deux étudiantes en stage au laboratoire : Manon Casseron (étudiante en médecine pour son stage de M1 recherche), Amélie Bura (étudiante en pharmacie, en 5$^{ème}$ année, pour son stage de recherche de 5 mois).

## Résumé

Le cancer de prostate (CaP) est une maladie hétérogène en termes d'agressivité que ce soit au stade localisé ou métastatique. Nous nous sommes d'une part, intéressés au rôle du microenvironnement adipeux (tissu adipeux périprostatique ou TAPP) sur l'agressivité du CaP localisé. Au stade métastatique, nous avons recherché des marqueurs pronostiques des CaP neuroendocrines (CPNE), la forme la plus agressive de la maladie.

Dans une première partie, nous avons analysé 30 échantillons tumoraux de CPNE. Nous avons constaté que l'expression du « thyroid transcription factor 1 » (TTF1), marqueur de différenciation NE exprimé chez 50% des patients, était corrélée à la perte d'expression de gènes régulés par le récepteur aux androgènes et à des marqueurs d'agressivité : augmentation de la prolifération, de l'expression de Zeb1 (facteur de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse), et perte de PTEN. En analyse multivariée, seule l'expression de TTF1 était significativement associée à une diminution de la survie globale des patients.

A un stade plus précoce de la maladie, nous nous sommes intéressés à l'influence du TAPP sur l'agressivité du CaP. Parmi 59 CaP pT3 analysés, la partie extra prostatique de la tumeur (au contact avec le TAPP) montrait globalement une augmentation de l'expression de Ki67 et Zeb1 par rapport aux zones intra-prostatiques, et une diminution de plusieurs marques épigénétiques (5MC, 5HMC, H3K27ac). Ces variations d'expression étaient cependant très hétérogènes d'un patient à l'autre. Sur un modèle de co-cultures *in vitro*, entre lignées cellulaires de CaP (PC3, LNCaP) et adipocytes isolés de TAPP issus de patients opérés pour un CaP, nous avons observé une augmentation de Ki67 et Zeb1 dans les cellules cancéreuses, mais seulement pour les TAPP associés aux cancers les plus agressifs (pT3). Après analyse de la composition en acides gras du TAPP, le taux de prolifération des PC3 était corrélé au taux d'acide eicosadiénoïque (EDA), mais aussi inversement corrélé au taux d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'expression d'H3K27me3 était également inversement corrélée au contenu en EPA du TAPP.

De plus, nous avons observé sur un modèle murin de xénogreffes de CaP un ralentissement de la croissance des tumeurs lorsque le régime alimentaire était enrichi en EPA. Nous avons ensuite réalisé des co-cultures entre le tissu adipeux (TA) péri-épidydimaire murin et des PC3, qui ont montré une diminution de la prolifération des PC3 pour les TA enrichis en EPA. Nous avons également observé une diminution de plus de 80% de l'anhydrase carbonique 9 et de plus de 20% de Zeb1 sous conditions hypoxiques après co-culture avec les TA enrichis en EPA. Par ailleurs, la taille des gouttelettes lipidiques dans les cellules PC3 était augmentée après co-culture avec les TA enrichis en EPA.

En conclusion, au stade métastatique, nous avons identifié dans les CNPE, l'expression de TTF1 comme marqueur pronostique de survie. Au stade localisé, nos résultats suggèrent un effet pro ou anti-tumoral du TAPP dépendant de sa composition lipidique, et notamment de sa teneur en EPA.

## Abstract

Prostate cancer (PCa) aggressiveness is highly heterogeneous, in localized as well as in metastatic stages. We focused on the interactions between adipose microenvironment (from the periprostatic adipose tissue, PPAT) and localized PCa, and its role in PCa aggressiveness. In the metastatic setting, we searched for prognostic factors in an aggressive subtype of PCa, neuroendocrine prostate cancer (NEPC).

NEPC samples from 30 patients were analyzed. We observed that the « thyroid transcription factor 1 » (TTF1), a neuroendocrine marker, was expressed in 50% of the samples. TTF1 staining correlated with loss of expression of androgen receptor regulated genes and with markers of aggressiveness: increased proliferation and Zeb1 (a key transcription factor of epithelial to mesenchymal transition) expression, together with PTEN loss. In multivariate analysis, only TTF1 expression was significantly associated with shorter overall survival.

At an earlier stage of the disease, locally advanced PCa, we studied the role of PPAT on tumor aggressiveness. We analyzed 59 pT3 PCa and observed that Ki67 and Zeb1 were more expressed in the extra-prostatic contingent (in close contact with PPAT) compared to their intra-prostatic foci. We also observed a decreased expression of several epigenetic markers (5MC, 5HMC, H3K27ac). Those variations were nonetheless highly heterogeneous from one patient to the other. Then, we observed that co-cultures between PCa cell lines (PC3, LNCaP) and the lipidic fraction of PPAT (collected during radical prostatectomy for PCa), led to increase Ki67 and Zeb1 expressions in cancer cells, yet only with PPAT from the more aggressive PCa (pT3 tumors). We also assessed that PC3 proliferation rate correlated with low eicosapentaenoic acid (EPA), and high eicosadienoic acid content, moreover H3K27me3 expression correlated with low EPA content.

On a murine PCa xenograft model, we observed a slower tumoral growth when mice were fed with a diet enriched in EPA. Then, *in vitro*, co-cultures of peri-epididymal murine adipose tissue (AT) with PC3 cells led to decrease PC3 cell proliferation when AT was EPA enriched, together with an increase in the size of lipid droplets in PC3 cells. We also observed an important decrease of anhydrase carbonic 9 and Zeb1 expressions under hypoxia when cells were co-cultured with EPA enriched AT.

In conclusion, in the metastatic setting, we identified a prognostic role of TTF1 in NEPC, on overall survival. In the localized setting, our results suggest that PPAT may have pro- or anti-tumoral effects on PCa depending on its fatty acid composition, particularly the EPA content.

## Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| 5hmC : | 5-hydroxyméthylcytosine |
| 5mC : | 5-methylcytosine |
| AD : | androstènedione |
| ADN : | acide désoxyribonucléique |
| ADNc : | AND complémentaire |
| AG : | acide gras |
| AGPI : | acide gras poly-insaturé |
| AL : | acide linoléique |
| ARE : | éléments de réponse aux androgènes |
| ARN : | acide ribonucléique |
| ARNm : | ARN messager |
| BRCAm : | mutation du gène « breast cancer » |
| CAF : | fibroblaste associé au cancer |
| CAIX : | anhydrase carbonique 9 |
| CaP : | cancer de prostate |
| ChIP : | immunoprécipitation de la chromatine |
| CpG : | cytosine précédant une guanine |
| CPMRC : | cancer de prostate métastatique résistant à la castration |
| CPNE : | cancer de prostate neuroendocrine |
| CPRC : | cancer de prostate résistant à la castration |
| Ct : | Cycle de Threshold |
| DHA : | acide docosahexaénoïque |
| DHEA : | déhydro-épi-androstérone |
| DHT : | dihydrotestostérone |
| DNMT : | méthyltransférase de l'ADN |
| EDA : | acide écosadiénoïque |
| EGF : | epidermal growth factor |
| EPA: | acide eicosapentaénoïque |
| EZH2 : | enhancer of zeste homolog 2 |
| FGF2 : | fibroblast growth factor 2 |
| HAT : | histone acétyltransférase |
| HDAC : | histone désacétylase |
| HDM : | histone déméthylase |
| HGF : | hepatic growth factor |
| HMT : | histone méthyltransférase |
| IGF : | insulin-like growth factor |
| IHC : | immunohistochimie |
| IRM : | imagerie par résonance magnétique |
| ISUP : | International Society of Urological Pathology |
| LBD : | ligand binding domain |
| Lu PSMA : | lutétium PSMA |
| miARN : | microARN |

MMP : métalloprotéinases de matrice
NE : neuroendocrine
NGF : nerve growth factor
NO : monoxide d'azote
PARP : poly(ADP-ribose) polymérase
PSA : antigène spécifique de prostate
PSMA : antigène membranaire spécifique de la prostate
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RA : récepteur aux androgènes
RT : reverse transcription
SOCE : Store Operated $Ca^{2+}$ Entry (= entrée calcique dépendant des réserves du réticulum endoplasmique)
TA : tissu adipeux
TAPP : tissu adipeux périprostatique
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
TET : ten-eleven translocation
TTF1 : thyroid transcription factor 1
TGF-β : tumor growth factor β
TMA : tissue microarray
TNFα : tumor necrosis factor α
Zeb1 : zinc finger E-box-binding homeobox 1

**Lignées cellulaires de CaP citées dans ce travail :**

DU145 : lignée provenant d'une métastase cérébrale d'un patient. Elle est RA négative.
LNCaP : lignée provenant d'une atteinte ganglionnaire d'un patient. Elle est RA positive.
PC3 : lignée provenant d'une métastase osseuse d'un patient. Elle est RA négative.
VCaP : lignée provenant d'une métastase osseuse vertébrale d'un patient, de CaP résistant à la castration, qui a ensuite été xénogreffée dans une souris. Elle est RA positive.
22Rv1 : lignée provenant d'une xénogreffe de CaP humain androgéno-dépendant, dans une souris castrée, afin d'obtenir un modèle cellulaire de CPRC. Elle est RA positive.

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différents grades du score de Gleason, en accord avec l'ISUP, adapté de Epstein et al. (13) ..... 17
Figure 2 : Histoire « naturelle » du CaP en France en 2023, adapté de Carreira et al. (18) ..... 18
Figure 3 : Schéma résumant les différentes options thérapeutiques du cancer de prostate métastatique en France en 2023, adapté de Ploussard et al. (20). ..... 20
Figure 4 : Différences entre primitif et métastases de différents cancers (21). ..... 21
Figure 5 : Séquences ARN et protéique du récepteur aux androgènes (RA), adapté d'Aurilio et al. (26). ..... 22
Figure 6 : Résumé des modifications génétiques et épigénétiques conduisant à une plus grande agressivité du CaP, adapté de Kukkonen et al. (63) ..... 25
Figure 7 : Rapports entre la prostate et le tissu adipeux périprostatique (TAPP). ..... 26
Figure 8 : Mécanismes de biosynthèse des AGPI omégas 3 et omégas 6 (98) ..... 43
Figure 9 : Différence de méthylation du génome d'une cellule normale (ligne du haut) et d'une cellule cancéreuse (ligne du bas), adapté de Skvortsova et al. (108). ..... 45
Figure 10 : Exemples de modifications d'histone dans le CaP. ..... 50
Figure 11 : Les différents marqueurs qui ont pu être impliqué dans la TEM des cancers (170). ..... 54
Figure 12 : Résumé du protocole expérimental animal (adapté du schéma de l'équipe du Pr Rébillard) ..... 114
Figure 13 : Localisation des différents TA pour la souris, notamment du TA péri-épididymaire appelé « perigonadal » en anglais. (Adapté de Bartness et al. (228)) ..... 115
Figure 14 : Adipocytes isolés à partir de TA murin frais. ..... 116
Figure 15 : Représentation des différentes méthodes de co-culture testées. ..... 117
Figure 16 : Représentation de l'ensemble des chemins parcourus, centrés, pour un échantillon. Chaque couleur représente le suivi d'une cellule. ..... 119
Figure 17 : Représentation de la distance euclidienne maximale (A) et des distances cumulées totales (B) pour l'échantillon présenté figure 16. ..... 119
Figure 18 : Courbe des croissances tumorales des xénogreffes de TRAMP-C2 ..... 124
Figure 19 : Contenu en EPA (A) et en EDA (B) des TA péri-épididymaires murins, en fonction de leur régime alimentaire ..... 126
Figure 20 : Le TA enrichi en EPA diminue la prolifération des PC3 sans affecter leur capacité de migration. ..... 127
Figure 21 : Images de microscopie confocale de cellules PC3 après co-culture avec TA murin, de souris recevant un régime contrôle (A) ou un régime enrichi en EPA (B). ..... 128
Figure 22 : Taille (A) et quantité (B) de gouttelettes lipidiques dans les PC3 après co-culture avec le TA murin contrôle ou supplémenté en EPA. ..... 129
Figure 23 : Diminution de l'entrée calcique SOCE pour les cellules PC3 après co-culture avec le TA enrichi en EPA. ..... 130
Figure 24 : Effet des TA enrichis en EPA, en condition d'hypoxie, sur l'expression de CAIX, Zeb1 et MMP3, dans les cellules PC3 ..... 131
Figure 25 : Quantité de transcrits pour les 3 gènes d'intérêt de la TEM (A) identifiés via Cytoscape : MMP-3, Smad3, Zeb1. Même chose pour le gène TNFα (B) qui a été identifié dans l'apoptose et l'angiogenèse. ..... 132
Figure 26 : Expression de Zeb1 et MMP3 dans les xénogreffes. ..... 132
Figure 27 : Volcano plot selon la modulation de l'expression par l'EPA des différents gènes identifiés par RNA-seq ..... 159

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification clinique cTNM de 2016 (9) ..... 15
Tableau 2 : Classification pathologique pTNM de 2016 (AJCC 8ème édition) (9) ..... 16
Tableau 3 : Score ISUP 2016 : correspondance avec la classification antérieure de Gleason (9) ..... 16
Tableau 4 : Classification de d'Amico (9) ..... 17
Tableau 5 : Classification de Zumsteg, traduit de (14) ..... 17
Tableau 6 : Principaux gènes hyperméthylés dans le CaP, adapté de (104,112,113) ..... 46
Tableau 7 : Principaux gènes hypométhylés dans le CaP, adapté de (104,116) ..... 47
Tableau 8 : Modifications des histones dans le CaP, adapté de (104) ..... 49
Tableau 9 : Composition en acides gras des deux régimes (contrôle ou enrichi en EPA) ..... 114
Tableau 10 : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces pour les gènes analysés en qPCR ..... 123
Tableau 11 : Résumé du contenu en AG des TA péri-épididymaires murins, en fonction de leur régime alimentaire ..... 125
Tableau 12 : Liste des 10 gènes dont l'expression était le plus diminuée par l'EPA ..... 160
Tableau 13 : Liste des kératines dont l'expression était la plus modifiée par l'EPA ..... 160
Tableau 14 : Liste des 10 gènes dont l'expression était le plus augmentée par l'EPA ..... 161

# Table des matières

**REMERCIEMENTS** ..... **2**

**AVANT-PROPOS** ..... **4**

**RESUME** ..... **6**

**ABSTRACT** ..... **7**

**LISTE DES ABREVIATIONS** ..... **8**

**LISTE DES FIGURES** ..... **10**

**LISTE DES TABLEAUX** ..... **11**

**TABLE DES MATIERES** ..... **12**

**INTRODUCTION** ..... **14**

1. LE CANCER DE PROSTATE (CAP) ..... 14
*Physiopathologie* ..... *14*
*Diagnostic* ..... *14*
*Classifications pronostiques* ..... *15*
*Les différents stades du CaP et leur traitement* ..... *18*
2. FACTEURS D'AGRESSIVITE DU CAP LIES A LA MODIFICATION DES CELLULES TUMORALES SOUS LA PRESSION THERAPEUTIQUE ..... 22
*Le CPRC RA+ dépendant des androgènes* ..... *23*
*Le CPRC RA+ indépendant des androgènes* ..... *24*
*Le CPRC RA-, exprimant ou non les marqueurs neuroendocrines* ..... *24*
3. FACTEURS D'AGRESSIVITE DU CAP LIES AU MICRO-ENVIRONNEMENT, NOTAMMENT ADIPEUX ..... 26
*Sécrétions de facteurs solubles et cytokines par le micro-environnement tumoral* ..... *26*
*Sécrétions de facteurs solubles et lipidiques par le tissu adipeux (TA) environnant* ..... *27*
*Influence de ces différents acteurs du micro-environnement sur le CaP* ..... *28*
*Focus sur l'EPA, un AGPI clé dans la régulation de l'agressivité du CaP* ..... *43*
4. ROLE DE L'EPIGENETIQUE DANS L'AGRESSIVITE DU CAP ..... 45
*Méthylation de l'ADN* ..... *45*
*Influence de la méthylation sur l'agressivité du CaP* ..... *48*
*Modification des histones dans le CaP* ..... *49*
*Influence de ces modifications d'histone sur l'agressivité du CaP* ..... *50*
*Rôle des microARNs (miARNs) dans le CaP* ..... *52*
5. ROLE DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE (TEM) DANS L'AGRESSIVITE DU CAP ..... 54
*Définition de la TEM* ..... *54*
*Marqueurs impliqués dans la TEM du CaP* ..... *55*
*Focus sur Zeb1, facteur de transcription-clé de la TEM dans le CaP* ..... *56*
*Inducteurs de la TEM du CaP* ..... *57*
*Régulation épigénétique de la TEM dans le CaP* ..... *58*

**OBJECTIFS** ..... **60**

**PREMIERE PARTIE** ..... **61**

**CARACTERISTIQUES IMMUNOPHENOTYPIQUES DU CPNE, COMPARAISON ENTRE LES FORMES *DE NOVO* ET CELLES INDUITES PAR LA PRESSION THERAPEUTIQUE** ..... **61**

ARTICLE 1 ..... 64

**DEUXIEME PARTIE** ..... **72**

**ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DU TAPP SUR LES FACTEURS D'AGRESSIVITE DU CAP** ..... **72**

ARTICLE 2 ..... 74

**TROISIEME PARTIE** ..... **111**

**EFFET DE L'EPA SUR LA CROISSANCE TUMORALE DANS UN MODELE MURIN DE CAP** ..... **111**

**DISCUSSION** ..... **133**

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 141**
**BIBLIOGRAPHIE ..... 143**
**ANNEXE 1 : ANALYSES DU RNA-SEQ ..... 159**
**ANNEXE 2 : ANALYSES COMPLEMENTAIRES DU RNA-SEQ PAR CYTOSCAPE ..... 162**

# Introduction

## 1. Le cancer de prostate (CaP)

Le CaP est le cancer non cutané le plus fréquent au monde dans la population masculine et une des principales causes de décès par cancer dans les pays occidentaux (1).

### Physiopathologie

#### Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque de CaP sont : l'âge, les antécédents familiaux au 1er degré de CaP, l'origine Antillaise ou Afro-Américaine, des facteurs génétiques comme une mutation familiale du gène *BRCA2* (« Breast Cancer 2 », qui est un gène suppresseur de tumeur).

En effet, l'incidence du CaP augmente avec l'âge, et la majorité des cancers (70% environ) sont diagnostiqués après 65 ans. Alors que le CaP concerne 1 à 7% des hommes de 50 à 64 ans, en France, son incidence augmente jusqu'à toucher 50% des hommes de plus de 80 ans.

Les formes familiales de CaP représentent environ 20% des cas de CaP. Une origine héréditaire du CaP est alors suspectée. La forme héréditaire monogénique la plus fréquemment décrite dans le CaP est liée à une mutation germinale du gène *BRCA2* (2,3).

L'incidence et le taux de mortalité du CaP chez les personnes d'origine Antillaise ou Afro-américaine sont supérieurs aux populations caucasiennes (4). Des prédispositions génétiques peuvent expliquer cette surincidence et surmortalité constatées dans ce groupe ethnique, comme la suractivation du proto-oncogène *MYC* (5), ou la plus grande fréquence de polymorphismes du gène du récepteur aux androgènes (*RA*) qui joue un rôle primordial dans la physiologie du CaP (6), ou encore la présence de polymorphismes des gènes *Bcl2* et *EphB2*, altérant leur fonction de suppresseurs de tumeur (7,8).

L'obésité et le syndrome métabolique ont été décrits comme des facteurs de risque de CaP, le syndrome métabolique étant défini par l'association d'au moins trois des cinq critères suivants : périmètre abdominal augmenté, triglycérides élevés, HDL-cholestérol bas, pression artérielle élévée, et glycémie à jeun > 1 g/L (9).

D'autres facteurs de risque environnementaux ont également été suggérés, incluant certains polluants comme la chlordécone (9), ainsi que des facteurs liés à l'alimentation, tels que des régimes alimentaires riches en phosphore, ou encore en produits laitiers (et donc en calcium) (10–12).

### Diagnostic

Le diagnostic de CaP se fait par l'analyse anatomopathologique de biopsies de prostate. Néanmoins ce sont des arguments clinico-biologiques qui vont orienter le clinicien vers une suspicion de cancer : un toucher rectal anormal à l'examen clinique et/ou un dosage de PSA (antigène spécifique de la prostate) sanguin élevés, supérieur à 4 ng/ml. Il sera alors réalisé une IRM prostatique et pelvienne, multiparamétrique, à la recherche d'arguments pour un CaP et notamment d'au moins une cible à biopsier.

### Biopsies prostatiques

Les biopsies prostatiques permettent de poser le diagnostic de CaP. Elles sont donc réalisées de façon systématisée, et doivent faire l'objet d'au moins 12 prélèvements répartis dans tout le parenchyme prostatique (2 à l'apex, 2 en médian, 2 à la base, pour chaque lobe prostatique). Il pourra être de plus réalisé des biopsies ciblées, en cas de cible sur l'IRM.

## Classifications pronostiques

### Classifications TNM

Afin d'évaluer le pronostic d'un CaP qui vient d'être diagnostiqué, on côte chaque CaP selon la TNM. T caractérise l'atteinte au niveau de la prostate, N l'atteinte au niveau ganglionnaire et M la présence ou non de métastases à distance. Cette classification est dite « clinique », ou classification cTNM, quand elle est réalisée sur les arguments du toucher rectal et de l'IRM. Le détail en est disponible au tableau 1.

Par la suite, en cas de prise en charge chirurgicale, on reclasse la tumeur à l'aide de la classification pTNM, sur analyse anatomo-pathologique de la pièce de prostatectomie totale. Les détails pour chaque stade sont disponibles au tableau 2.

Tableau 1 : Classification clinique cTNM de 2016 (9)

| | |
|---|---|
| T<br>Tumeur primitive | T0 : tumeur primitive non retrouvée |
| | T1 : tumeur ni palpable au toucher rectal, ni visible en imagerie<br>• T1a : tumeur occupant < 5% du tissu réséqué, de score ISUP 1, de grade < 4<br>• T1b : tumeur occupant ≥ 5% du tissu réséqué OU ISUP ≥ 2 OU grade ≥ 4<br>• T1c : tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'un PSA élevé |
| | T2 : tumeur limitée à la prostate<br>• T2a : tumeur atteignant ≤ la moitié d'un lobe<br>• T2b : tumeur atteignant > la moitié d'un lobe, sans atteindre l'autre lobe<br>• T2c : tumeur atteignant les 2 lobes |
| | T3 : extension de la tumeur au-delà de la prostate<br>• T3a : extension extra-prostatique<br>• T3b : atteinte d'au moins une vésicule séminale |
| | T4 : tumeur fixée OU atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle élévateur de l'anus, paroi pelvienne) |
| N<br>Ganglions régionaux | Nx : ganglions régionaux non évalués |
| | N0 : absence de métastase ganglionnaire régionale |
| | N1 : atteinte ganglionnaire régionale |
| | N1mi : métastase ganglionnaire ≤ 0,2 cm (optionnel) |
| M<br>Métastase à distance | Mx : métastases à distance non évaluées |
| | M0 : absence de métastase à distance |
| | M1 : métastase à distance<br>• M1a : atteinte des ganglions non régionaux<br>• M1b : atteinte osseuse<br>• M1c : autre sites avec ou sans atteinte osseuse |

Tableau 2 : Classification pathologique pTNM de 2016 (AJCC 8ème édition) (9)

| |
|---|
| pT0 : absence de tumeur identifiée après prostatectomie totale |
| pT2 : tumeur limitée à la prostate |
| pT3 : tumeur dépassant les limites de la prostate<br>• pT3a : extension extraprostatique pouvant inclure le col vésical<br>• pT3b : extension à au moins une vésicule séminale |
| pT4 : extension à d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle élévateur de l'anus, paroi pelvienne) |
| R : reliquat tumoral post-opératoire OU limites d'exérèse chirurgicales<br>• Rx : marges non évaluées<br>• R0 : marges négatives<br>• R1 : marges positives |

A noter qu'il n'existe pas de stade pT1.

**Classification histo-pronostique : score ISUP**

Lors de l'analyse anatomo-pathologique, il est réalisé une gradation de l'agressivité du CaP en fonction de critères morphologiques et architecturaux des cellules tumorales, afin d'en déterminer le score histo-pronostic dit « score ISUP » (car établi par l'International Society of Urological Pathology), résumé en tableau 3. Ce score est une évolution du score histo-pronostic historique dit « score de Gleason » qui additionnait le grade du contingent tumoral majoritaire et le grade du contingent tumoral le plus agressif. Il est illustré sur la figure 1.

Tableau 3 : Score ISUP 2016 : correspondance avec la classification antérieure de Gleason (9)

| | |
|---|---|
| Groupe 1 | Score de Gleason 6 (3+3) |
| Groupe 2 | Score de Gleason 7 (3+4) |
| Groupe 3 | Score de Gleason 7 (4+3) |
| Groupe 4 | Score de Gleason 8 (que ce soit 4+4, 3+5 ou 5+3) |
| Groupe 5 | Score de Gleason 9 ou 10 |

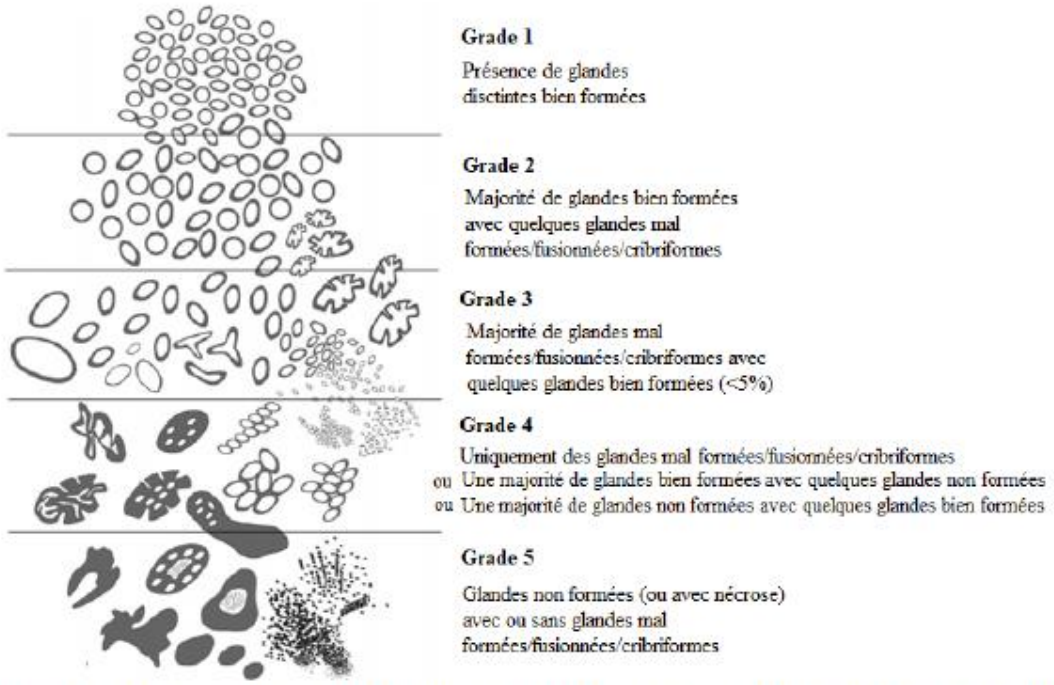



Figure 1 : Représentation schématique des différents grades du score de Gleason, en accord avec l'ISUP, *adapté de Epstein et al. (13)*

**Classification de d'Amico**

Une troisième et dernière classification pronostique est utilisée en pratique clinique courante. Il s'agit de la classification de d'Amico, qui prend en compte des arguments clinique (stade cT), biologique (dosage du PSA) et anatomo-pathologique (score ISUP sur la biopsie diagnostique). Ce score permet d'évaluer le niveau de risque de récidive après traitement d'un CaP localisé et de le classer en faible, intermédiaire ou élevé. Selon le niveau de risque, le clinicien sera orienté sur le bilan d'extension à réaliser à la recherche d'une éventuelle atteinte métastatique et surtout sur la prise en charge thérapeutique à proposer au patient. La classification de d'Amico est résumée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Classification de d'Amico (9)

| | |
|---|---|
| Faible risque | PSA ≤ 10 ng/ml ET score ISUP 1 ET stade cT1c ou cT2a |
| Risque intermédiaire | PSA entre 10 et 20 ng/ml OU score ISUP 2 ou 3 OU stade cT2b |
| Risque élevé | PSA > 20 ng/ml OU score ISUP ≥ 4 OU stade ≥ cT2c |

Le groupe de risque intermédiaire étant très hétérogène en termes de pronostic, il a été proposé en 2013 par Zumsteg, d'affiner la classification en formant un groupe de risque intermédiaire favorable et un groupe de risque intermédiaire défavorable (14). Ces sous-groupes sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Classification de Zumsteg, traduit de (14)

| | |
|---|---|
| Risque intermédiaire favorable | Un seul critère du groupe intermédiaire<br>avec < 50% d'envahissement tumoral sur les biopsies de prostate diagnostiques ET de score ISUP ≤ 2 |
| Risque intermédiaire défavorable | Tous les autres patients à risque intermédiaire |

### Les différents stades du CaP et leur traitement

Le CaP peut être diagnostiqué à un stade localisé ou métastatique. La forme la plus fréquente de CaP est l'adénocarcinome (acinaire le plus souvent, plus rarement ductal). Initialement, cette forme de CaP est toujours hormonosensible, les cellules cancéreuses exprimant le RA. En cas de maladie métastatique (initiale ou à la récidive), cette hormono-sensibilité évoluera vers une résistance à la castration, notamment sous l'effet de la pression thérapeutique. Le CaP métastatique et résistant à la castration (CPMRC) est le dernier stade de la maladie, et son pronostic est sombre avec une médiane de survie globale qui reste à ce jour inférieure à deux ans (15–17).

Chaque phase du CaP relève de prises en charges différentes. La figure 2 résume l'histoire « naturelle » classique de la prise en charge du CaP.

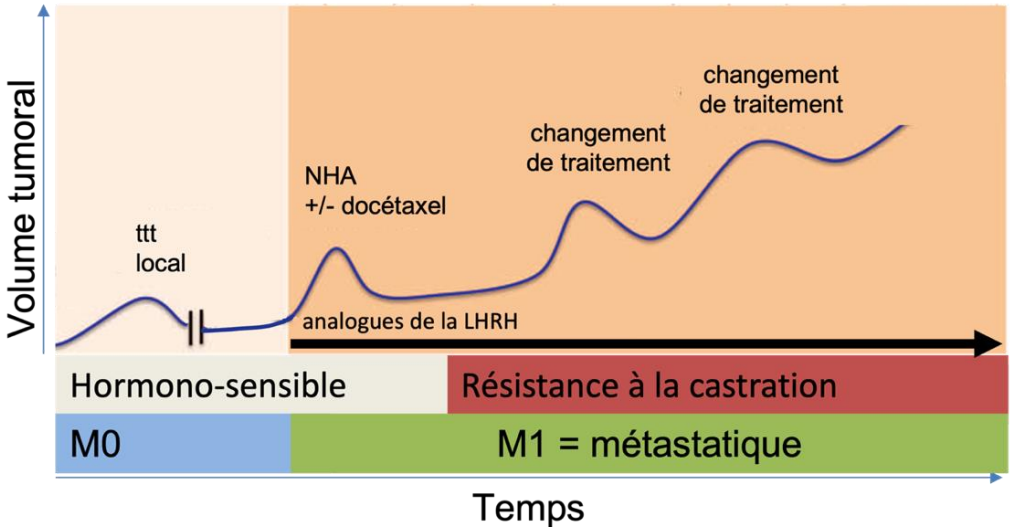



Figure 2 : Histoire « naturelle » du CaP en France en 2023, *adapté de Carreira et al. (18)*
*Abréviations : LHRH : hormone de libération de la lutéinostimuline ; M0 : stade non métastatique ; NHA : « novel hormonal agent », cet acronyme désigne les hormonothérapies de nouvelle génération*

#### Cancer non métastatique

Au stade localisé, le CaP étant une maladie très hétérogène, le choix du traitement se fait notamment en fonction du score pronostic de d'Amico résumé en tableau 4.

Il existe en pratique quatre principales options de traitement : la surveillance active, la curiethérapie, la chirurgie qui consiste alors en une prostatectomie totale ou la radiothérapie externe (cette dernière pouvant éventuellement être associée à une suppression androgénique transitoire).

La surveillance active s'adresse aux patients pour lesquels on estime leur espérance de vie à plus de 10 ans. Son objectif est de retarder la réalisation du traitement curatif de plusieurs années, afin d'éviter au patient la morbidité du traitement durant ce temps de surveillance, tout en veillant à ne pas diminuer son espérance de vie. Cette prise en charge consiste à réaliser des contrôles réguliers du taux de PSA, du toucher rectal, avec examens IRM et séries de biopsies prostatiques.

En cas d'aggravation de la pathologie, notamment sur les résultats anatomo-pathologiques des biopsies, un traitement actif viendra mettre fin à la surveillance active.

En résumé, si le CaP est classé à faible risque de récidive selon la classification de d'Amico, le traitement de référence est aujourd'hui la surveillance active. Mais les quatre options thérapeutiques sont envisageables, notamment en fonction des critères cliniques et des souhaits du patient. En cas de traitement par radiothérapie, cette dernière serait réalisée sans adjonction d'une suppression androgénique.

Si le CaP est classé à risque intermédiaire, il est alors recommandé de proposer un traitement chirurgical ou une radiothérapie externe. Si le CaP est classé intermédiaire défavorable, il est alors recommandé d'associer une suppression androgénique pendant six mois en cas de traitement par radiothérapie. Une dernière option peut être un traitement par curiethérapie en cas de CaP classé intermédiaire favorable.

Si le CaP est classé à haut risque, le standard de traitement est une radiothérapie externe associée à une suppression androgénique plus prolongée (qui peut aller d'un an et demi à trois ans). Les dernières études sur le sujet sont également en faveur de l'ajout d'une hormonothérapie de nouvelle génération par acétate d'abiratérone pendant deux ans, si le CaP présente au moins deux critères de mauvais pronostic sur trois, parmi : score ISUP $\geq 4$, PSA > 40 ng/ml, ou stade clinique $\geq$ T3 (19). D'autres essais cliniques sont en cours avec d'autres hormonothérapies de nouvelle génération (apalutamide notamment).
Pour les CaP de haut risque, la chirurgie reste une option possible dans le cadre d'une approche multimodale, c'est-à-dire qu'elle sera suivie d'une radiothérapie externe, dans un délai qui dépendra de l'évolution du PSA.

**Cancer métastatique :**

Dans le cas d'un cancer métastatique, de multiples classes thérapeutiques sont maintenant disponibles. Le traitement repose sur une suppression androgénique dans tous les cas, qui sera à poursuivre au long cours sans interruption.
Les autres molécules disponibles actuellement en France sont :

- Les hormonothérapies de nouvelle génération : un inhibiteur de la synthèse des androgènes ciblant le CYP17A1 (c'est-à-dire l'acétate d'abiratérone) et différents inhibiteurs du RA qui sont : l'enzalutamide, l'apalutamide et le darolutamide.
- Les chimiothérapies : principalement deux molécules de la famille des taxanes qui sont le docétaxel et le cabazitaxel.
- La radiothérapie interne vectorisée : le lutétium PSMA (antigène membranaire spécifique de la prostate).
- Et les inhibiteurs de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) : olaparib, niraparib, rucaparib.

Ces molécules ont des indications différentes dans le CaP métastatique, selon son stade d'évolution (résistant à la castration ou non), les traitements antérieurement administrés ou la détection d'altérations moléculaires comme une mutation du gène *BRCA2*.
Les séquences de traitement possibles sont résumées dans la figure 3.

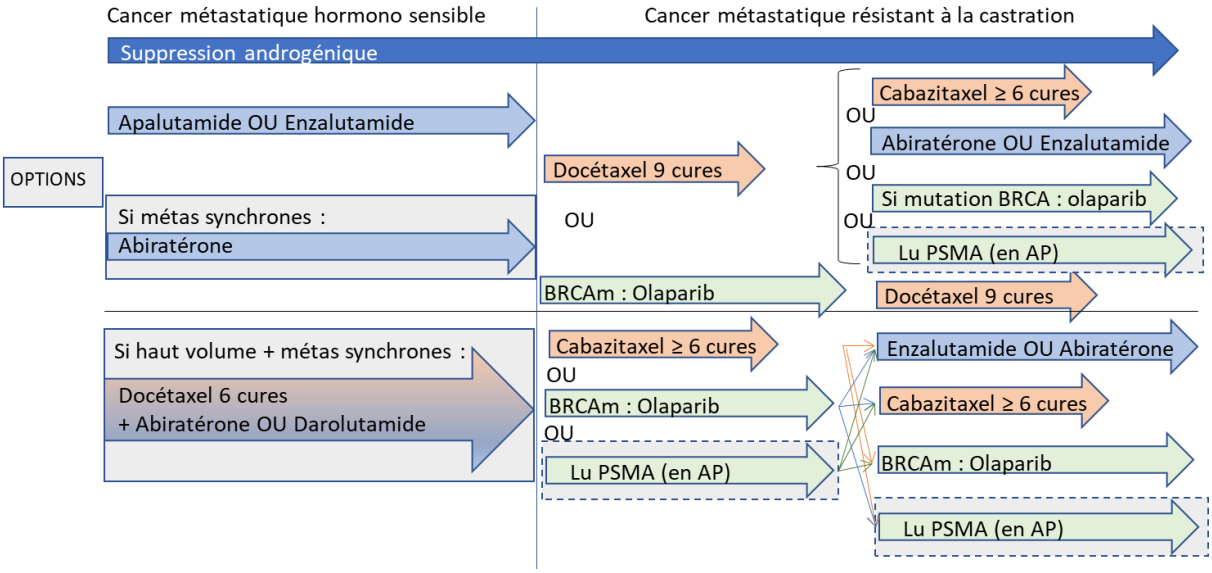



Figure 3 : Schéma résumant les différentes options thérapeutiques du cancer de prostate métastatique en France en 2023, *adapté de Ploussard et al. (20).*
*Abréviations : AP : procédure d'accès précoce (médicament n'ayant pas encore d'autorisation de mise sur le marché) ; BRCAm : mutation d'un gène BRCA (BRCA1 ou BRCA2) ; LuPSMA : Lutétium PSMA.*

Le CaP métastatique est une entité très hétérogène. Outre le stade de la maladie (hormono-sensible ou résistant à la castration), différents facteurs pronostiques sont pris en compte en pratique clinique courante : le fait de présenter des métastases synchrones (dès le diagnostic) ou métachrones (apparition de métastases alors que la maladie a déjà été traitée au stade non métastatique), le nombre des métastases, la localisation des métastases (ganglionnaires, osseuses, pulmonaires, autres localisations viscérales). L'oncologue peut également être amené à prendre en compte d'autres facteurs pronostics comme le score ISUP de la tumeur primitive ou son type histologique (adénocarcinome ou carcinome neuroendocrine). Enfin les inhibiteurs de PARP ont montré leur intérêt principalement dans les CaP portant une altération de *BRCA2* ou *BRCA1*.

Sur le plan biologique, il a d'ailleurs été montré que le CaP, par rapport à d'autres types de cancers, est celui qui développe le plus de modifications biologiques au cours de sa progression (stade métastatique comparativement au stade localisé sans traitement) (figure 4) (21).

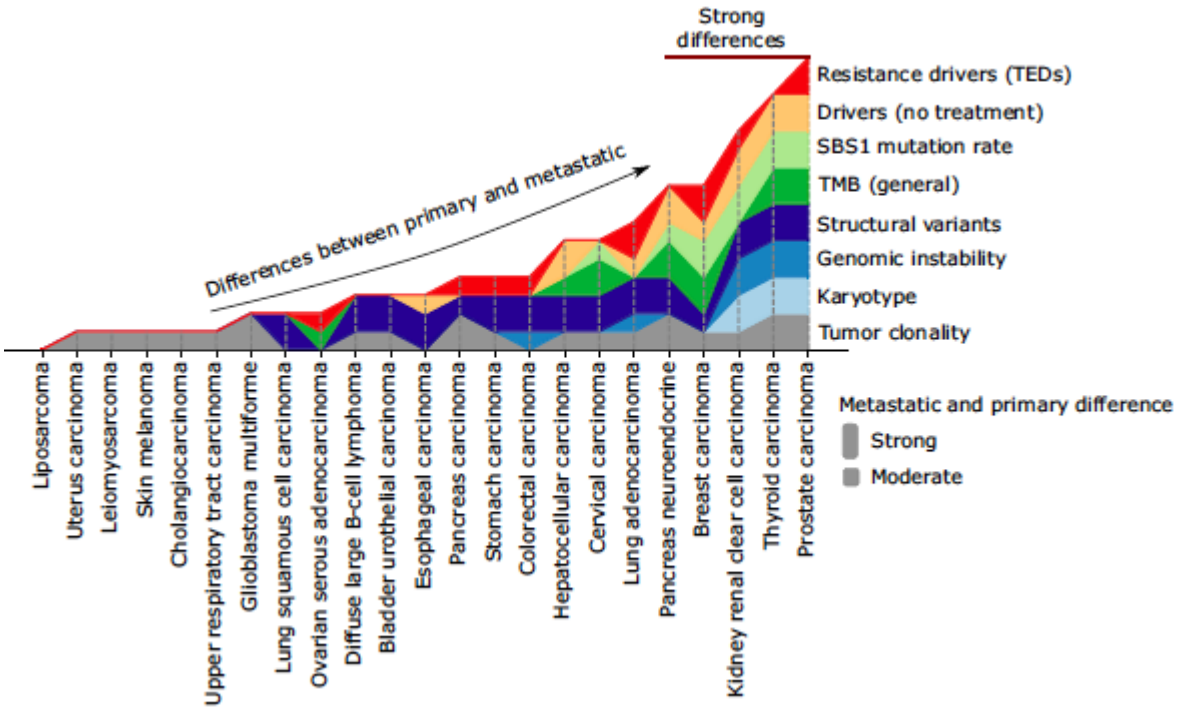



Figure 4 : Différences entre primitif et métastases de différents cancers (21).

*On observe que le CaP est le seul cancer pour lequel on retrouve l'ensemble des modifications biologiques qui ont pu être relevées.*

*Abréviations : SBS = single base substitution ; SBS1 est une signature mutationnelle précédemment établie ; TED = drivers induits par les traitements ; TMB = charge mutationnelle tumorale.*

## 2. Facteurs d'agressivité du CaP liés à la modification des cellules tumorales sous la pression thérapeutique

Le CaP métastatique évolue immanquablement vers une forme résistante à la castration (CPRC) sous la pression thérapeutique due à la suppression androgénique. Le principal acteur impliqué dans ce phénomène de résistance est le RA, notamment *via* un mécanisme de surexpression (ou amplification génomique) (21).

Le gène du *RA* se situe sur le chromosome X, en position q11-q12. Le RA est un récepteur formé de 3 principaux domaines fonctionnels : NTD, DBD et LBD (figure 5) (22). NTD est le domaine N-terminal (amine terminal), il contient notamment AF1 qui est impliqué dans l'activation de la transcription. DBD est un domaine de liaison à l'ADN (en anglais « DNA binding domain »). Enfin LBD est le domaine carboxy-terminal (C-terminal) qui a le rôle de lier le ligand (en anglais « ligand binding domain »). Entre les deux derniers domaines, se trouve NLS (en anglais « nuclear localization signal ») qui est chargé de la translocation du RA vers le noyau. Le RA se transloque dans le noyau une fois qu'il est activé par son ligand, la dihydrotestostérone (DHT) (23). Il se dimérise, *via* le domaine DBD, et se fixe alors à l'ADN. C'est un facteur de transcription qui induit ou réprime l'expression de ses multiples gènes cibles (de l'ordre de 1700 gènes identifiés), exerçant diverses fonctions dans : le métabolisme, la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le développement et la régulation du système endocrinien ou immun (24,25). Le RA agit en se fixant à la chromatine au niveau de séquences appelées « éléments de réponse aux androgènes » (ARE).

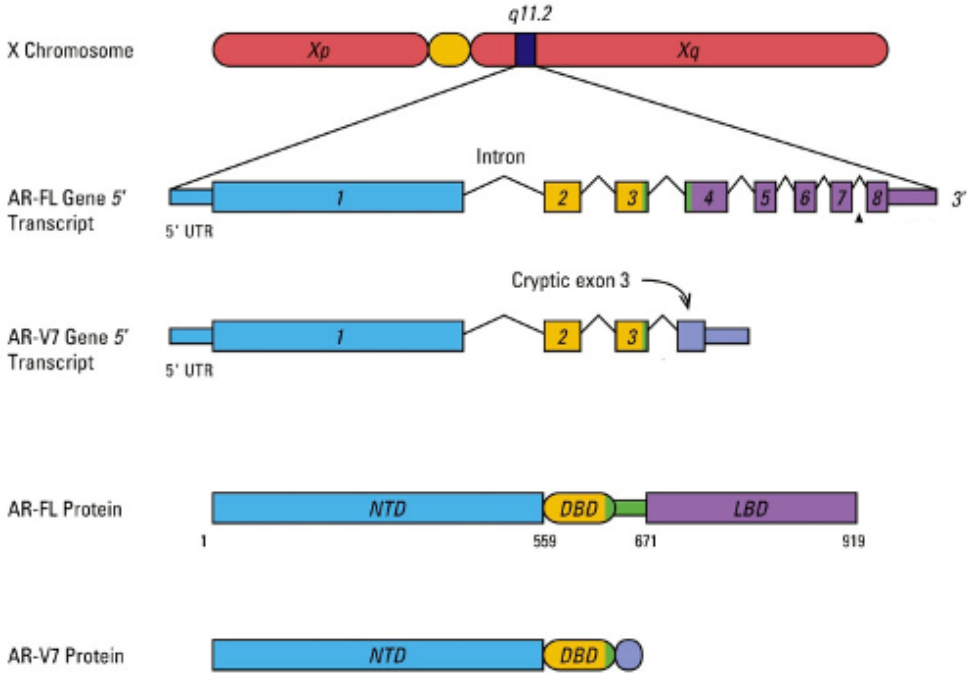



Figure 5 : Séquences ARN et protéique du récepteur aux androgènes (RA), *adapté d'Aurilio et al. (26).*

*Les positions des peptides sont notées conformément aux séquences du « GRCh36/hg18 human genome » (dessin non à l'échelle).*

*Abréviations : AR-FL : RA de taille entière ; DBD : domaine liant à l'ADN ; LBD : domaine liant au ligand ; NTD : domaine N-terminal ; UTR : région non traduite.*

De la même façon, les hormonothérapies de nouvelle génération favorisent l'apparition de formes résistantes du CaP du fait de la pression thérapeutique. Ces mécanismes de résistance sont liés à la restauration de la voie de signalisation du RA par l'apparition de mutations ou de variants d'épissage du *RA* le rendant constitutionnellement actif, ou encore par l'augmentation de la biosynthèse d'androgènes (23).

## Le CPRC RA+ dépendant des androgènes

### Amplification génomique du RA

Sous la pression thérapeutique due à la suppression androgénique, la surexpression du RA est le principal responsable de l'apparition de la résistance à la castration (27–29). Ce mécanisme permet de restaurer la croissance tumorale malgré un environnement pauvre en androgènes. C'est d'ailleurs à cause du constat de cette suractivation de la voie des androgènes, que la recherche s'est penchée sur le développement d'inhibiteurs du RA hautement sélectifs, dans le but de contrer ce mécanisme de résistance. En effet, il a par exemple été développé l'enzalutamide, qui présente une affinité pour le RA 5 à 8 fois plus importante que le bicalutamide, et a également pour rôle d'empêcher la translocation du RA dans le noyau (30). Ainsi cette hormonothérapie de nouvelle génération a démontré son efficacité (même si elle reste transitoire) en cas de CPMRC, et notamment pour contrer la surexpression du RA.

### Mutations activatrices du RA

Ce sont des mutations qui entrainent un gain de fonction du RA ou une diminution de spécificité du ligand du RA. Elles sont généralement observées au niveau du LBD (31–33). Il a été identifié 4 mutants principaux (L702H, W742C, H875Y et T878A) qui concernent 15 à 20% des mécanismes de résistance impliqués dans le CPMRC. Chez les mutants T878A et H875Y, on constate que les anti-androgènes activent le RA au lieu de l'inhiber comme attendu (31). La mutation W742C semble augmenter l'activité transcriptionnelle du RA en présence d'anti-androgènes (34). Enfin la mutation L702H semble permettre à d'autres hormones d'être ligand du RA, notamment les glucocorticoïdes (35).

### Variants d'épissage du RA

Ces variants ont tous une perte complète ou incomplète du domaine LBD, alors qu'ils conservent tous leurs domaines NTD et DBD (23). Pour être actifs, il est en général nécessaire que ces variants restent capables de se transloquer dans le noyau, ce qui n'est pas le cas de la majorité des variants d'épissage identifiés.

Le variant du RA le plus fréquemment identifié est le variant ARV7 (ou AR3), qui forme un récepteur constitutionnellement actif qui se transloque dans le noyau de la cellule, bien qu'il ait perdu une partie de son domaine NLS (23,36,37). Son expression est corrélée à la résistance aux hormonothérapies de nouvelle génération (38,39). Ce variant semble émerger sous la pression thérapeutique des anti-androgènes. En plus d'être constitutionnellement actif, il semblerait qu'il ne soit plus en mesure d'exercer l'activité répressive du RA sur un ensemble de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse, participant à une plus grande agressivité du CaP (40,41).

#### Augmentation de la biosynthèse des androgènes et synthèse *de novo*

Sous traitement hormonal (suppression androgénique, hormonothérapies de nouvelle génération), plusieurs études ont montré une réactivation de l'activité du RA liée à une augmentation de la synthèse intra tumorale des androgènes (testostérone, DHT) à partir des faibles taux résiduels d'androgènes surrénaliens (déhydro-épi-androstérone (DHEA) et d'androstènedione (AD)) et/ou à partir de cholestérol (23,42–46). Ce mécanisme de synthèse intra tumorale a lieu, notamment *via* la surexpression d'« aldo-keto-reductase family 1, member C3 » (AKR1C3) qui permet de convertir l'AD en testostérone (47,48). Il existe d'ailleurs des données pré-cliniques d'efficacité d'un traitement combiné enzalutamide et inhibiteur d'AKR1C3 *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* sur des modèles de xénogreffes (49).

### Le CPRC RA+ indépendant des androgènes

Un autre type de mécanisme de résistance consiste à contourner le RA en faisant reposer l'activité transcriptionnelle sur le récepteur aux glucocorticoïdes. Le récepteur aux glucocorticoïdes présente plusieurs cibles transcriptionnelles communes avec le RA (50–52). Il a été observé une augmentation de l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes sous la pression thérapeutique liée à la suppression androgénique et/ou aux hormonothérapies de nouvelle génération (53,54). Ce mécanisme de résistance a également été observé sur plusieurs modèles de lignées cellulaires de CaP traitées par une hormonothérapie de nouvelle génération (52,55). Il semblerait de plus que ce mécanisme de relai soit réversible en cas d'arrêt de l'inhibition du RA.

### Le CPRC RA-, exprimant ou non les marqueurs neuroendocrines

#### Le cancer de prostate double négatif (RA- et NE-)

Le CPRC peut même perdre totalement l'expression du RA, en général au profit de marqueurs neuroendocrines (NE) (23), même s'il existe également des CPRC qui ont perdu l'expression du RA et n'expriment pas non plus les marqueurs NE. Cette dernière entité est d'ailleurs appelée cancer de prostate double négatif (56,57). Ce sous-groupe ayant la survie globale la plus courte, c'est la forme la plus agressive de CPMRC. Il se distingue par un profil moléculaire différent des autres formes de CPRC, avec notamment la présence d'une amplification du remodeleur de la chromatine CHD7, et une perte de PTEN (« Phosphatase and TENsin homolog », gène ayant un rôle de suppresseur de tumeur, en participant à la régulation du cycle cellulaire) (56). Ce cancer de prostate double négatif reste néanmoins relativement exceptionnel, les analyses de tissus tumoraux de CPMRC montrent plutôt des tumeurs mixtes avec un contingent conservant une expression du RA et un contingent qui ne l'exprime pas.

#### Le cancer de prostate neuroendocrine (RA- et NE+)

Le cancer de prostate neuroendocrine (CPNE) est une forme agressive de CaP, qui peut s'observer soit sous une forme dite « pure » qui ne présente que des petites cellules typiques de carcinome NE, soit sous une forme dite « mixte » avec des contingents de cellules tumorales NE et des contingents d'adénocarcinome. Le diagnostic de CPNE se fait à l'aide de marquages en immunohistochimie (IHC) sur le prélèvement tumoral, qui sont alors positifs

pour la chromogranine A et/ou la synaptophysine et/ou le CD56 (58,59). En général, on observe également une perte d'expression du RA. D'ailleurs le PSA est globalement bas dans le CPNE (< 2 ng/ml au diagnostic) (60). De plus, plus le PSA est bas et pire est le pronostic (59,61). De la même façon, le CPNE exprime également peu le PSMA (62). Enfin, sur le plan clinique, ce sont des cancers qui sont aussi fréquemment pourvoyeurs de métastases viscérales (tout siège métastatique autre que ganglionnaire ou osseux), contrairement aux adénocarcinomes de prostate (60).
Il existe des formes *de novo* mais une grande partie des cas est secondaire à la pression thérapeutique due à la suppression androgénique et/ou l'administration d'hormonothérapie de nouvelle génération (acétate d'abiratérone ou inhibiteurs du RA), qui entrainerait un processus de transdifférenciation.
Globalement le pronostic des formes NE est plus sombre que celui de l'adénocarcinome de prostate, et il est également plus sombre en cas de CPNE *de novo* comparé aux formes induites par la pression thérapeutique (60). Cela justifie aussi, dans les formes métastatiques, d'un traitement de chimiothérapie différent des standards habituels, avec une bithérapie contenant un sel de platine. Cette stratégie thérapeutique reste toutefois d'une efficacité limitée, avec une survie sans progression médiane autour de 4 mois (60). A noter que dans la série de Conteduca *et al.*, la classe thérapeutique qui présentait la plus longue survie sans progression radiologique pour les CPNE *de novo* était celle des hormonothérapies de nouvelle génération (presque 8 mois, contre moins de 4 mois pour les chimiothérapies) (60).

Les différents mécanismes de résistance se développant sous la pression thérapeutique et conduisant à un CaP plus agressif sont résumés dans la figure 6.

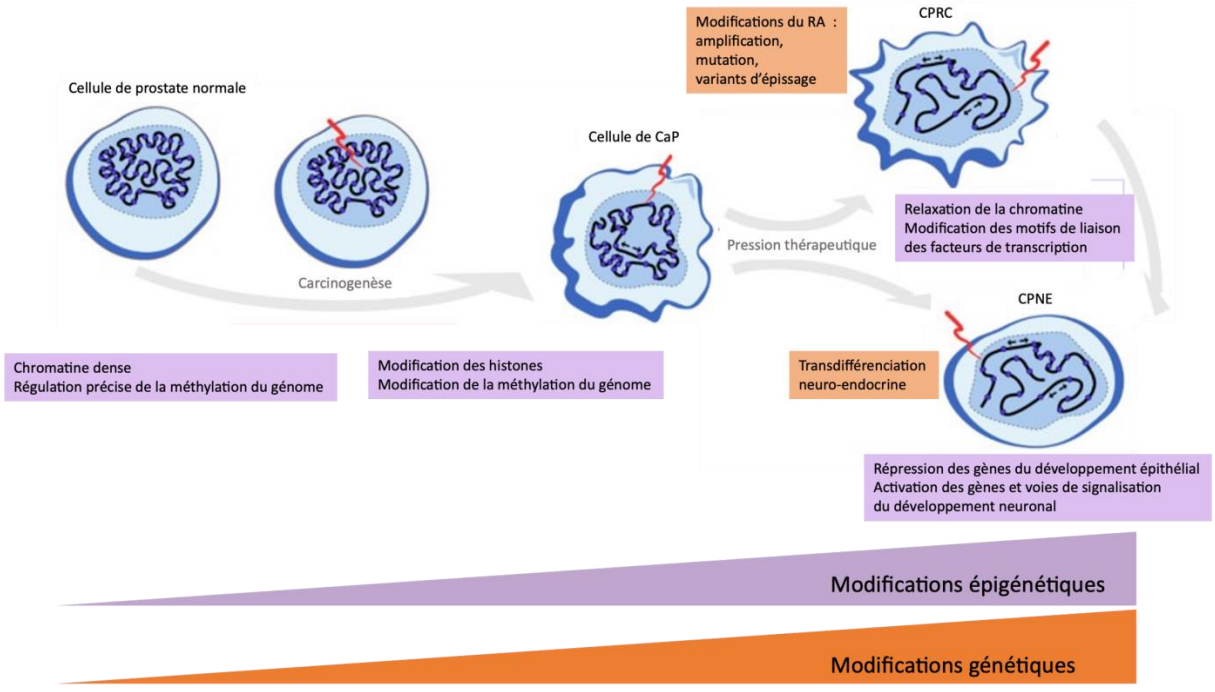


Figure 6 : Résumé des modifications génétiques et épigénétiques conduisant à une plus grande agressivité du CaP, *adapté de Kukkonen et al. (63)*

## 3. Facteurs d'agressivité du CaP liés au micro-environnement, notamment adipeux

La prostate est une glande délimitée par une membrane fibro-musculaire appelée capsule, qui est elle-même entourée du tissu adipeux périprostatique (TAPP). Lors de la progression du cancer, alors qu'il débute au sein de la glande prostatique (stade pT2), il va venir traverser la capsule (stade pT3 voir pT4) et se retrouver au contact du TAPP, confère figure 7.

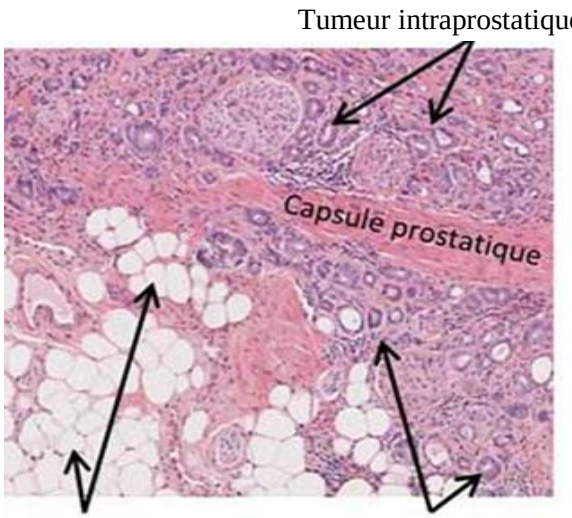



Figure 7 : Rapports entre la prostate et le tissu adipeux périprostatique (TAPP).
*Quand les cellules tumorales franchissent la capsule (stade pT3), elles arrivent en contact avec les adipocytes du TAPP.*

### Sécrétions de facteurs solubles et cytokines par le micro-environnement tumoral

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont un des principaux types cellulaires sécrétant des facteurs régulant l'agressivité des cellules cancéreuses. Ils sont principalement issus des fibroblastes proches de la tumeur (64,65). Mais il semblerait qu'ils puissent aussi dériver de cellules souches mésenchymateuses dérivant de la moelle osseuse ou d'adipocytes (66–72). Ces CAF vont alors produire des protéines de la matrice extracellulaire de façon renforcée, ce qui va conduire à l'activation de différentes voies de signalisation oncogéniques pour les cellules cancéreuses (73). En effet, la production accentuée de matrice extra-cellulaire entraîne une plus grande rigidité de cette dernière, ce qui a de multiples conséquences comme celle de favoriser un environnement hypoxique ou ralentir la diffusion des molécules de chimiothérapie (67). D'un autre côté, en produisant des métalloprotéinases de matrice (MMPs), comme MMP-2, MMP-3 et MMP-9, les CAFs sont capables de dégrader la matrice extra-cellulaire, et donc de la remodeler, ce qui va alors favoriser la dissémination tumorale (74). Ils sont de plus responsables de la sécrétion de facteurs de croissance comme HGF (hepatic growth factor), IGF (insulin-like growth factor), NGF (nerve growth factor), Wnt1, EGF (epidermal growth factor), FGF2 (fibroblast growth factor 2) (74). Enfin ils sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires : les interleukines 1, 6 et 8, TNFα (tumor necrosis factor α), ainsi que MCP1 (chemokine monocyte chemotactic protein 1) (74).

Différentes cellules de l'immunité participent aussi à la sécrétion de différents facteurs solubles. Il s'agit des lymphocytes T régulateurs, des macrophages associés au cancer, des polynucléaires neutrophiles, des cellules myéloïdes suppressives (75). Les cellules myéloïdes suppressives peuvent être de deux types : monocytaire ou polymorphonucléaire (76). Les cellules myéloïdes suppressives de type monocytaires sécrètent un niveau élevé de NO (monoxyde d'azote). Elles induisent aussi la différentiation des lymphocytes T régulateurs en produisant des cytokines comme l'interleukine 10 et le TGF-β (tumor growth factor β) (76–78).

### Sécrétions de facteurs solubles et lipidiques par le tissu adipeux (TA) environnant

Enfin, dans le cadre du CaP, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle du TAPP dans la sécrétion de facteurs solubles et lipidiques. Le TA est principalement composé d'adipocytes, un type cellulaire constitué d'une grande vacuole lipidique contenant principalement des triglycérides (79). Ces adipocytes peuvent stocker des lipides ou au contraire les libérer dans leur environnement par lipolyse, ils libèrent notamment des acides gras (AG) libres (80). Dans le cas d'un cancer, les adipocytes peuvent interagir avec les cellules cancéreuses, c'est ce qu'on appelle les « **adipocytes associés au cancer** ». Ces adipocytes sont de taille plus petite que les adipocytes « standards » et contiennent moins de lipides (81). Il a été décrit qu'ils sécrétaient des adipokines et des hormones qui participent à l'agressivité du CaP (81–83). Les adipokines sont des cytokines qui peuvent notamment avoir une fonction de chimiokine ou encore de médiateur de l'inflammation. Les hormones sécrétées par le TAPP sont principalement des stéroïdes, notamment des androgènes, mais aussi des estrogènes (issus notamment des androgènes *via* l'action de l'aromatase), la leptine et l'adiponectine (84,85). Les principales adipokines sécrétées par le TAPP ont un phénotype pro-inflammatoire : l'interleukine-6 (IL-6), l'HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), et les chimiokines CCL7, CXCL12 et MMP-9 (79,81,85–87). Ces différents facteurs jouent globalement un rôle promoteur dans le progression et l'agressivité du CaP, à l'exception de l'adiponectine qui exerce pour sa part une action anti-tumorale (81–83,85,88,89).

Les AG sécrétés par les adipocytes associés au cancer peuvent jouer un rôle pro- ou anti-tumoral. Les AG saturés ont plutôt un effet pro-tumoral, tout comme les AG poly-insaturés (AGPI) de type omégas 6. Par exemple, *in vitro*, les cellules PC3 ont montré de plus grandes capacités d'invasion lorsqu'elles étaient supplémentées en acide arachidonique (un AGPI oméga 6) (90). Cependant il existe des AGPI qui ont montré un effet anti-tumoral, comme l'acide écosapentaénoïque (EPA, un AGPI oméga 3). Son effet sur le CaP en particulier, est d'ailleurs détaillé plus bas.

### Influence de ces différents acteurs du micro-environnement sur le CaP

Il existe un dialogue bidirectionnel entre les cellules cancéreuses du CaP et les adipocytes associés au cancer du TAPP.

En effet, les adipocytes induisent la prolifération, l'invasion et la migration des cellules de CaP et ont également des effets anti-apoptotiques sur ces cellules (81–83,91), par leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de lipides (88,89,92). Par exemple, *in vitro*, la leptine semble induire la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), du fait que les cellules cancéreuses changent de morphologie, que la E-cadhérine soit dérégulée, et que cela favorise la migration des cellules (88). Il a aussi été montré, *in vitro*, que le milieu conditionné issu d'adipocytes entraîne une TEM partielle des lignées PC3 et DU145, et également une survie prolongée et une plus grande capacité d'invasion (93).

Les adipocytes vont aussi induire une lipophagie au sein des cellules cancéreuses, comme cela a été observé lors de travaux antérieurs au sein de notre laboratoire (91). En effet, il a été observé que les marqueurs de lipophagie des cellules cancéreuses étaient davantage présents dans les cellules en zone extra-prostatique (qui sont donc en contact direct avec les adipocytes) par rapport à celles qui se situaient en intra-prostatique. Lors de cette étude, il a également été montré *in vitro via* des co-cultures entre adipocytes issus de TAPP et lignées de cellules de CaP, que le contact avec les adipocytes augmente la lipophagie des cellules de CaP. Les adipocytes semblent aussi intervenir dans l'évolution du CaP vers une forme NE, puisqu'il a été montré que la sécrétion d'IL-6 par les adipocytes est capable d'induire une différenciation NE des cellules de CaP, *via* l'accumulation de lipides notamment (94).

Mais les adipocytes peuvent aussi avoir un effet anti-tumoral, par exemple en sécrétant de l'adiponectine ou des AGPI (85,95). Les effets des adipocytes sur les cellules de CaP dépendent aussi probablement des caractéristiques du CaP. Il semblerait que les adipocytes aient un effet pro-prolifératif sur les cellules au stade hormonosensible (qui peuvent être modélisées par exemple par la lignée LNCaP), sans que cela n'ait d'effet sur la prolifération des cellules résistantes à la castration (comme les PC3 ou les DU145) (96).

Enfin, les cellules de CaP peuvent elles aussi modifier le comportement des adipocytes, notamment en les faisant évoluer vers des « adipocytes associés au cancer » comme déjà évoqué un peu plus haut. Il a aussi été observé *in vitro*, en traitant des explants de TAPP avec du milieu conditionné issu de cultures de PC3, que cela induisait la sécrétion d'adipokines pro-tumorales (ostéopontine, TNFα, IL-6) et inhibait la sécrétion de l'adiponectine (et donc son effet anti-tumoral) (97).

La communication bilatérale entre CaP et micro-environnement notamment adipeux est décrit de façon plus détaillée dans notre article de revue publié dans IJMS au cours de ce travail de thèse et présenté ci-dessous.

International Journal of
*Molecular Sciences*

MDPI

*Review*

# Interplay between Prostate Cancer and Adipose Microenvironment: A Complex and Flexible Scenario

**Mathilde Cancel [1,2], William Pouillot [3], Karine Mahéo [1], Alix Fontaine [3], David Crottès [1] and Gaëlle Fromont [1,*]**

[1] Inserm UMR1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France
[2] Department of Medical Oncology, CHU Tours, bd Tonnellé, 37032 Tours, France
[3] Department of Pathology, CHU Tours, bd Tonnellé, 37032 Tours, France
* Correspondence: gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr; Tel.: +33-2-47-36-62-13; Fax: +33-2-47-36-62-26

**Abstract:** Adipose tissue is part of the prostate cancer (PCa) microenvironment not only in the periprostatic area, but also in the most frequent metastatic sites, such as bone marrow and pelvic lymph nodes. The involvement of periprostatic adipose tissue (PPAT) in the aggressiveness of PCa is strongly suggested by numerous studies. Many molecules play a role in the reciprocal interaction between adipocytes and PCa cells, including adipokines, hormones, lipids, and also lipophilic pollutants stored in adipocytes. The crosstalk has consequences not only on cancer cell growth and metastatic potential, but also on adipocytes. Although most of the molecules released by PPAT are likely to promote tumor growth and the migration of cancer cells, others, such as the adipokine adiponectin and the n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), have been shown to have anti-tumor properties. The effects of PPAT on PCa cells might therefore depend on the balance between the pro- and anti-tumor components of PPAT. In addition, genetic and environmental factors involved in the risk and/or aggressiveness of PCa, including obesity and diet, are able to modulate the interactions between PPAT and cancer cells and their consequences on the growth and the metastatic potential of PCa.

**Keywords:** prostate cancer; adipose tissue; fatty acids; persistant organic pollutants; adipokines

check for updates

**Citation:** Cancel, M.; Pouillot, W.; Mahéo, K.; Fontaine, A.; Crottès, D.; Fromont, G. Interplay between Prostate Cancer and Adipose Microenvironment: A Complex and Flexible Scenario. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10762. https://doi.org/10.3390/ijms231810762

Academic Editors: Pinar Uysal Onganer and Jimmy D. Bell

Received: 26 August 2022
Accepted: 13 September 2022
Published: 15 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

Prostate Cancer (PCa) is the most frequent non-cutaneous cancer in men and a leading cause of cancer death in western countries [1]. The prostate is surrounded by a rim of adipose tissue (AT), the periprostatic adipose tissue (PPAT), whose infiltration by cancer cells is linked to a poorer prognosis. White adipose tissue (WAT) is both an energy storage place and a metabolically active endocrine organ that secretes a variety of biologically active mediators contributing to paracrine and autocrine signaling pathways [2]. The involvement of PPAT in PCa aggressiveness has been strongly suggested by several studies, via production of hormones, inflammatory mediators, or lipid transfer [3]. In addition to PPAT, PCa cells are likely to be in contact with AT in the two most frequent metastatic sites, pelvic lymph nodes and bone, organs physiologically prone to adipose involution in elderly patients. In this setting, adipocytes are part of the tumor microenvironment (TME), together with many types of non-cancerous cells, such as fibroblasts, immune, and vascular cells. The crosstalk between TME and cancer cells can be direct by cell-to-cell contact, or paracrine via secreted molecules or exosomes [4]. The communication between cancer cells and AT is a two-way process that involves several players and mechanisms and leads to consequences in term of tumor aggressiveness and progression. Moreover, both genetic and environmental factors, including obesity, are able to modulate the interactions between WAT and PCa cells, as well as their consequences. Currently, several studies, either clinical or from in vitro research, have documented the relationship between AT and PCa. In this review, we present an up-to-date overview of the communication processes between PCa

and AT, together with the identification of factors that can modulate this crosstalk, and therefore could be targeted for therapeutic interventions.

## 2. Cell Players

### 2.1. PCa Cells

PCa cells do not obey the classical Warburg effect phenotype observed in other solid tumors, oriented toward glucose uptake and aerobic glycolysis. In the early phases of PCa progression, the metabolism of cancer cells relies mainly on fatty acid (FA) oxidation [5], which is necessary for energy production and membrane synthesis to ensure cancer cell survival and proliferation. PCa cells can uptake circulating lipids or lipids from the adipose microenvironment to promote PCa invasiveness through oxidative stress in a NADPH oxidase–dependent manner, activating the Hypoxia Inducible Factor 1α/Matrix metalloproteinase 14 (HIF1α/MMP14) pathway [6,7]. It is only in the late stages of PCa progression that cancer cells will begin to exhibit the Warburg effect and have a higher rate of glucose uptake [5].

### 2.2. Adipocytes and Cancer-Associated-Adipocytes (CAA)

Adipocytes are the most frequent cell type in AT. A mature adipocyte is a large cell containing one lipidic vacuole made mainly of triacylglycerides [8], which is able to store and deliver lipids such as free FA to other cells, through lipolysis [9]. The adipocyte is a metabolically active cell, that can secrete numerous adipose-derived factors called adipokines, such as steroid hormones, growth factors including pro-angiogenic factors, chemokines, and cytokines, that are mainly pro-inflammatory [8,10]. Adipocytes interacting with cancer cells are called "cancer-associated adipocytes" (CAA), which are smaller than "standard" adipocytes, with a decreased lipid content, due to a phenomenon called delipidation [6]. Adipokines secreted by CAAs have an increased pro-inflammatory phenotype when compared to standard adipocytes [8,11].

Some morphologic and metabolic differences have been observed, depending on the site of AT. A study comparing PPAT to subcutaneous AT demonstrated that adipocytes were smaller in PPAT and secreted fewer polyunsaturated fatty acids (PUFAs), n-3 as well as n-6 [12]. Bone is an adipocyte-rich organ and bone marrow adipocytes (BMAds), which represent about 10% of the total fat mass, expand with aging [9,13]. BMAds, like WAT adipocytes, can store and release FAs and adipokines [13]. However, BMAds are devoid of lipolytic activity and exhibit a cholesterol-orientated metabolism [14].

### 2.3. Other Cells of the TME

Soluble factors can also be secreted by other components of the adipose TME, such as immune cells, cancer-associated-fibroblasts (CAFs), and mesenchymal stem cells (MSCs). CAFs predominantly originate from the local fibroblasts surrounding the tumor [15]. However, some studies also suggested that bone marrow-derived MSCs or adipocytes can be recruited to the TME and converted into CAFs [16]. MSCs are multipotent cells that reside in various areas such as bone marrow or fat, capable to differentiate into adipocytes as well as osteocytes or chondrocytes [17]. Pre-adipocytes, or adipose-derived stem cells, are highly represented in the AT stromal vascular fraction. This population is more frequently present in PCa than in normal adjacent prostate tissue [18] or in benign prostatic hyperplasia [19]. An in vitro experiment has shown that pre-adipocytes were more attracted toward Pca cells than non-tumoral prostate cells. After 48 h co-culture with pre-adipocytes, PCa cells displayed increased invasive properties [18].

## 3. Molecular Players

### 3.1. Lipids

Cancer cells activate lipolysis in tumor-surrounding adipocytes, leading to the release of free FAs. The main free FAs released are palmitic, oleic, and linoleic acids. Once released,

free FAs are transferred to cancer cells [9]. A study using labelled FAs has demonstrated lipid-specific translocation between adipocytes and PCa cells [20].

Uptake of lipids in cancer cells has been shown to occur through either non-selective (macropinocytosis) or selective (lipid transporters) mechanisms [21]. Lipid transporters include the fatty acid binding proteins (FABPs) family, and the FA translocase CD36, expressed on PCa cells [22]. Targeting CD36 has been shown to reduce FA uptake and to slow cancer progression [22]. FABPs are a family of proteins that acts as intracellular FA transporters and are involved in the uptake and intracellular storage of FA [23]. FABP4 was first described in adipocytes, but is also expressed in other cell types, including PCa cells [23,24]. FABP4 has been shown to be up-regulated in human bone PCa metastasis, expressed in both cancer cells and adipocytes [25]. FABP4 is involved in lipid transfer between adipocytes and tumor cells, and is also able in PCa cells to translocate to the nucleus to interact with peroxisome proliferative-activated receptor γ (PPARγ) and affects cell growth and differentiation [24,26]. FABP5 is also involved in the uptake and transport of long chain FA, and its expression is upregulated in PCa tissues compared to normal prostate [23,27]. It has been shown that treatment with an FABP5 inhibitor suppressed the proliferation, migration, invasion, and colony formation of PC3-derived cells in vitro, by blocking FA stimulation of PPARγ [28]. Moreover, in a PC3 xenograft in mice prostate, the treatment with a FABP5 inhibitor prevented the development of metastases and induced a reduction in the size of primary tumors [28]. Otherwise, the role of exosomes in the communication between adipocytes and PCa cells has also been evidenced [29].

As demonstrated in patient-derived explants as well as in several cell lines, PCa cells uptake FAs to incorporate them into intracellular triacylglycerols (TAGs) and store them in the cytoplasm in the form of lipid droplets (LDs) [30]. LDs are made of neutral lipids, mostly composed of triglycerides (TG) and cholesterol esters (CE). In PCa cells, it has been shown that the amount of LDs increased with disease aggressiveness and progression [31]. FAs can be released from LDs either by lipolysis, which involves cytosolic lipases, or by lipophagy, a selective form of autophagy releasing free FAs that can fuel ß-oxidation in the mitochondria to provide energy [32]. A recent study has suggested an active process of lipophagy in PCa cells, linked to disease aggressiveness and to the proximity of cancer cells with PPAT [33]. FAs differentially influence PCa cell growth and migration. Animal and in vitro experiments have suggested that n-6 PUFAs stimulate, whereas n-3 PUFAs inhibit PCa growth [34,35]. Others have described a pro-migratory effect of saturated FAs, together with an anti-migratory effect of the n-6 PUFA linoleic acid (LA) and the n-3 PUFA ecosapentaenoic acid (EPA) [36,37]. It has also been shown that FA composition of PPAT in PCa patients is associated with markers of disease aggressiveness, like Gleason score and pathological stage. The FA profile associated with PCa aggressiveness was characterized by low level of LA and EPA, along with high levels of saturated FA [38]. In addition, in vitro migration potential of PCa cell lines supplemented with FA extracts obtained from PPAT was inversely correlated with adipose tissue LA content [38]. The effects of FAs released by AT on PCa cells is therefore likely to depend on the balance between pro- and anti-tumoral FAs.

AT is the primary cholesterol storage organ. Besides de novo cholesterol synthesis, PCa cells can uptake cholesterol from adipocytes in its free form, and store it as CE into the cytoplasmic LDs [39]. It has been shown that CE accumulation in cancer cells increased in high-grade PCa, via loss of PTEN and activation of PI3K/AKT [31]. Moreover, CE represents the main initial substrate for steroid biosynthesis [40]. It has been shown that ACAT-1, an enzyme essential for cellular cholesterol storage, and SREBP-2, a transcription factor involved in cholesterol uptake, are associated in PCa cells with the process of epithelial to mesenchymal transition (EMT), which allows cancer cells to acquire migratory and invasive characteristics, properties essential for dissemination and distant metastasis [41].

### 3.2. Hormones

WAT is an endocrine organ with the capacity to synthetize and metabolize steroid hormones. In men, it contains both androgens and androgen precursors that may support

PCa growth and metastasis. Moreover, PPAT also expresses aromatase, an enzyme which converts androgens to estrogens [42,43]. Several lines of evidence suggest that estrogens may enhance PCa development and aggressiveness [44]. Estrogen synthesis in WAT increases with visceral adiposity, leading to an increase in free-circulating estrogen levels. In turn, estradiol induces a feedback inhibition of the pituitary–hypothalamic axis that decreases free testosterone levels [45].

### 3.3. Chemokines, Cytokines, and Proteases

Adipokines are cytokines, hormone-like polypeptides, secreted by adipocytes. They can exert their biological actions on target cells via endocrine, paracrine, and autocrine pathways [46]. The main adipokines known to play a role in PCa are leptin, adiponectin, interleukin-6 (IL-6), heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) [46]. Circulating leptin has been shown to be two-fold higher in PCa patients compared to healthy people [47], and leptin receptor was detected in both normal prostate epithelial cells and PCa cells [48]. Moreover, leptin receptor expression on PCa cells has been associated with an adverse prognosis [49]. Recently, an in vivo study with LNCaP xenografts in mice, demonstrated that administration of a leptin receptor antagonist decreased tumor growth and delayed progression to castration-resistant disease [50].

Adiponectin has been shown to have effects which are clearly antagonistic to those produced by leptin, and thus may possess anticancer properties [46]. The expression of adiponectin receptors is decreased in PCa tissues compared to normal prostate [51], and is also decreased in aggressive PCa compared to indolent disease [52]. It has been suggested that adiponectin may play an essential role in suppressing PCa cells growth through inhibition of VEGF-A-mediated cancer neovascularization [51]. In AT, IL-6 is produced mainly by macrophages and stromal cells, with only about 10% synthesized by adipocytes [46]. IL-6 expression in PPAT has been correlated with markers of PCa aggressiveness [11]. Angiogenesis is the process by which new blood vessels are formed from preexisting vasculature, and has been shown to be correlated with high PCa stage and the presence of metastases [53–55]. A high degree of microvessel density, indicative of active angiogenesis, and high expression of VEGF, were found concurrently in high-grade PCa [55–58]. HB-EGF is an inducer of VEGF expression, and stimulates endothelial cell migration [46]. HB-EGF stimulates the growth of cultured human PCa cell lines, and is also produced by the tumor cells, providing the potential for significant autocrine mitogenic activity [59].

It has been demonstrated that mature adipocytes secrete the chemokine CCL7, which interacts with the CCR3 receptor on PCa cells to promote cell migration [60]. The same study also showed that the expression of CCR3 on PCa cells is associated with markers of disease aggressiveness. Moreover, CCR3 was found to be up-regulated in bone metastases compared to primary tumors [61]. In vitro experiments have shown that conditioned medium (CM) from human non-tumoral bone marrow derived adipocytes induced PCa cells migration, via the CCR3/CCL7 axis [61]. In vitro, CM from the PCa cell line DU145, which secretes CXCL1 and CXCL8, chemoattracts adipose stromal cells by signaling through their receptors CXCR1 and CXCR2, and promotes PCa progression [62]. CXCL12 is secreted by adipose stromal cells, and seems to play a role in chemoresistance as well as in PCa cell migration (LNCaP) [63]. In addition, PPAT can secrete some matrix metalloproteinases (MMPs), such as MMP9, which is able to induce invasive capacities in LNCaP cell line [64].

Some links have been identified between adipokines and hormone metabolism, since it has been shown that leptin significantly increases the expression of ER-α and decreases that of ER-β in PC-3 cells, and significantly up-regulates the expression of aromatase [65].

### 3.4. Persistent Organic Pollutants (POPs)

Many pollutants accumulate in AT due to their lipophilic nature; it is notably the case for different POPs [66]. POPs, as defined by the Stockholm Convention, are chemicals that have certain toxic properties, are resistant to degradation, and accumulate in living organisms. POPs are classified as polychlorobiphenyls (PCB), dioxins, and pesticides [66]. POP concentration in AT is more representative of the cumulative internal exposure than measurement in blood [67]. Some of these POPs have endocrine disruptive properties and can interact with hormone-sensitive cancers such as PCa [66,68]. Estrogen-mimetic properties, agonists against estrogen receptor alpha (ER-α), and antagonists against estrogen receptor beta (ER-β) have been demonstrated for some of them [69,70]. Moreover, chlordecone, an organochlorine pesticide previously used in the French West Indies, has been shown to exhibit in vitro affinity for the androgen receptor (AR) [70]. Another organochlorine pesticide, DDT and its metabolite DDE, displays anti-androgenic effects probably mediated by competitive binding to AR and/or inhibition of AR-dependent gene expression. Both DDT and DDE have been shown to repress PSA levels in human PCa cell lines [71]. Some epidemiological studies have identified a link between POPs concentration in blood and PCa risk [72,73]. In WAT, POPs can promote adipogenesis via estrogen or glucocorticoid receptors [66].

Some links have been identified between POPs and lipid metabolism. For example, chlordecone has been shown to modify tissue distribution of cholesterol, by decreasing the amount of CEs and intra-cellular LDs, through pregnane X receptor (PXR) and ER-α activation [74].

## 4. Scenario of the Interplay

### 4.1. On PCa Cells

Several pro-tumoral effects have been described in PCa cells, induced by adipocytes produced molecules, including proliferation, anti-apoptotic effects, invasiveness properties, and migration (Figure 1) [33,60,75,76]. Most of these effects have been observed for pro-inflammatory cytokines, chemokines, and lipids [37,49,77]. Increased migration capacities induced by FAs and leptin have been linked to the EMT process [37,49]. These effects have been shown to be mediated through several signaling pathways. In PCa cells, free FAs increase the expression of the pro-oxidant enzyme NADPH oxidase 5 (NOX5), leading to elevated reactive oxygen species (ROS). ROS activate the HIF1α/MMP14 signaling pathway, inducing increased invasiveness [6]. The effect of leptin to promote EMT in PCa is mediated by the stimulation of STAT3 pathway [49]. The involvement of the PI3K/Akt signaling has been demonstrated through inactivation of FOXO1 [78]. A process of adipocyte-induced lipophagy in cancer cells is also likely, since the expression of lipophagy markers on PCa cells has been shown to be higher in extra-prostatic areas of the tumor (in close contact with PPAT) than in intra-prostatic areas. In the same study, co-culture of PCa cells with adipocytes from PPAT induced increased lipophagy [33].

It has been shown that a high-fat diet was able to induce both lipid accumulation in prostate tumors and the development of metastases in a Pten-null mouse model of PCa [79]. In another study, high saturated fat intake induced proliferation in a PCa murine model via enhanced MYC transcription [80]. Some adipocyte secreted molecules are able to induce neuroendocrine differentiation (NED) in PCa cells. It has been shown that IL-6 treatment could lead to NED via increased lipid accumulation, PPAR-γ, and adipocyte differentiation-related protein (ADRP), a major component of adiposome. In addition, ADRP protein has been detected in exosomes released from these cells and these exosomes were able to induce NED in a paracrine fashion [29].

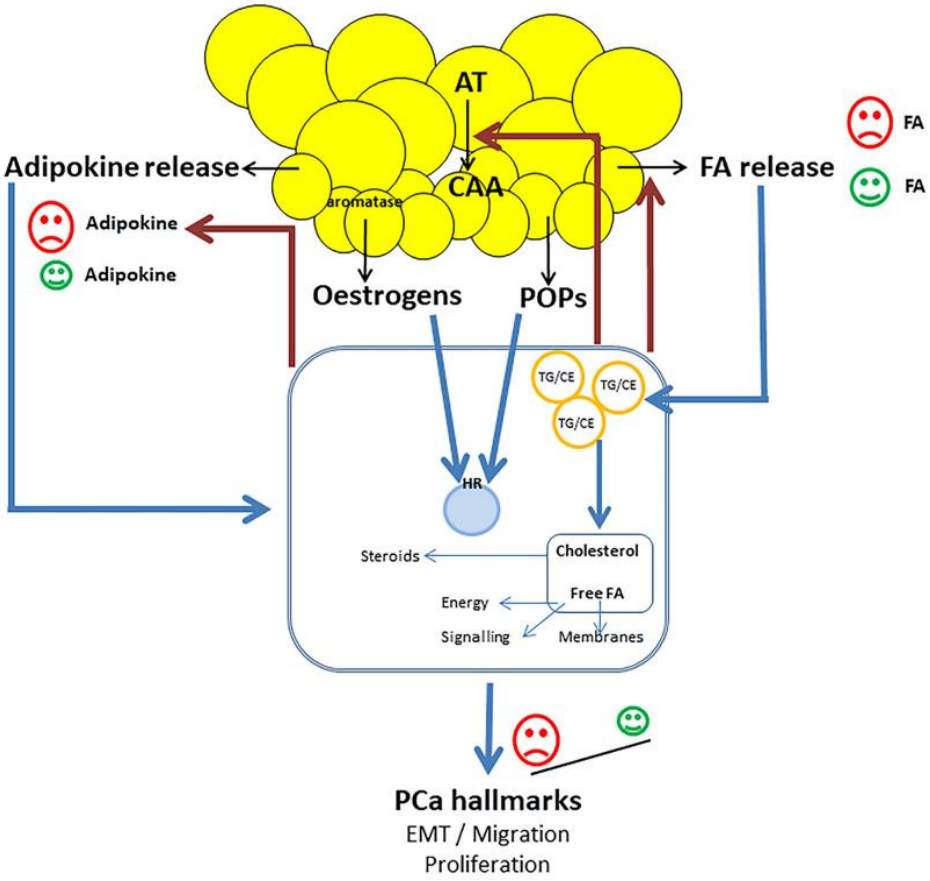



**Figure 1.** Crosstalk between PCa cells and periprostatic adipose tissue (PPAT): Adipocytes release not only adipokines and fatty acids (FA), but also estrogens and lipophilic persistent organic pollutants (POPs) stored in adipose tissue (AT). Both estrogens and POPs, which have for most of them endocrine disruptive properties, act on PCa cells through their effects on steroid nuclear receptors. FA are incorporated in cancer cells and stored in lipid droplets (LD), in the form of triglycerides (TG) associated with cholesterol ester (CE). Free FA can be released from LD, and then can either fuel β-oxidation in the mitochondria to provide energy, participate in cell signaling, or ensure membrane synthesis. In PCa cells, cholesterol is the main initial substrate for steroid synthesis. The effects of PPAT on cancer cells, and therefore on PCa hallmarks, probably depend on the balance between pro- and anti-tumor adipokines (for example leptin and adiponectin), and between pro- and anti-tumor FAs (for example saturated FAs and n-3 PUFAs). Cancer cells can induce both FA release from AT and the transformation of adipocytes into cancer-associated-adipocytes (CAA), that exhibit decreased size and delipidation. PCa cells can also induce the secretion of pro-tumor adipokines from adipocytes.

Moreover, anti-tumoral effects have been described with some adipocyte derived molecules, such as adiponectin [46], and PUFAs (Figure 1). Both LA and EPA have been shown to inhibit TGF-β induced PCa cell migration, via reduced $Ca^{2+}$ entry regulated by SK3 (a potassium channel regulating calcium entry) and Zeb1 (an EMT transcription factor) [37].

The effects of PPAT on PCa cells could be influenced by both the quantity of AT and its inflammatory state. Several studies have found an association between PPAT thickness determined by MRI, and markers of PCa aggressiveness such as Gleason score and pathological staging [81,82]. Interestingly, no study has found a correlation between PPAT thickness and measurements of whole body adiposity measures such as body mass index (BMI) or waist circumference [81–83], suggesting that PPAT volume is independent

of total adiposity and does not increase in the same relation than WAT in obese patients. PPAT inflammation, defined as the presence of dead or dying adipocytes surrounded by macrophages, has been associated with higher BMI and higher Gleason score [84]. The effects of secretome derived PPAT on PCa cells is therefore likely to depend on the balance between pro- and anti-inflammatory adipokines.

The effect of AT on PCa cells could also depend on the type of cancer cells. In vitro co-culture of mature adipocytes from rats with human PCa cell induced a pro-proliferative effect on the androgen dependent cell line LNCaP, whereas it had no effect on either proliferation or the PI3-kinase pathway in the androgen-independent cell lines PC3 and DU145 [85]. These data suggest that the pro-tumoral effect of adipocytes is most significant in differentiated hormone dependent cancer cells, whereas poorly differentiated androgen-independent PCa cells are more autonomous and could be less dependent on the adipocyte microenvironment.

### *4.2. On Adipocytes*

Stimulation of PPAT explants with CM from the PC3 cell line has been shown to induce the secretion of pro-tumoral adipokines (osteopontin, TNFα and IL-6) and to reduce the expression of the protective adipokine adiponectin [86]. Moreover, co-culture of mature adipocytes with PCa cells induces transformation into CAAs that exhibit dedifferentiation, delipidation, and decreased size (Figure 1). Such morphological modifications have also been observed in vivo in the invasion front of human PCa where tumor cells are in close contact with adipocytes [6]. In addition, some POPs stored in WAT are considered as potential obesogens that could affect AT functioning. Epidemiological studies demonstrated an association between exposure to several POPs and higher BMI. POPs effects on adipocytes have been shown to be mediated through either endocrine disruption via fixation on nuclear receptors, or pro-inflammatory activity [87].

## 5. Factors That Can Modulate the Scenario

### *5.1. Obesity*

Obesity has been linked to PCa aggressiveness [3]. Adipocytes from obese men are hypertrophic, with remodeling of the extracellular matrix that induces fibrosis and inflammation in the adipose microenvironment, leading to hypoxia and adipocyte stress. These changes lead to increase FA release and modification in adipokine production that favor the production of pro-inflammatory cytokines over anti-inflammatory cytokines (Figure 2) [88]. Higher secretion of the chemokine CCL7 has also been described in adipocytes from obese men compared to lean patients [60]. Moreover, obesity is associated with increased estrogen synthesis in WAT (Figure 2) [45]. More systemic disorders associated with obesity, such as dyslipidemia and insulin resistance leading to increased circulating levels of insulin, are also likely to be involved in PCa aggressiveness [3].

### *5.2. Genetic Factors*

There are considerable ethnic disparities in PCa risk, with a 60% higher incidence rate among African-American men as compared with European-American men [89]. While such variations could be explained in part by differences in access to healthcare and PCa screening, it is now recognized that genetic factors play a determining role. Thus, certain genetic polymorphisms have been associated with an increased individual risk of PCa, and since their frequency varies according to the ethno-geographic origin of populations, they could help to explain the large variations in incidence [90]. The biology of PCa cells has also been shown to be different according to the ethnic origin of the patients (Figure 2). The TMPRSS2/ERG gene fusion, the most common genetic alteration in PCa, is twice as common in Caucasians as in African-Americans [91], and it has been suggested that the metabolism of FAs could be different in TMPRSS2/ERG positive and negative tumors [92].

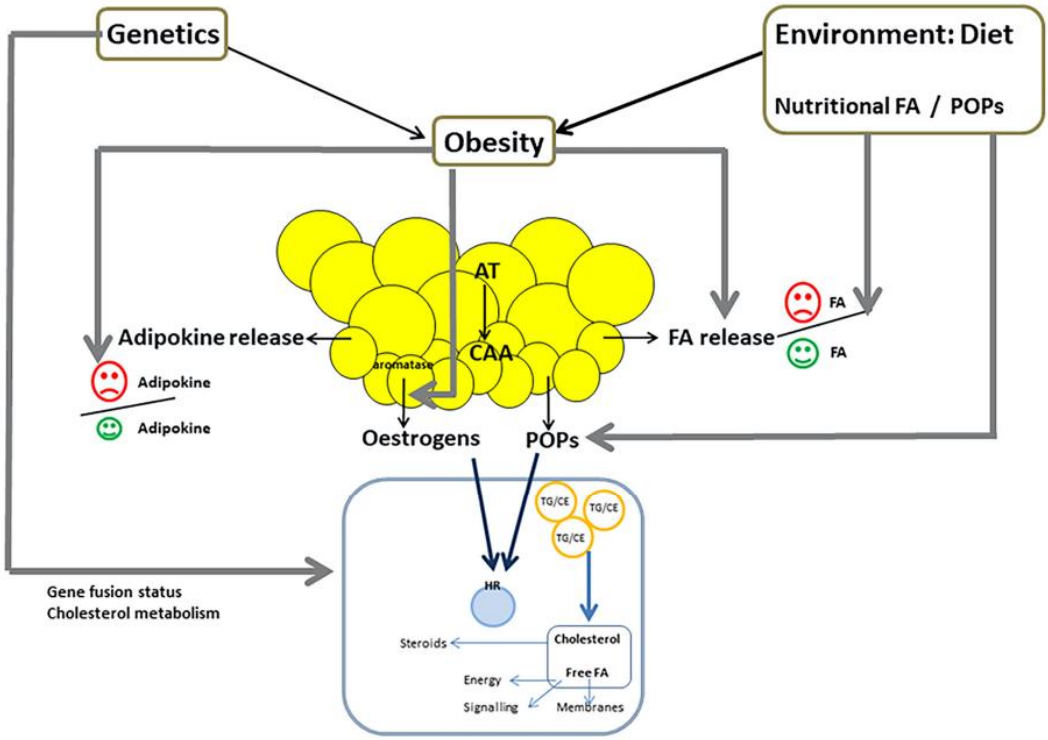



**Figure 2.** Factors that can impact the scenario of the interplay between periprostatic adipose tissue (PPAT) and PCa cells: Genetic factors, such as ethnicity, could modify the effect of PPAT on cancer cells, through different cholesterol and FA metabolism, mediated by the gene fusion status. Obesity induces increased FA release from adipocytes, increased production of pro-tumor adipokines, and decreased production of anti-tumor adipokines. Obesity is also associated with increased estrogen synthesis in adipose tissue. Diet, through FA and POPs intake, is also able to modify the effect of PPAT on cancer cells. Dietary intake plays a key role in FA composition of PPAT, and therefore impacts the balance between pro-tumor and anti-tumor FA.

Moreover, it has been shown that the FA composition of PPAT differed according to the ethno-geographic origin. In African-Caribbean patients compared with Caucasians, PPAT contained less monounsaturated and saturated FA, less n-3 PUFAs, and twice more n-6 PUFAs, mainly LA, an essential n-6 FA [38]. Since FA composition of AT reflects the past dietary intake, particularly for the essential FA, diet could therefore play a key role in the observed differences of PPAT composition. Alternatively, ethno-geographic differences could also be due to genetic variation in FA metabolism, since different variants in the fatty acid desaturases (FADs) gene have been evidenced in African-American men compared with Caucasians [93].

In addition, cholesterol metabolism could vary in cancer cells according to the ethnic origin (Figure 2). It has been shown that the expression of ABCA1 (involved in cholesterol efflux) was decrease in PCa cells from African-Caribbean patients compared to Caucasian patients, and that of SREBP-2 (involved in cholesterol uptake) was increased. This imbalance in cholesterol homeostasis oriented toward cholesterol accumulation in cancer cells was associated with a more frequent state of EMT, which may promote more aggressive PCa behavior [41].

### *5.3. Environmental Factors*

As previously mentioned, dietary intake is likely to play a key role in the observed differences of FA composition in PPAT according to the ethno-geographic origin of the

patients (Figure 2) [38]. The description of dietary habits in the West Indies reported high consumption of vegetable oils, mainly sunflower oil that contains about 60% of LA [94].

Lipophilic POPs, and particularly organochlorine pesticides (OCPs), have been shown to accumulate in fat, and their measurement in AT represents cumulative internal exposure [95]. Since food is the main vector of exposure to OCPs, diet plays a major role in human contamination (Figure 2) [96].

Finally, recreational physical activity after PCa diagnosis has been associated with a lower risk of PCa death [97,98]. Physical activity may reduce PCa aggressiveness through decreased body fat, improved insulin sensitivity, or decreased oxidative stress and systemic inflammation [99].

## 6. Concluding Remarks

A growing body of evidence supports bilateral communication between PCa cells and AT, particularly PPAT. Crosstalk with the adipose microenvironment is extremely complex, with consequences for cancer cells depending on both the amount and composition of AT. Indeed, the effects of PPAT on PCa cells are likely to depend on the balance between the pro- and anti-tumor components of the PPAT secretome. However, several interactions and mechanisms remain to be better understood, in particular the interactions between the different components of the PPAT secretome, using appropriate experimental models. The effects of bone marrow AT, which exhibits a different metabolism, also need further investigation. The effects of PPAT on PCa cells could also depend on the lipid metabolism of cancer cells, which is influenced by genetic factors, in particular the ethnic origin of the patients. The amount and composition of PPAT is highly dependent on targetable environmental factors, such as obesity, dietary FA intake, and exposure (mainly through diet) to POPs.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

| | |
|---|---|
| ADRP | adipocyte differentiation-related protein |
| AR | androgen receptor |
| AT | adipose tissue |
| BMAd | bone marrow adipocyte |
| BMI | body mass index |
| CAA | cancer-associated adipocyte |
| CAF | cancer-associated-fibroblast |
| CE | cholesterol esters |
| CM | conditioned medium |
| EMT | epithelial to mesenchymal transition |
| EPA | ecosapentaenoic acid |
| ER-α | estrogen receptor alpha |
| ER-β | estrogen receptor beta |
| FA | fatty acid |
| FABP | fatty acid binding protein |
| HB-EGF | heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor |

| | |
|---|---|
| HIF1α | Hypoxia Inducible Factor 1α |
| IL-6 | interleukin-6 |
| LA | linoleic acid |
| LD | lipid droplet |
| MMP | matrix metalloproteinase |
| MSC | mesenchymal stem cell |
| NED | neuroendocrine differentiation |
| NOX5 | NADPH oxidase 5 |
| OCP | organochlorine pesticide |
| PCa | prostate cancer |
| PCB | polychlorobiphenyl |
| POP | persistent organic pollutant |
| PPARγ | peroxisome proliferative-activated receptor γ |
| PPAT | periprostatic adipose tissue |
| PUFA | polyunsaturated fatty acid |
| PXR | pregnane X receptor |
| ROS | reactive oxygen species |
| TAG | triacylglycerol |
| TG | triglycerides |
| TME | tumor microenvironment |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| WAT | white adipose tissue |

## References


1. Zhou, C.K.; Check, D.P.; Lortet-Tieulent, J.; Laversanne, M.; Jemal, A.; Ferlay, J.; Bray, F.; Cook, M.B.; Devesa, S.S. Prostate Cancer Incidence in 43 Populations Worldwide: An Analysis of Time Trends Overall and by Age Group. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1388–1400. [CrossRef] [PubMed]
2. Sacca, P.A.; Calvo, J.C. Periprostatic Adipose Tissue Microenvironment: Metabolic and Hormonal Pathways During Prostate Cancer Progression. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 863027. [CrossRef] [PubMed]
3. Nassar, Z.D.; Aref, A.T.; Miladinovic, D.; Mah, C.Y.; Raj, G.V.; Hoy, A.J.; Butler, L.M. Peri-prostatic Adipose Tissue: The Metabolic Microenvironment of Prostate Cancer. *BJU Int.* **2018**, *121*, 9–21. [CrossRef] [PubMed]
4. Dominiak, A.; Chełstowska, B.; Olejarz, W.; Nowicka, G. Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions. *Cancers* **2020**, *12*, 1232. [CrossRef] [PubMed]
5. Bader, D.A.; McGuire, S.E. Tumour Metabolism and Its Unique Properties in Prostate Adenocarcinoma. *Nat. Rev. Urol.* **2020**, *17*, 214–231. [CrossRef]
6. Laurent, V.; Toulet, A.; Attané, C.; Milhas, D.; Dauvillier, S.; Zaidi, F.; Clement, E.; Cinato, M.; Le Gonidec, S.; Guérard, A.; et al. Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. *Mol. Cancer Res.* **2019**, *17*, 821–835. [CrossRef]
7. Diedrich, J.D.; Rajagurubandara, E.; Herroon, M.K.; Mahapatra, G.; Hüttemann, M.; Podgorski, I. Bone Marrow Adipocytes Promote the Warburg Phenotype in Metastatic Prostate Tumors via HIF-1α Activation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64854–64877. [CrossRef]
8. Laurent, V.; Nieto, L.; Valet, P.; Muller, C. Adipose tissue and cancer: A high risk tandem. *Med. Sci. MS* **2014**, *30*, 398–404. [CrossRef]
9. Attané, C.; Muller, C. Drilling for Oil: Tumor-Surrounding Adipocytes Fueling Cancer. *Trends Cancer* **2020**, *6*, 593–604. [CrossRef]
10. Galic, S.; Oakhill, J.S.; Steinberg, G.R. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *316*, 129–139. [CrossRef]
11. Finley, D.S.; Calvert, V.S.; Inokuchi, J.; Lau, A.; Narula, N.; Petricoin, E.F.; Zaldivar, F.; Santos, R.; Tyson, D.R.; Ornstein, D.K. Periprostatic Adipose Tissue as a Modulator of Prostate Cancer Aggressiveness. *J. Urol.* **2009**, *182*, 1621–1627. [CrossRef] [PubMed]
12. Miladinovic, D.; Cusick, T.; Mahon, K.L.; Haynes, A.-M.; Cortie, C.H.; Meyer, B.J.; Stricker, P.D.; Wittert, G.A.; Butler, L.M.; Horvath, L.G.; et al. Assessment of Periprostatic and Subcutaneous Adipose Tissue Lipolysis and Adipocyte Size from Men with Localized Prostate Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 1385. [CrossRef] [PubMed]
13. Reagan, M.R.; Fairfield, H.; Rosen, C.J. Bone Marrow Adipocytes: A Link between Obesity and Bone Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 364. [CrossRef] [PubMed]
14. Attané, C.; Estève, D.; Chaoui, K.; Iacovoni, J.S.; Corre, J.; Moutahir, M.; Valet, P.; Schiltz, O.; Reina, N.; Muller, C. Human Bone Marrow Is Comprised of Adipocytes with Specific Lipid Metabolism. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 949–958.e6. [CrossRef]
15. Arina, A.; Idel, C.; Hyjek, E.M.; Alegre, M.-L.; Wang, Y.; Bindokas, V.P.; Weichselbaum, R.R.; Schreiber, H. Tumor-Associated Fibroblasts Predominantly Come from Local and Not Circulating Precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 7551–7556. [CrossRef]
16. Bonollo, F.; Thalmann, G.N.; Kruithof-de Julio, M.; Karkampouna, S. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Prostate Cancer Tumorigenesis. *Cancers* **2020**, *12*, 1887. [CrossRef]

17. Ridge, S.M.; Bhattacharyya, D.; Dervan, E.; Naicker, S.D.; Burke, A.J.; Murphy, J.M.; O'leary, K.; Greene, J.; Ryan, A.E.; Sullivan, F.J.; et al. Secreted Factors from Metastatic Prostate Cancer Cells Stimulate Mesenchymal Stem Cell Transition to a Pro-tumourigenic 'Activated' State That Enhances Prostate Cancer Cell Migration. *Int. J. Cancer* **2018**, *142*, 2056–2067. [CrossRef]
18. Xie, H.; Li, L.; Zhu, G.; Dang, Q.; Ma, Z.; He, D.; Chang, L.; Song, W.; Chang, H.-C.; Krolewski, J.J.; et al. Infiltrated Pre-Adipocytes Increase Prostate Cancer Metastasis via Modulation of the MiR-301a/Androgen Receptor (AR)/TGF-B1/Smad/MMP9 Signals. *Oncotarget* **2015**, *6*, 12326–12339. [CrossRef]
19. Ribeiro, R.; Monteiro, C.; Silvestre, R.; Castela, A.; Coutinho, H.; Fraga, A.; Príncipe, P.; Lobato, C.; Costa, C.; Cordeiro-da-Silva, A.; et al. Human Periprostatic White Adipose Tissue Is Rich in Stromal Progenitor Cells and a Potential Source of Prostate Tumor Stroma. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **2012**, *237*, 1155–1162. [CrossRef]
20. Gazi, E.; Gardner, P.; Lockyer, N.P.; Hart, C.A.; Brown, M.D.; Clarke, N.W. Direct Evidence of Lipid Translocation between Adipocytes and Prostate Cancer Cells with Imaging FTIR Microspectroscopy. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1846–1856. [CrossRef]
21. Tousignant, K.D.; Rockstroh, A.; Poad, B.L.J.; Talebi, A.; Young, R.S.E.; Taherian Fard, A.; Gupta, R.; Zang, T.; Wang, C.; Lehman, M.L.; et al. Therapy-Induced Lipid Uptake and Remodeling Underpin Ferroptosis Hypersensitivity in Prostate Cancer. *Cancer Metab.* **2020**, *8*, 11. [CrossRef] [PubMed]
22. Watt, M.J.; Clark, A.K.; Selth, L.A.; Haynes, V.R.; Lister, N.; Rebello, R.; Porter, L.H.; Niranjan, B.; Whitby, S.T.; Lo, J.; et al. Suppressing Fatty Acid Uptake Has Therapeutic Effects in Preclinical Models of Prostate Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaau5758. [CrossRef] [PubMed]
23. Guaita-Esteruelas, S.; Gumà, J.; Masana, L.; Borràs, J. The Peritumoural Adipose Tissue Microenvironment and Cancer. The Roles of Fatty Acid Binding Protein 4 and Fatty Acid Binding Protein 5. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *462*, 107–118. [CrossRef]
24. Huang, M.; Narita, S.; Inoue, T.; Koizumi, A.; Saito, M.; Tsuruta, H.; Numakura, K.; Satoh, S.; Nanjo, H.; Sasaki, T.; et al. Fatty Acid Binding Protein 4 Enhances Prostate Cancer Progression by Upregulating Matrix Metalloproteinases and Stromal Cell Cytokine Production. *Oncotarget* **2017**, *8*, 111780–111794. [CrossRef]
25. Herroon, M.K.; Rajagurubandara, E.; Hardaway, A.L.; Powell, K.; Turchick, A.; Feldmann, D.; Podgorski, I. Bone Marrow Adipocytes Promote Tumor Growth in Bone via FABP4-Dependent Mechanisms. *Oncotarget* **2013**, *4*, 2108–2123. [CrossRef] [PubMed]
26. Tan, N.-S.; Shaw, N.S.; Vinckenbosch, N.; Liu, P.; Yasmin, R.; Desvergne, B.; Wahli, W.; Noy, N. Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 5114–5127. [CrossRef]
27. Myers, J.S.; von Lersner, A.K.; Sang, Q.-X.A. Proteomic Upregulation of Fatty Acid Synthase and Fatty Acid Binding Protein 5 and Identification of Cancer- and Race-Specific Pathway Associations in Human Prostate Cancer Tissues. *J. Cancer* **2016**, *7*, 1452–1464. [CrossRef]
28. Al-Jameel, W.; Gou, X.; Jin, X.; Zhang, J.; Wei, Q.; Ai, J.; Li, H.; Al-Bayati, A.; Platt-Higgins, A.; Pettitt, A.; et al. Inactivated FABP5 Suppresses Malignant Progression of Prostate Cancer Cells by Inhibiting the Activation of Nuclear Fatty Acid Receptor PPARγ. *Genes Cancer* **2019**, *10*, 80–96. [CrossRef]
29. Lin, L.-C.; Gao, A.C.; Lai, C.-H.; Hsieh, J.-T.; Lin, H. Induction of Neuroendocrine Differentiation in Castration Resistant Prostate Cancer Cells by Adipocyte Differentiation-Related Protein (ADRP) Delivered by Exosomes. *Cancer Lett.* **2017**, *391*, 74–82. [CrossRef]
30. Balaban, S.; Nassar, Z.D.; Zhang, A.Y.; Hosseini-Beheshti, E.; Centenera, M.M.; Schreuder, M.; Lin, H.-M.; Aishah, A.; Varney, B.; Liu-Fu, F.; et al. Extracellular Fatty Acids Are the Major Contributor to Lipid Synthesis in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* **2019**, *17*, 949–962. [CrossRef]
31. Yue, S.; Li, J.; Lee, S.-Y.; Lee, H.J.; Shao, T.; Song, B.; Cheng, L.; Masterson, T.A.; Liu, X.; Ratliff, T.L.; et al. Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 393–406. [CrossRef] [PubMed]
32. Zechner, R.; Madeo, F.; Kratky, D. Cytosolic Lipolysis and Lipophagy: Two Sides of the Same Coin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 671–684. [CrossRef] [PubMed]
33. Fontaine, A.; Bellanger, D.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Brisson, L.; Fromont, G. Lipophagy and Prostate Cancer: Association with Disease Aggressiveness and Proximity to Periprostatic Adipose Tissue. *J. Pathol.* **2021**, *255*, 166–176. [CrossRef]
34. Meng, H.; Shen, Y.; Shen, J.; Zhou, F.; Shen, S.; Das, U.N. Effect of N-3 and n-6 Unsaturated Fatty Acids on Prostate Cancer (PC-3) and Prostate Epithelial (RWPE-1) Cells in Vitro. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 160. [CrossRef] [PubMed]
35. Tawadros, T.; Brown, M.D.; Hart, C.A.; Clarke, N.W. Ligand-Independent Activation of EphA2 by Arachidonic Acid Induces Metastasis-like Behaviour in Prostate Cancer Cells. *Br. J. Cancer* **2012**, *107*, 1737–1744. [CrossRef]
36. Wang, X.; Sun, B.; Wei, L.; Jian, X.; Shan, K.; He, Q.; Huang, F.; Ge, X.; Gao, X.; Feng, N.; et al. Cholesterol and Saturated Fatty Acids Synergistically Promote the Malignant Progression of Prostate Cancer. *Neoplasia* **2022**, *24*, 86–97. [CrossRef]
37. Figiel, S.; Bery, F.; Chantôme, A.; Fontaine, D.; Pasqualin, C.; Maupoil, V.; Domingo, I.; Guibon, R.; Fromont, G.; Mahéo, K.; et al. A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. *Cancers* **2019**, *11*, 1814. [CrossRef]
38. Figiel, S.; Pinault, M.; Domingo, I.; Guimaraes, C.; Guibon, R.; Besson, P.; Tavernier, E.; Blanchet, P.; Multigner, L.; Bruyère, F.; et al. Fatty Acid Profile in Peri-Prostatic Adipose Tissue and Prostate Cancer Aggressiveness in African–Caribbean and Caucasian Patients. *Eur. J. Cancer* **2018**, *91*, 107–115. [CrossRef]

39. Huang, B.; Song, B.-L.; Xu, C. Cholesterol Metabolism in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 132–141. [CrossRef]
40. Kraemer, F.B.; Khor, V.K.; Shen, W.-J.; Azhar, S. Cholesterol Ester Droplets and Steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *371*, 15–19. [CrossRef]
41. Lethongsavarn, V.; Pinault, M.; Diedhiou, A.; Guimaraes, C.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Mathieu, R.; Rioux-Leclercq, N.; Multigner, L.; Brureau, L.; et al. Tissue Cholesterol Metabolism and Prostate Cancer Aggressiveness: Ethno-geographic Variations. *Prostate* **2021**, *81*, 1365–1373. [CrossRef] [PubMed]
42. Micucci, C.; Valli, D.; Matacchione, G.; Catalano, A. Current Perspectives between Metabolic Syndrome and Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 38959–38972. [CrossRef]
43. Massillo, C.; Dalton, G.N.; Porretti, J.; Scalise, G.D.; Farré, P.L.; Piccioni, F.; Secchiari, F.; Pascuali, N.; Clyne, C.; Gardner, K.; et al. CTBP1/CYP19A1/Estradiol Axis Together with Adipose Tissue Impacts over Prostate Cancer Growth Associated to Metabolic Syndrome. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1115–1127. [CrossRef] [PubMed]
44. Di Zazzo, E.; Galasso, G.; Giovannelli, P.; Di Donato, M.; Di Santi, A.; Cernera, G.; Rossi, V.; Abbondanza, C.; Moncharmont, B.; Sinisi, A.A.; et al. Prostate Cancer Stem Cells: The Role of Androgen and Estrogen Receptors. *Oncotarget* **2016**, *7*, 193–208. [CrossRef] [PubMed]
45. Buschemeyer, W.C.; Freedland, S.J. Obesity and Prostate Cancer: Epidemiology and Clinical Implications. *Eur. Urol.* **2007**, *52*, 331–343. [CrossRef]
46. Baillargeon, J.; Rose, D.P. Obesity, Adipokines, and Prostate Cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 737–745. [CrossRef]
47. Basaria, S.; Muller, D.C.; Carducci, M.A.; Egan, J.; Dobs, A.S. Hyperglycemia and Insulin Resistance in Men with Prostate Carcinoma Who Receive Androgen-Deprivation Therapy. *Cancer* **2006**, *106*, 581–588. [CrossRef]
48. Somasundar, P.; McFadden, D.W.; Hileman, S.M.; Vona-Davis, L. Leptin Is a Growth Factor in Cancer. *J. Surg. Res.* **2004**, *116*, 337–349. [CrossRef]
49. Gorrab, A.; Pagano, A.; Ayed, K.; Chebil, M.; Derouiche, A.; Kovacic, H.; Gati, A. Leptin Promotes Prostate Cancer Proliferation and Migration by Stimulating STAT3 Pathway. *Nutr. Cancer* **2021**, *73*, 1217–1227. [CrossRef]
50. Philp, L.K.; Rockstroh, A.; Sadowski, M.C.; Taherian Fard, A.; Lehman, M.; Tevz, G.; Libério, M.S.; Bidgood, C.L.; Gunter, J.H.; McPherson, S.; et al. Leptin Antagonism Inhibits Prostate Cancer Xenograft Growth and Progression. *Endocr. Relat. Cancer* **2021**, *28*, 353–375. [CrossRef]
51. Gao, Q.; Zheng, J.; Yao, X.; Peng, B. Adiponectin Inhibits VEGF-A in Prostate Cancer Cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2015**, *36*, 4287–4292. [CrossRef] [PubMed]
52. Philp, L.K.; Rockstroh, A.; Lehman, M.; Sadowski, M.C.; Bartonicek, N.; Wade, J.D.; Otvos, L.; Nelson, C.C. Adiponectin Receptor Activation Inhibits Prostate Cancer Xenograft Growth. *Endocr. Relat. Cancer* **2020**, *27*, 711–729. [CrossRef] [PubMed]
53. Wakui, S.; Furusato, M.; Itoh, T.; Sasaki, H.; Akiyama, A.; Kinoshita, I.; Asano, K.; Tokuda, T.; Aizawa, S.; Ushigome, S. Tumour Angiogenesis in Prostatic Carcinoma with and without Bone Marrow Metastasis: A Morphometric Study. *J. Pathol.* **1992**, *168*, 257–262. [CrossRef] [PubMed]
54. Brawer, M.K.; Deering, R.E.; Brown, M.; Preston, S.D.; Bigler, S.A. Predictors of Pathologic Stage in Prostatic Carcinoma. The Role of Neovascularity. *Cancer* **1994**, *73*, 678–687. [CrossRef]
55. Stefanou, D.; Batistatou, A.; Kamina, S.; Arkoumani, E.; Papachristou, D.J.; Agnantis, N.J. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Association with Microvessel Density in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *In Vivo* **2004**, *18*, 155–160.
56. Kuniyasu, H.; Troncoso, P.; Johnston, D.; Bucana, C.D.; Tahara, E.; Fidler, I.J.; Pettaway, C.A. Relative Expression of Type IV Collagenase, E-Cadherin, and Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in Prostatectomy Specimens Distinguishes Organ-Confined from Pathologically Advanced Prostate Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2295–2308.
57. Strohmeyer, D.; Strauss, F.; Rössing, C.; Roberts, C.; Kaufmann, O.; Bartsch, G.; Effert, P. Expression of BFGF, VEGF and c-Met and Their Correlation with Microvessel Density and Progression in Prostate Carcinoma. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 1797–1804.
58. Trojan, L.; Thomas, D.; Knoll, T.; Grobholz, R.; Alken, P.; Michel, M.S. Expression of Pro-Angiogenic Growth Factors VEGF, EGF and BFGF and Their Topographical Relation to Neovascularisation in Prostate Cancer. *Urol. Res.* **2004**, *32*, 97–103. [CrossRef]
59. Freeman, M.R.; Paul, S.; Kaefer, M.; Ishikawa, M.; Adam, R.M.; Renshaw, A.A.; Elenius, K.; Klagsbrun, M. Heparin-Binding EGF-like Growth Factor in the Human Prostate: Synthesis Predominantly by Interstitial and Vascular Smooth Muscle Cells and Action as a Carcinoma Cell Mitogen. *J. Cell. Biochem.* **1998**, *68*, 328–338. [CrossRef]
60. Laurent, V.; Guérard, A.; Mazerolles, C.; Le Gonidec, S.; Toulet, A.; Nieto, L.; Zaidi, F.; Majed, B.; Garandeau, D.; Socrier, Y.; et al. Periprostatic Adipocytes Act as a Driving Force for Prostate Cancer Progression in Obesity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10230. [CrossRef]
61. Guérard, A.; Laurent, V.; Fromont, G.; Estève, D.; Gilhodes, J.; Bonnelye, E.; Le Gonidec, S.; Valet, P.; Malavaud, B.; Reina, N.; et al. The Chemokine Receptor CCR3 Is Potentially Involved in the Homing of Prostate Cancer Cells to Bone: Implication of Bone-Marrow Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1994. [CrossRef] [PubMed]
62. Zhang, T.; Tseng, C.; Zhang, Y.; Sirin, O.; Corn, P.G.; Li-Ning-Tapia, E.M.; Troncoso, P.; Davis, J.; Pettaway, C.; Ward, J.; et al. CXCL1 Mediates Obesity-Associated Adipose Stromal Cell Trafficking and Function in the Tumour Microenvironment. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11674. [CrossRef] [PubMed]

63. Su, F.; Daquinag, A.C.; Ahn, S.; Saha, A.; Dai, Y.; Zhao, Z.; DiGiovanni, J.; Kolonin, M.G. Progression of Prostate Carcinoma Is Promoted by Adipose Stromal Cell-Secreted CXCL12 Signaling in Prostate Epithelium. *NPJ Precis. Oncol.* **2021**, *5*, 26. [CrossRef] [PubMed]
64. Sacca, P.A.; Creydt, V.P.; Choi, H.; Mazza, O.N.; Fletcher, S.J.; Vallone, V.B.F.; Scorticati, C.; Chasseing, N.A.; Calvo, J.C. Human Periprostatic Adipose Tissue: Its Influence on Prostate Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2012**, *30*, 113–122. [CrossRef]
65. Habib, C.N.; Al-Abd, A.M.; Tolba, M.F.; Khalifa, A.E.; Khedr, A.; Mosli, H.A.; Abdel-Naim, A.B. Leptin Influences Estrogen Metabolism and Accelerates Prostate Cell Proliferation. *Life Sci.* **2015**, *121*, 10–15. [CrossRef]
66. Bokobza, E.; Hinault, C.; Tiroille, V.; Clavel, S.; Bost, F.; Chevalier, N. The Adipose Tissue at the Crosstalk between EDCs and Cancer Development. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 691658. [CrossRef]
67. Quintana, P.J.E.; Delfino, R.J.; Korrick, S.; Ziogas, A.; Kutz, F.W.; Jones, E.L.; Laden, F.; Garshick, E. Adipose Tissue Levels of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 854–861. [CrossRef]
68. Charazac, A.; Hinault, C.; Dolfi, B.; Hautier, S.; Decondé Le Butor, C.; Bost, F.; Chevalier, N. Low Doses of PFOA Promote Prostate and Breast Cancer Cells Growth through Different Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7900. [CrossRef]
69. Lemaire, G.; Mnif, W.; Mauvais, P.; Balaguer, P.; Rahmani, R. Activation of Alpha- and Beta-Estrogen Receptors by Persistent Pesticides in Reporter Cell Lines. *Life Sci.* **2006**, *79*, 1160–1169. [CrossRef]
70. Okubo, T.; Yokoyama, Y.; Kano, K.; Soya, Y.; Kano, I. Estimation of Estrogenic and Antiestrogenic Activities of Selected Pesticides by MCF-7 Cell Proliferation Assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *46*, 445–453. [CrossRef]
71. Wong, L.I.L.; Labrecque, M.P.; Ibuki, N.; Cox, M.E.; Elliott, J.E.; Beischlag, T.V. P,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDT) and p,p'-Dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) Repress Prostate Specific Antigen Levels in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *230*, 40–49. [CrossRef] [PubMed]
72. Multigner, L.; Ndong, J.R.; Giusti, A.; Romana, M.; Delacroix-Maillard, H.; Cordier, S.; Jégou, B.; Thome, J.P.; Blanchet, P. Chlordecone Exposure and Risk of Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3457–3462. [CrossRef] [PubMed]
73. Emeville, E.; Giusti, A.; Coumoul, X.; Thomé, J.-P.; Blanchet, P.; Multigner, L. Associations of Plasma Concentrations of Dichlorodiphenyldichloroethylene and Polychlorinated Biphenyls with Prostate Cancer: A Case-Control Study in Guadeloupe (French West Indies). *Environ. Health Perspect.* **2015**, *123*, 317–323. [CrossRef] [PubMed]
74. Lee, J.; Scheri, R.C.; Zhang, Y.; Curtis, L.R. Chlordecone, a Mixed Pregnane X Receptor (PXR) and Estrogen Receptor Alpha (ERalpha) Agonist, Alters Cholesterol Homeostasis and Lipoprotein Metabolism in C57BL/6 Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *233*, 193–202. [CrossRef]
75. Moreira, Â.; Pereira, S.S.; Costa, M.; Morais, T.; Pinto, A.; Fernandes, R.; Monteiro, M.P. Adipocyte Secreted Factors Enhance Aggressiveness of Prostate Carcinoma Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123217. [CrossRef]
76. Ribeiro, R.; Monteiro, C.; Cunha, V.; Oliveira, M.J.; Freitas, M.; Fraga, A.; Príncipe, P.; Lobato, C.; Lobo, F.; Morais, A.; et al. Human Periprostatic Adipose Tissue Promotes Prostate Cancer Aggressiveness in Vitro. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2012**, *31*, 32. [CrossRef]
77. Xu, C.-J.; Dong, L.-L.; Kang, X.-L.; Li, Z.-M.; Zhang, H.-Y. Leptin Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis of Prostate Cancer Cells by Regulating ERK1/2 Signaling Pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2020**, *24*, 8341–8348. [CrossRef]
78. Noda, T.; Kikugawa, T.; Tanji, N.; Miura, N.; Asai, S.; Higashiyama, S.; Yokoyama, M. Long-term Exposure to Leptin Enhances the Growth of Prostate Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1535–1542. [CrossRef]
79. Chen, M.; Zhang, J.; Sampieri, K.; Clohessy, J.G.; Mendez, L.; Gonzalez-Billalabeitia, E.; Liu, X.-S.; Lee, Y.-R.; Fung, J.; Katon, J.M.; et al. An Aberrant SREBP-Dependent Lipogenic Program Promotes Metastatic Prostate Cancer. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 206–218. [CrossRef]
80. Labbé, D.P.; Zadra, G.; Yang, M.; Reyes, J.M.; Lin, C.Y.; Cacciatore, S.; Ebot, E.M.; Creech, A.L.; Giunchi, F.; Fiorentino, M.; et al. High-Fat Diet Fuels Prostate Cancer Progression by Rewiring the Metabolome and Amplifying the MYC Program. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4358. [CrossRef]
81. Dahran, N.; Szewczyk-Bieda, M.; Wei, C.; Vinnicombe, S.; Nabi, G. Normalized Periprostatic Fat MRI Measurements Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness in Men Undergoing Radical Prostatectomy for Clinically Localised Disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4630. [CrossRef] [PubMed]
82. Woo, S.; Cho, J.Y.; Kim, S.Y.; Kim, S.H. Periprostatic Fat Thickness on MRI: Correlation with Gleason Score in Prostate Cancer. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2015**, *204*, W43–W47. [CrossRef] [PubMed]
83. Roumiguié, M.; Estève, D.; Manceau, C.; Toulet, A.; Gilleron, J.; Belles, C.; Jia, Y.; Houël, C.; Pericart, S.; LeGonidec, S.; et al. Periprostatic Adipose Tissue Displays a Chronic Hypoxic State That Limits Its Expandability. *Am. J. Pathol.* **2022**, *192*, 926–942. [CrossRef]
84. Gucalp, A.; Iyengar, N.M.; Zhou, X.K.; Giri, D.D.; Falcone, D.J.; Wang, H.; Williams, S.; Krasne, M.D.; Yaghnam, I.; Kunzel, B.; et al. Periprostatic Adipose Inflammation Is Associated with High-Grade Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2017**, *20*, 418–423. [CrossRef] [PubMed]
85. Kaneko, A.; Satoh, Y.; Tokuda, Y.; Fujiyama, C.; Udo, K.; Uozumi, J. Effects of Adipocytes on the Proliferation and Differentiation of Prostate Cancer Cells in a 3-D Culture Model. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2010**, *17*, 369–376. [CrossRef] [PubMed]

86. Ribeiro, R.J.T.; Monteiro, C.P.D.; Cunha, V.F.P.M.; Azevedo, A.S.M.; Oliveira, M.J.; Monteiro, R.; Fraga, A.M.; Príncipe, P.; Lobato, C.; Lobo, F.; et al. Tumor Cell-Educated Periprostatic Adipose Tissue Acquires an Aggressive Cancer-Promoting Secretory Profile. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2012**, *29*, 233–240. [CrossRef] [PubMed]
87. Aaseth, J.; Javorac, D.; Djordjevic, A.B.; Bulat, Z.; Skalny, A.V.; Zaitseva, I.P.; Aschner, M.; Tinkov, A.A. The Role of Persistent Organic Pollutants in Obesity: A Review of Laboratory and Epidemiological Studies. *Toxics* **2022**, *10*, 65. [CrossRef]
88. Adesunloye, B.A. Mechanistic Insights into the Link between Obesity and Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3935. [CrossRef]
89. Evans, S.; Metcalfe, C.; Ibrahim, F.; Persad, R.; Ben-Shlomo, Y. Investigating Black-White Differences in Prostate Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 430–435. [CrossRef]
90. Rebbeck, T.R. Prostate Cancer Disparities by Race and Ethnicity: From Nucleotide to Neighborhood. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a030387. [CrossRef]
91. Khani, F.; Mosquera, J.M.; Park, K.; Blattner, M.; O'Reilly, C.; MacDonald, T.Y.; Chen, Z.; Srivastava, A.; Tewari, A.K.; Barbieri, C.E.; et al. Evidence for Molecular Differences in Prostate Cancer between African American and Caucasian Men. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 4925–4934. [CrossRef]
92. Meller, S.; Meyer, H.-A.; Bethan, B.; Dietrich, D.; Maldonado, S.G.; Lein, M.; Montani, M.; Reszka, R.; Schatz, P.; Peter, E.; et al. Integration of Tissue Metabolomics, Transcriptomics and Immunohistochemistry Reveals ERG- and Gleason Score-Specific Metabolomic Alterations in Prostate Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 1421–1438. [CrossRef] [PubMed]
93. Mathias, R.A.; Sergeant, S.; Ruczinski, I.; Torgerson, D.G.; Hugenschmidt, C.E.; Kubala, M.; Vaidya, D.; Suktitipat, B.; Ziegler, J.T.; Ivester, P.; et al. The Impact of FADS Genetic Variants on Ω6 Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in African Americans. *BMC Genet.* **2011**, *12*, 50. [CrossRef] [PubMed]
94. Castetbon, K.; Ramalli, L.; Vaidie, A.; Yacou, C.; Merle, S.; Ducros, V.; Deschamps, V.; Blateau, A. Consommations alimentaires et biomarqueurs nutritionnels chez les adultes de 16 ans et plus en Guadeloupe et Martinique. Enquête Kannari 2013–2014. *Bull. Épidémiologique Hebd.* **2016**, *4*, 52–62.
95. Kohlmeier, L.; Kohlmeier, M. Adipose Tissue as a Medium for Epidemiologic Exposure Assessment. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103* (Suppl. S3), 99–106. [CrossRef] [PubMed]
96. Baldi, I.; Botton, J.; Chevrier, C.; Coumoul, X.; Elbaz, A.; Goujon, S.; Jouzel, J.-N.; Monnereau, A.; Multigner, L.; Salles, B.; et al. *Inserm. Pesticides et effets sur la santé: Nouvelles données (2021)*; Collection Expertise Collective; INSERM: Paris, France; EDP Sciences: Les Ulis, France, 2021.
97. Friedenreich, C.M.; Wang, Q.; Neilson, H.K.; Kopciuk, K.A.; McGregor, S.E.; Courneya, K.S. Physical Activity and Survival After Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2016**, *70*, 576–585. [CrossRef]
98. Wang, Y.; Jacobs, E.J.; Gapstur, S.M.; Maliniak, M.L.; Gansler, T.; McCullough, M.L.; Stevens, V.L.; Patel, A.V. Recreational Physical Activity in Relation to Prostate Cancer-Specific Mortality Among Men with Nonmetastatic Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2017**, *72*, 931–939. [CrossRef]
99. Capece, M.; Creta, M.; Calogero, A.; La Rocca, R.; Napolitano, L.; Barone, B.; Sica, A.; Fusco, F.; Santangelo, M.; Dodaro, C.; et al. Does Physical Activity Regulate Prostate Carcinogenesis and Prostate Cancer Outcomes? A Narrative Review. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2020**, *17*, 1441. [CrossRef]

### Focus sur l'EPA, un AGPI clé dans la régulation de l'agressivité du CaP

Il existe différents types d'AG, que l'on classe notamment en fonction de leur degré d'insaturation, c'est-à-dire de leur nombre de double liaison carbone-carbone.
Chaque AG peut être désigné par son nom et/ou par sa formule en C**x:y** n-**z**, dans laquelle x désigne le nombre de carbones de la molécule, y le nombre d'insaturation et z la position de la double liaison la plus proche de l'extrémité méthyl. C'est le z qui donne le nom d'oméga 3, 6, 7 ou 9 aux AGPI.
Les AG proviennent en partie de l'alimentation, mais ils peuvent aussi être synthétisés *de novo* pour les AG saturés, ou à partir d'AG mono ou poly insaturés pour les autres (voir figure 8). Seuls les AGPI essentiels que sont l'AL (acide linoléique) et l'acide α-linolénique, ne peuvent pas être synthétisés par l'Homme et proviennent donc exclusivement de l'alimentation.

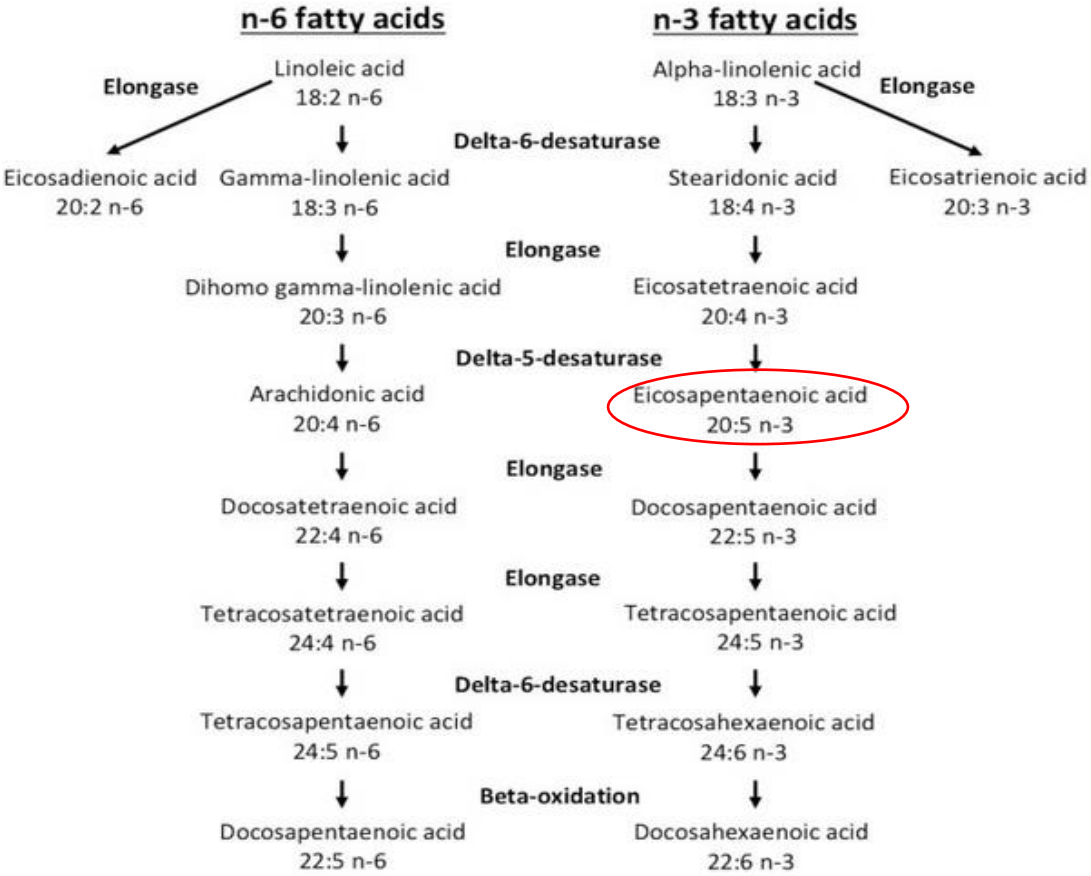


Figure 8 : Mécanismes de biosynthèse des AGPI omégas 3 et omégas 6 (98)

Parmi les omégas 3, au laboratoire nous nous intéressons tout particulièrement à l'EPA (acide eicosapentaénoïque) pour ses propriétés anti-tumorales comme évoqué un peu plus haut.
Cet intérêt vient notamment de l'étude d'une cohorte de patients avec un CaP, réalisée au sein du laboratoire (95). En effet, cette étude a permis d'observer que la teneur en EPA du TAPP était inversement corrélée à l'agressivité du CaP pour les patients caucasiens.

De plus différents travaux *in vitro* ont également observé un effet anti-tumoral de l'EPA. En effet, Rose et al. ont observé qu'un traitement par EPA diminuait la prolifération des PC3 et ce de façon dose-dépendante (99). Dans cette étude, un effet inhibiteur avait également été observé, dans une moindre mesure, sur les DU145. D'autres études ont montré une diminution de la viabilité cellulaire au cours du temps, que ce soit pour des PC3, des LNCaP ou des VCaP traités par EPA, ce qui semble être notamment dû à une augmentation de l'apoptose pour les PC3 (100–102). Une étude plus récente a également montré une diminution de la prolifération cellulaire des PC3 traitées par EPA mais elle a aussi observé une diminution de la migration et de l'invasion des PC3 (103). Lors d'autres travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire, il a d'ailleurs également été observé que le traitement par l'EPA des cellules prostatiques tumorales DU145 et PC3 diminuait la migration induite par le TGF-β, et aussi l'expression de marqueurs de la TEM comme le facteur de transcription Zeb1 (92).

Dans les cellules cancéreuses, la signalisation calcique est fortement perturbée par l'expression aberrante de protéines (canaux et échangeurs ioniques) et la formation d'onco-complexes régulant les flux calciques extra et intracellulaires. Ainsi durant le processus de TEM, l'entrée calcique dépendant des réserves en calcium du réticulum endoplasmique (aussi appelée SOCE pour Store Operated $Ca^{2+}$ Entry) est augmentée dans les cellules de CaP. Au laboratoire, il a été montré que l'EPA régule les entrées calciques dans les explants de tumeurs prostatiques humaines et dans des lignées cancéreuses prostatiques (92).

## 4. Rôle de l'épigénétique dans l'agressivité du CaP

Les principales modifications épigénétiques en lien avec des formes plus agressives de CaP sont résumées figure 6. Les mécanismes épigénétiques régulent l'expression du génome, sans modifier la séquence de l'ADN (104). Ces modifications du fonctionnement cellulaire peuvent être dues notamment à l'influence de facteurs environnementaux, comme l'alimentation (105). Par exemple, il a été observé *in vitro*, sur des lignées de CaP, qu'un traitement par phytoœstrogènes du soja entrainait une déméthylation des promoteurs de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur, et donc une activation de ces gènes, ce qui est en faveur d'un effet anti-tumoral (106). La génistéine, un de ces phytoœstrogènes, semble également pouvoir activer des gènes suppresseurs de tumeur en jouant sur l'acétylation des histones 3 et 4 (107).

### Méthylation de l'ADN

Les modifications de méthylation de l'ADN dans le CaP consistent soit en une hyperméthylation conduisant à la répression de l'expression du gène, soit en une hypométhylation permettant la transcription du gène, comme représenté figure 9.

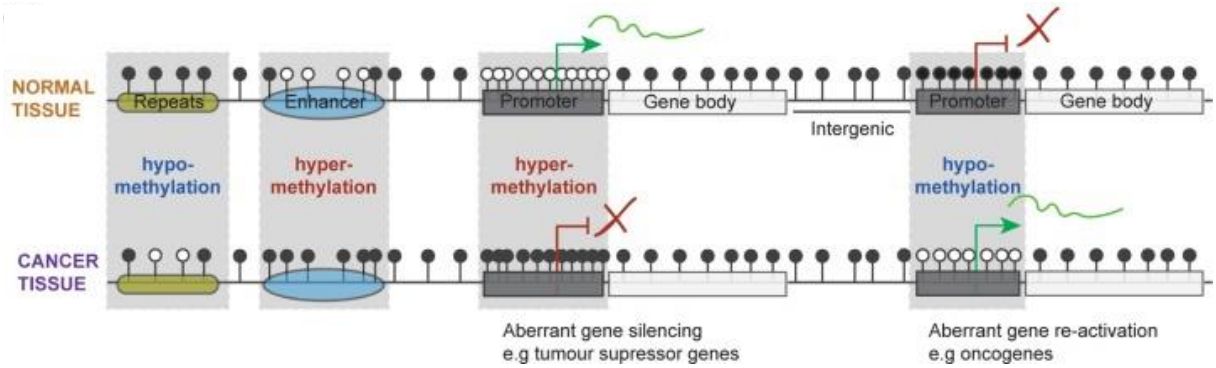



Figure 9 : Différence de méthylation du génome d'une cellule normale (ligne du haut) et d'une cellule cancéreuse (ligne du bas), *adapté de Skvortsova et al.* (108).
*Dans la cellule cancéreuse, les sites hypeméthylés entrainent un « silencing » des gènes suppresseurs de tumeur et les sites hypométhylés une augmentation de l'expression des oncogènes.*
*Légende : Rond blanc : CpG non méthylé. Rond noir : CpG méthylé.*

La méthylation de l'ADN consiste à l'ajout d'un groupe méthyl au carbone 5 de la cytosine des CpG (dinucléotides formés d'une cytosine précédant une guanine), par une enzyme de la famille des méthyltransférases de l'ADN (DNMT) (104). La méthylation qui en résulte est appelée 5-méthylcytosine (5mC). Une **hyperméthylation des îlots CpG** (une zone du gène d'environ 500 à 1000 paires de bases, riche en CpG) du promoteur d'un gène va conduire à l'inhibition de l'expression de ce gène (« gene silencing »). C'est un mécanisme de régulation fréquemment rencontré dans le CaP, conduisant à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (figure 9). On note d'ailleurs que chaque type de cancer a son « hyperméthylome » propre (109). Les gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquemment hyperméthylés dans le CaP pouvant être des gènes de réparation de l'ADN (*GSTP1, MGMT*), du contrôle du cycle cellulaire (*CDKN2, p16, RASSF1A*), de suppression de la croissance (*APC, RARβ*), de l'apoptose (*DAPK, DCR1et2, FHIT, TMS1, XAF1*) ou encore de l'adhésion cellulaire (*CDH1* qui est le gène de la E-cahérine, *CDH13, CD44*) (110–115), voir tableau 6.

Tableau 6 : Principaux gènes hyperméthylés dans le CaP, adapté de (104,112,113)

| Gène | Fonction | Fréquence d'hyperméthylation (%) |
|---|---|---|
| ***GSTP1*** | Réparation de l'ADN | 36-100 |
| ***MGMT*** | Réparation de l'ADN | 0-88 |
| ***CDKN2*** | Cycle cellulaire | 0-66 |
| ***RASSF1*** | Cycle cellulaire | 53-96 |
| ***APC*** | Suppresseur de croissance | 27-90 |
| ***RARβ*** | Suppresseur de croissance | 53-79 |
| ***DCR1, DCR2*** | Apoptose | 60 |
| ***TMS1*** | Apoptose | 64 |
| ***XAF1*** | Apoptose | 35 |
| ***CDH1*** | Adhésion cellulaire | 27-70 |
| ***CDH13*** | Adhésion cellulaire | 31 |
| ***CD44*** | Adhésion cellulaire | 32-78 |
| ***MDR1*** | Pompe d'efflux transmembranaire Calcium-dépendante | 55 |

Cependant, on observe dans les cancers une **hypométhylation globale** par diminution du niveau de méthylation habituellement observé dans les cellules normales, qui est mesurée par une diminution globale de 5mC dans le génome (115,116). L'hypométhylation est associée à la conversion, par les enzymes TET (TET1, TET2 et TET3 ; TET signifie « ten-eleven translocation »), des 5mC tout d'abord en 5hmC (5-hydroxyméthylcytosine) puis en 5-formylcytosine et 5-carboxylcytosine, pour enfin arriver à une cytosine standard (114). Contrairement à la marque épigénétique 5mC, la 5hmC est d'ailleurs davantage détectée dans les régions transcriptionnellement actives, et est donc associée à l'expression de nombreux gènes (114,117). Elle est notamment retrouvé au niveau de « drivers » du CaP tels que le *RA*, *EZH2* (« enhancer of zeste homolog 2 », histone méthyltransférase qui catalyse la triméthylation de H3K27 pour former H3K27me3), *CDK1* (« cyclin-dependent kinase 1 », participe à la régulation du cycle cellulaire), *TBX3* (« T-box transcription factor 3 », facteur

de transcription), *HOXA13* (« homeobox A13 », facteur de transcription) et *FOXA1* (« forkhead box A1 », facteur de transcription) (117).
On peut observer une hypométhylation de l'ADN sur des îlots CpG de promoteurs de proto-oncogènes (figure 9) (104). Ceci conduit alors à l'activation d'oncogènes, par exemple en levant la répression habituellement en place sur le deuxième allèle du gène. Elle peut aussi faciliter la modification d'un gène habituellement réprimé (118). L'hypométhylation peut être aussi être due à une diminution de la méthylation d'îlots CpG ailleurs dans le génome, par exemple sur des séquences répétitives comme celles des rétrotransposons LINE-1, qui sont estimés contenir 17% du génome humain et sont disproportionnément méthylés à l'état normal par rapport au reste du génome (115). Les gènes fréquemment hypométhylés dans le CaP sont décrits dans le tableau 7.
Tout cela entraîne *in fine* une plus grande **instabilité chromosomique** dans les cellules cancéreuses.

Tableau 7 : Principaux gènes hypométhylés dans le CaP, adapté de (104,116)

| **Gène** | **Nom** | **Loc. chrom.** | **Rôle/fonction** |
|---|---|---|---|
| ***LINE-1*** | Retrotransposable element 1 | 22 | Rétrotransposon |
| ***uPA*** | Urokinase plasminogen activator | 10q24 | Invasion tumorale,<br>Développement de métastases |
| ***PLAU*** | | 10q22 | Protéolyse, fibrinolyse |
| ***HPSE*** | Heparanase | 4q21 | Angiogenèse,<br>Développement de métastases,<br>Communication cellulaire,<br>Transcription de gènes,<br>Autophagie |
| ***CYP1B1*** | Cytochrome P450, family 1, subfamiliy B, polypeptide 1 | 2p22 | Réactions redox,<br>Activation de pro-carcinogènes |
| ***CAGE*** | Cancer/testis antigen | 6p24 | Oncogène |
| ***WNT5A*** | Wingless-type MMTV integration site family, member 5A | 3p21 | Modulation de la transcription,<br>Oncogène |
| ***CRIP1*** | Cysteine-riche protein 1 | 14q32 | Transporteur intra-cell. de protéines zinc,<br>Oncogène |
| ***S100P*** | S100 calcium binding protein P | 2q37 | Contrôle de l'expression génique,<br>Oncogène |

*Abréviations : loc. chrom. : localisation chromosomique, cell. : cellulaire*

### Influence de la méthylation sur l'agressivité du CaP

Il semblerait que l'**hypométhylation globale** survienne plus tardivement que l'hyperméthylation des ilôts CpG des régions promotrices, et plus tardivement dans le CaP que pour les autres cancers (119). Il a en effet été observé une diminution de la méthylation globale au stade métastatique comparativement aux tissus sains, sans différence significative mesurée entre les tissus sains et le CaP à un stade localisé (104,119,120). Il a même été constaté une variation de l'hypométhylation globale (mesurée par la diminution d'expression de 5mC en IHC) d'un site métastatique a un autre pour un même patient (119). Ce constat renforce l'hypothèse d'une hypométhylation tardive, se développant après l'évolution métastatique du CaP, ce qui expliquerait qu'elle ne soit pas détectable de façon uniforme d'une métastase à une autre (119).
Cependant, les résultats d'autres études, dont notamment une étude réalisée sur un grand effectif de patients (plus de 300 échantillons par groupe), sont en faveur d'une hypométhylation (ici aussi mesurée par une diminution du marquage en 5mC en IHC) qui s'amorcerait plus précocement, puisqu'elle débuterait dès le stade de CaP localisé (121–123).
Concernant l'expression de 5hmC, une étude récente a montré que la cartographie des gènes liés à 5hmC est corrélée au stade de la maladie, les profils étant différents entre les tissus bénins, les CaP localisés et les CPMRC (117). Dans cette étude, les auteurs montrent d'ailleurs que la teneur en 5hmC de gènes cibles, dans l'ADN circulant de patients avec un CaP métastatique, permet d'identifier les formes agressives de la maladie. En effet, la survie globale des patients est significativement diminuée lorsque certains oncogènes du CaP (dont *RA, MYC* et *NCOA2* = « nuclear receptor coactivator 2 ») sont enrichis en 5hmC et/ou lorsque des gènes suppresseurs de tumeurs sont appauvris en 5hmC (dont *RB1* = « gène du rétinoblastome », *PTEN, TP53* = « tumor protein 53 », *BRCA2, NKX3.1* = « homeobox Nkx-3.1 »). Cette étude montre également le même effet sur la survie globale en s'intéressant à la teneur en 5hmC de seulement deux gènes : *TOP2A* (« DNA topoisomerase IIα ») et *EZH2*, dont l'expression au sein du tissu cancéreux est associée au pronostic du CaP. Dans une autre étude, le niveau d'expression de 5hmC était significativement associé avec le risque de rechute biochimique post prostatectomie (121).

L'**hyperméthylation** des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur, semble aussi être corrélée à l'agressivité du CaP. Par exemple une étude a montré que l'hyperméthylation des promoteurs des trois gènes *APC, GSTP1* et *MDR1* (« multidrug resistance 1 », gène codant pour une glycoprotéine P, une pompe d'efflux transmembranaire calcium-dépendante) était corrélée avec les différents facteurs de mauvais pronostics du CaP (que ce soit le stade pT, le score de Gleason, le taux de PSA initial, le stade pN) (113). De façon similaire les promoteurs de *CDH13* (« cadhérine 13 »), *GSTP1, RARβ* et *RASSF1* étaient plus fréquemment méthylés dans les CaP avec score de Gleason élevé par rapport à ceux de Gleason plus bas (112). Et les promoteurs de *CDH1, GSTP1* et *RASSF1A* étaient également plus fréquemment méthylés pour les CaP dont le PSA était plus élevé (112).
Une étude s'intéressant à l'ensemble des zones hyperméthylées, a montré un profil de méthylation différent des CaP agressifs (ayant un score de Gleason élevé) par rapport aux CaP indolents et aux tissus prostatiques non cancéreux (124). Les hyperméthylations se situaient soit sur des promoteurs, ce qui entrainait une diminution de la transcription des gènes

concernés, comme pour *CCDC8* (« Coiled-coil domain-containing protein 8 », un gène suppresseur de tumeur), soit dans les corps des gènes, ce qui semblait avoir alors des effets variables (de répression ou de transcription du gène), comme *EZH2* ou *HOXC4* (« homeobox C4 », facteur de transcription d'oncogènes) dont la méthylation entraine une transcription. Pour les CaP agressifs, l'ensemble des gènes réprimés en cas d'hyperméthylation étaient des gènes dont la faible expression était corrélée à une moins bonne survie. Et les gènes dont la transcription était plus importante en cas d'hyperméthylation étaient impliqués dans l'agressivité du CaP, en participant à favoriser la motilité cellulaire par exemple.
Il semble donc qu'il existe différents profils de méthylation dans le CaP, reflétant son hétérogénéité biologique. En effet, d'autres études ont déterminé quatre profils de méthylation différents pour le CaP localisé (125) et différents profils pour le CPMRC, dont notamment un cluster de CPMRC « hyperméthylé » et un cluster correspondant au CPNE (126). Plusieurs autres études ont également observé une « signature épigénétique » spécifique des formes neuroendocrines, *via* leur profil de méthylation (117,127).
Ceci laisse penser que le profil de méthylation et notamment l'expression de 5hmC pourrait être un marqueur pronostic du CaP, et ce d'autant plus facilement techniquement, qu'il peut être détecté dans l'ADN libre circulant du plasma du patient (117).

### Modification des histones dans le CaP

Un autre mécanisme épigénétique consiste à modifier les histones sur leur partie N-terminale (par acétylation, méthylation, phosphorylation ou ubiquitination), comme résumé dans le tableau 8 (104,105). Or les histones ont pour rôle d'organiser et compacter l'ADN en le faisant s'enrouler sur les nucléosomes, des octamères formés de deux copies de chacun des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 (100). En fonction de la modification des histones, la chromatine sera plus ou moins compacte, et cela va donc induire l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'activation d'oncogènes (104).

Tableau 8 : Modifications des histones dans le CaP, adapté de (104)

| **Modification** | **Histone modifié** | **Régulation transcriptionnelle** |
|---|---|---|
| **Acétylation** | H3K9, H3K18, H3K27, H4K12 | Activation |
| **Méthylation** | H3K4 (me1 à 3) | Activation |
| | H3K9 (me2 et 3), H3K27 (me3), H4K20 (me1 et 2) | Répression |
| **Phosphorylation** | H3T6, H3T11, H4T88 | Activation |
| **Ubiquitination** | H2A, H2B | Répression |

*Abréviations : me1 = monométhylation, me2 = diméthylation, me3 = tri méthylation*

L'acétylation de la lysine (par exemple pour **H3K27ac :** acétylation de la lysine 27 de l'histone H3) par une HAT (histone acétyltransférase), va entraîner la transcription du gène, voir figure 10, c'est ce que l'on appelle une marque épigénétique « active » (104). Ce mécanisme d'acétylation est équilibré par l'action des HDAC (histone désacétylase) qui jouent le rôle inverse des HAT. La méthylation de la lysine par les HMT (histones méthyltransférase) peut en revanche jouer un rôle répressif ou d'activation de transcription, selon la lysine qui est concernée. L'action des HMT est elle aussi contrebalancée par celle des HDM (histone déméthylase). Par exemple, la méthylation de H3K4, H3K26 ou H3K79 va être activatrice, alors que celle de H3K9, H3K27 ou H4K20 sera inactivatrice. Concernant H3K27 par exemple, EZH2 est l'HMT qui catalyse la triméthylation de H3K27 pour former **H3K27me3**, ce qui va alors inactiver la transcription du gène, voir figure 10, ce qu'on appelle alors une marque épigénétique « répressive ».

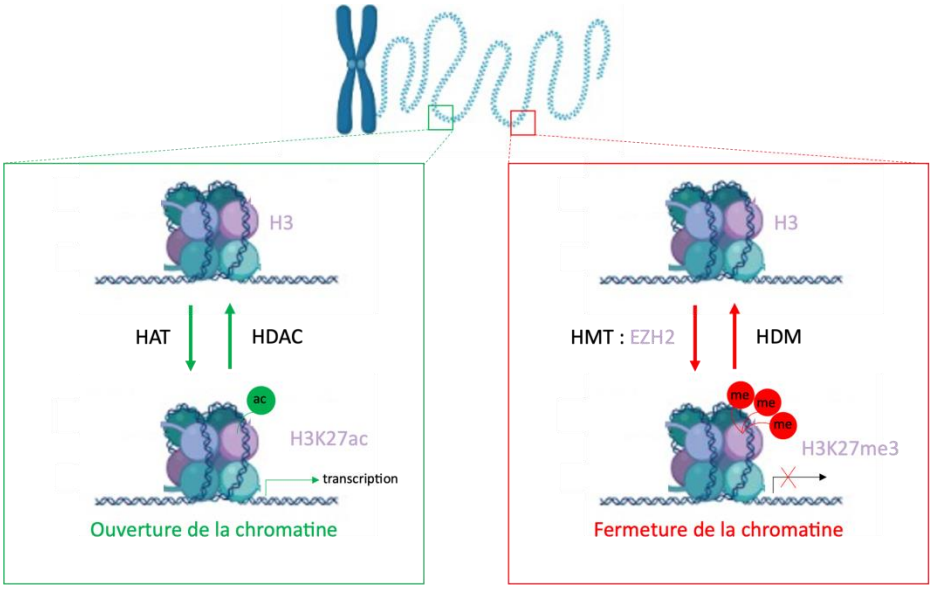



Figure 10 : Exemples de modifications d'histone dans le CaP.
*Abréviations : ac = acétylation, me = méthylation. HAT : histone acétyltransférase, HDAC : histone désacétylase, HDM : histone déméthylase, HMT : histones méthyltransférase.*

Il semblerait que les histones puissent être modifiés par les androgènes. En effet, le RA recrute des HAT, ou leurs coactivateurs, sur les promoteurs ou les « enhancers » de certains de ses gènes cibles (comme le *PSA*) entrainant l'activation de leur transcription (128). De plus, des HDM peuvent être recrutées par des mécanismes dépendant des androgènes, entrainant alors une inactivation de transcription des gènes d'aval (129).

### Influence de ces modifications d'histone sur l'agressivité du CaP

Le niveau **d'acétylation global d'H3** est moins important dans les tissus de CaP que dans les tissus sains de prostate (130,131). Cette observation est confortée par plusieurs études montrant une suractivité des HDAC dans le CaP (130,132). D'autres études ont retrouvé une corrélation entre l'expression des HDAC et l'agressivité du CaP. En effet, l'expression d'HDAC1 apparaît augmentée en cas de CPRC par rapport au CaP localisé (133), et les

expressions d'HDAC1 et 2 semblent être corrélées au score de Gleason des CaP localisés (132).
Cependant, dans une étude *in vitro* sur un modèle cellulaire DU145, il a été montré que les lactates produits par les CAFs favorisent l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules cancéreuses et y induisent la formation d'acétylCoA, la principale source de carbones utilisés pour l'acétylation des histones (134). Il a d'ailleurs été observé une plus forte acétylation de l'H3K27, et une plus forte capacité d'invasion des cellules. Sur un modèle *in vivo* de xénogreffe de DU145, le prétraitement des cellules par des lactates ou du milieu conditionné de CAF a entraîné un plus grand nombre de métastases pulmonaires que pour les xénogreffes contrôle. Ceci laisse donc supposer que l'augmentation d'H3K27ac pourrait participer à induire une plus grande agressivité du CaP, dans les limites d'un modèle cellulaire RA négatif. Ces résultats sont donc à confirmer sur d'autres modèles, et pour vérifier qu'il est bien décrit un effet spécifique dû à l'acétylation d'H3K27 et pas un effet des lactates sur d'autres voies biologiques.
De façon similaire, sur une cohorte de 71 prostatectomies, la marque H3K18ac est davantage exprimée dans les noyaux des cellules cancéreuses par rapport aux tissus sains, et augmente encore davantage dans les localisations métastatiques par rapport aux tumeurs prostatiques primitives (135). Son niveau d'expression est significativement associé au risque de rechute biochimique (135,136).

En ChIP (immunoprécipitation de la chromatine), la marque **H3k27me3** est identifiée dans davantage de régions promotrices dans les CaP localisés par rapport à des contrôles sains, et d'autant plus fréquemment détectée que le score de Gleason est élevé (137). Une autre étude a aussi montré un enrichissement en H3K27me3 sur différents gènes cibles (*RARβ2, ERα, PGR, RGMA*) pour les CaP localisés comparés à des tissus sains et d'autant plus quand le Gleason était plus élevé (138). Il semblerait donc que le niveau d'expression de H3K27me3 soit associé à l'agressivité du CaP localisé.
En IHC, H3K27me3 était cependant observé à un niveau d'expression globale similaire dans les CaP localisés comparativement aux tissus sains (139,140). De façon intéressante, cette étude montrait de plus, que l'expression de H3K27me3 augmentait dans les formes métastatiques (résistantes ou non la castration) par rapport aux CaP localisés ou aux tissus sains (139).
Au contraire, dans une étude sur ADN libre circulant, il a été constaté un niveau plus élevé d'H3K27me3 dans les CaP localisés comparativement aux CaP métastatiques (141). Cependant ces résultats sont délicats à appréhender puisque les prélèvements ont été fait alors que les patients avaient déjà reçu un traitement (au minimum une suppression androgénique). Il n'y avait pas non plus d'analyse tissulaire pour pouvoir comparer le niveau d'expression de H3K27me3 dans la région intratumorale avec celle obtenue à partir des dosages plasmatiques.

Même si des études ont montré que l'expression d'H3K27me3 n'était pas nécessairement corrélée à celle d'EZH2 (l'HMT en charge de la triméthylation d'H3K27) dans le CaP (140), EZH2 est tout de même elle aussi fortement surexprimé dans les CPMRC, et elle constitue aussi un marqueur de mauvais pronostic quand elle est élevée dans le CaP localisé (142,143). Il semblerait qu'au stade de résistance à la castration, EZH2 joue plutôt un rôle de

coactivateur de facteurs de transcription et notamment de coactivateur du RA, indépendamment de son rôle répresseur *via* la méthylation d'H3K27 (144,145). Plusieurs travaux ont aussi démontré le rôle important d'EZH2 dans la transdifférenciation NE du CaP, ainsi qu'une surexpression d'EZH2 dans les CPNE, ce qui en fait une cible thérapeutique d'intérêt, notamment dans l'objectif d'éviter la transdifférentiation du CaP en forme NE sous la pression des traitements anti-androgènes (105,127,146,147).

Enfin, il a été observé, du moins chez le rongeur, que des modifications de l'alimentation pouvaient ralentir la croissance tumorale avec un effet sur les marques épigénétiques, notamment sur l'acétylation et/ou la méthylation des histones.
Par exemple, sur un modèle de xénogreffe de PC3 sur des souris, il a été observé une diminution de la croissance tumorale lorsque l'alimentation était enrichie en sulforaphane (un isothiocyanate retrouvé dans les légumes crucifères comme le brocoli) (148). Ce ralentissement de la croissance tumorale était associé à une baisse d'activité significative des HDACs, et à une tendance à l'augmentation du niveau global d'acétylation des histones dans les xénogreffes. Ces résultats ont été confortés *via* un modèle *in vivo* de souris TRAMP, dans lequel il a été montré qu'un régime riche en pousses de brocoli, ou en sulforaphane, diminuait significativement : la survenue de CaP par rapport aux souris alimentées avec un régime contrôle, ainsi que la survenue de métastases pulmonaires (149,150). Ce phénomène était de plus associé à une diminution de l'expression de : HDAC3, H3K18ac et H3K27me3 (149).
A noter qu'une autre étude n'a pas observé de diminution d'incidence de CaP sur ce même modèle de souris TRAMP, après enrichissement de l'alimentation en brocoli (151). Cela pourrait s'expliquer par la plus faible quantité de brocolis dans ce régime par rapport aux autres régimes publiés et son initiation à un âge plus tardif.
Il reste à voir si ces résultats seront transposables chez l'homme. Une première étude réalisée sur volontaires sains est encourageante puisqu'elle a montré que la prise d'un bagel contenant 68g de pousses de brocoli induisait une inhibition des HDAC et une acétylation des histones (148).

### Rôle des microARNs (miARNs) dans le CaP

Un autre mécanisme régulant l'expression des gènes est lié à l'expression de différents ARN non codants, les plus fréquemment impliqués étant les **microARNs** (ou miARNs). Ce sont des ARN de petite taille (composés d'une vingtaine de nucléotides), qui ont pour rôle de réguler l'expression des gènes après leur transcription en se liant à leur ARN messager (ARNm) cible, ce qui va entraîner la dégradation de l'ARNm ou au moins inhiber sa traduction en protéine (152). Par exemple, mir-185 cible directement l'ARNm codant pour le RA et va alors entraîner une diminution de l'expression du RA (153).
De nombreux miARNs semblent impliqués dans la progression du CaP. Certains semblent jouer un rôle de suppresseur de tumeur, notamment mir-1, le cluster mir-30c/29b, mir-34a, mir-96-5p, mir-205 et mir-134-5p, qui sont moins exprimés dans le CaP que dans les tissus prostatiques bénins (154–158). Il a été montré que mir-205 pouvait réguler la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses, en ciblant Zeb1 et Zeb2 (159).

D’autres miARNs auraient plutôt une fonction d’oncogène dans le CaP (152). Par exemple, mir-21 est surexprimé dans de nombreux cancers dont le CaP, et son niveau d’expression est corrélé au score de Gleason (160,161). Il a de plus été montré, *in vitro*, que ce miARN était impliqué dans la prolifération, la migration et l’invasion cellulaires ainsi que dans l’inhibition de l’apoptose (161–163). Ainsi de nombreux miARNs semblent participer à la régulation de l’agressivité du CaP. Par exemple, la surexpression de mir-1246 dans les exosomes (vésicules extracellulaires de petite taille qui peuvent être notamment analysées à partir d’un prélèvement sanguin) de patients avec un CaP a été identifié comme marqueur d’agressivité du cancer (164). Cette étude a notamment montré que la surexpression de mir-1246 dans des xénogreffes de CaP, ralentissait la croissance tumorale *in vivo*. Des résultats complémentaires *in vitro* sur des cellules PC3 ont montré que mir-1246 augmentait l’apoptose, diminuait la prolifération, l’invasion et la migration, et inhibait l’expression de marqueurs de la TEM (la vimentine et la N-cadhérine). D’autres miARNs semblent également directement impliqués dans le développement des formes neuroendocrines (165). Par exemple, mir-375, mir-663 et mir-708 permettent d’induire l’expression de gènes neuroendocrines, ou encore mir-125b, mir-221-3p et mir-301a ont été rapportés comme contribuant indirectement à l’émergence de CPNE induits par les traitements en modulant des voies de signalisations cellulaires induisant une indépendance vis-à-vis du RA (166,167).

## 5. Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans l'agressivité du CaP

### Définition de la TEM

La TEM est un mécanisme dynamique, réversible et finement régulé qui permet aux cellules épithéliales d'acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses en modifiant non seulement leur architecture mais aussi leurs fonctionnalités (168). Au cours de la TEM, la cellule épithéliale cuboïde perd ses protéines d'adhésion cellulaire, sa polarité et modifie sa structure *via* le réarrangement de son cytosquelette. Ceci aboutit à une cellule fusiforme, isolée des autres cellules, ayant acquis des propriétés de migration et d'invasion, ce qui va permettre le développement de métastases. La TEM permet également à la cellule d'acquérir des propriétés de cellules souches telles que la capacité d'auto-renouvellement et de pluripotence (169). Ce phénomène est bien décrit dans le cancer, mais de plus en plus, il semblerait que les cellules cancéreuses ne subissent qu'une TEM partielle, définie par l'acquisition de marqueurs mésenchymateux mais sans qu'elles ne perdent l'ensemble de leurs marqueurs épithéliaux, ce qui peut permettre aux cellules d'avoir des capacités d'invasion/migration mais aussi de prolifération (170). Le concept de TEM dans le cancer, et ses différents marqueurs, sont résumés sur la figure 11.

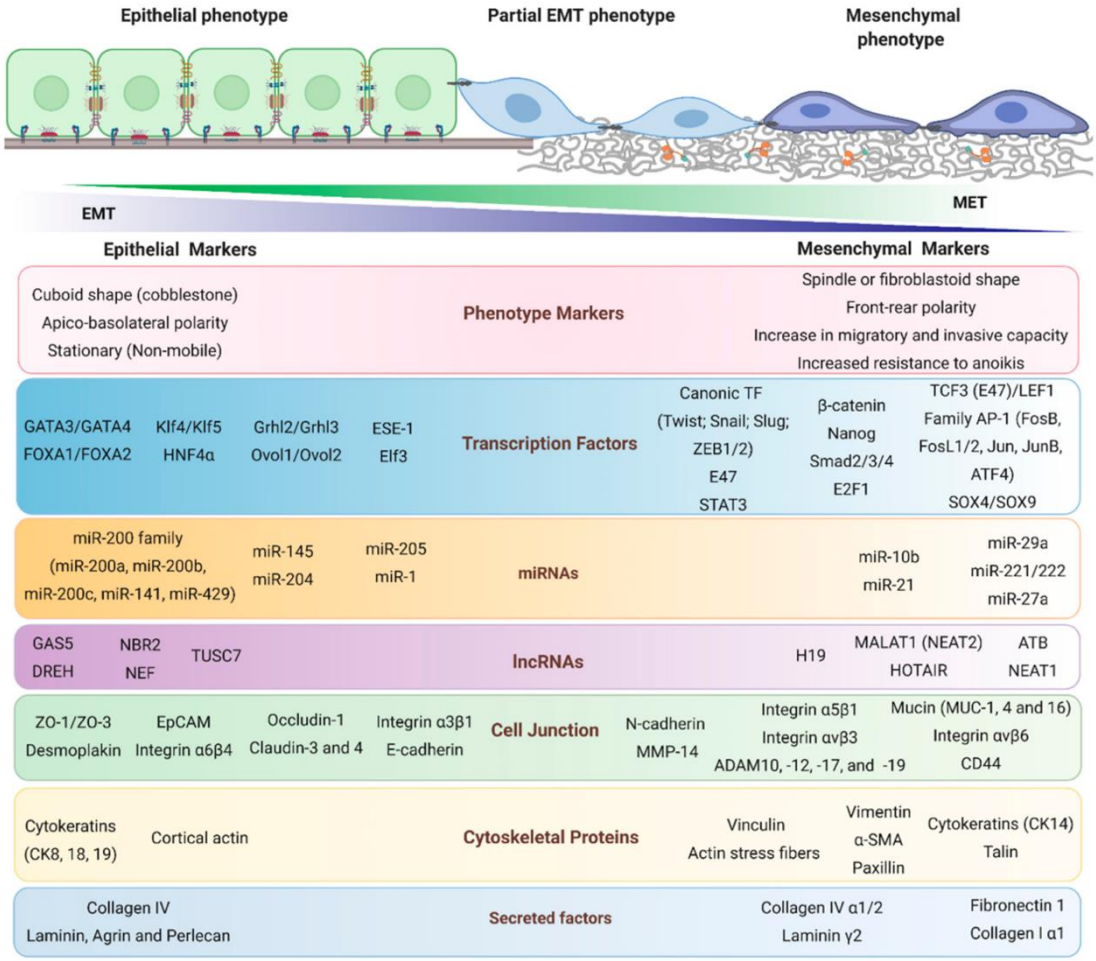



Figure 11 : Les différents marqueurs qui ont pu être impliqué dans la TEM des cancers (170).
*Abréviations : EMT : transition épithélio-mésenchymateuse, lncRNAs : longs ARNs non codant ; MET : transition mésenchymato-épithéliale ; miRNAs : microARNs.*

### Marqueurs impliqués dans la TEM du CaP

Lors de la TEM, les cellules du CaP expriment significativement moins la E-cadhérine (marqueur épithélial), et à l'inverse, significativement plus la N-cadhérine (marqueur mésenchymateux) (171). La vimentine est un composant du cytosquelette qui est lui aussi considéré comme marqueur mésenchymateux. Enfin, lors de la TEM, on observe la sécrétion par les cellules cancéreuses de MMPs, des enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire par digestion du collagène et de la laminine, ce qui favorise ainsi l'invasion cellulaire.

*In vitro* sur des lignées de CaP, on constate une forte expression de N-cadhérine dans les lignées résistantes à la castration comparativement aux lignées sensibles aux androgènes (172). La N-cadhérine entraîne la migration et l'invasion des cellules du CaP (172). D'ailleurs sur une cohorte de patients, le taux d'échantillons exprimant la N-cadhérine est lié au stade du CaP. En effet, alors qu'elle est rare pour les cancers non traités, l'expression de la N-cadhérine augmente lorsque les patients reçoivent une suppression androgénique et encore plus chez les CPRC (172). Ces marqueurs sont aussi corrélés au pronostic du CaP. Ainsi, une faible expression membranaire de la E-cadhérine et une forte expression membranaire de la N-cadhérine ont été corrélées à un pronostic défavorable du CaP, notamment en termes de risque de rechute biochimique (171).

Plusieurs facteurs de transcription interviennent dans la TEM du CaP, notamment les protéines des familles de Snail, Twist et Zeb.

La famille Snail comprend trois protéines : Snail1 (généralement appelée Snail), Snail2 (aussi appelée Slug) et Snail3 (aussi appelée Smuc). Ce sont des protéines à doigt de zinc, qui se lient à leur ADN cible au niveau des boites E. Snail participe activement à la TEM en exerçant notamment un rôle de suppresseur transcriptionnel pour la E-cadhérine, et en augmentant l'expression de la vimentine (173–176). Snail peut aussi réprimer l'expression de différentes protéines de jonction cellulaires (claudin, occludin), et induire l'expression de MMP-2, MMP-9 ou encore de la fibronectine (177).

Sur des tissus humains de CaP, la protéine Snail est surexprimée dans le tissu tumoral par rapport à des tissus prostatiques non tumoraux et est encore plus fortement exprimée en cas de CaP métastatiques comparativement aux CaP localisés (178–180). Il a aussi été constaté une plus forte expression des ARN codant pour Snail dans les CaP par rapport aux échantillons non tumoraux et également dans les CaP métastatiques par rapport aux CaP localisés (181). De plus, l'intensité d'expression de Snail est corrélée à l'agressivité du CaP (notamment au score de Gleason), et même à la survie globale des patients (175,178,180,182,183). Par ailleurs, il semblerait que Snail puisse favoriser la transdifférenciation neuroendocrine. En effet, il a été observé que des LNCaP transfectées pour surexprimer Snail pouvaient acquérir un phénotype neuroendocrine (NSE et Chromogranine A) (184).

La participation de Slug dans la TEM du CaP semble moins claire. Il a été observé *in vitro* que Slug promouvait la migration et l'invasion des cellules de CaP, en diminuant l'expression de la E-cadhérine et en augmentant celles de la vimentine et de la MMP-9 (185,186). Mais, contrairement à ce qui est établi pour Snail, les études sur tissus humains n'identifient pas toujours de corrélation entre l'expression de Slug et le pronostic des CaP que ce soit sur le stade clinique (localisé versus métastatique) ou le score de Gleason. Des études ont montré

que l'expression de Slug augmentait en cas de CaP par rapport à du tissu prostatique non tumoral et aussi en cas de CPRC et/ou de CaP métastatique par rapport au CaP localisé (183,187,188). Cependant d'autres travaux ont rapporté une diminution de l'expression de Slug pour les CaP localisés et CPRC par rapport aux échantillons de prostate non tumoraux (189). De façon similaire, une étude a identifié une corrélation entre l'expression de Slug et le score de Gleason (183) sans que cela soit confirmé dans une autre étude (180).

Une autre famille de facteurs de transcriptions impliqués dans la TEM du CaP est la famille Twist, qui est composée de deux protéines : Twist1 et Twist2. Ces facteurs de transcription se lient à l'ADN au niveau des boîtes E, comme les protéines Snail. Elles participent d'ailleurs elles aussi activement à la TEM en inhibant l'expression de la E-Cadhérine, et en favorisant également l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine (190). *In vitro*, les cellules de CaP migrent plus rapidement quand elles surexpriment Twist1, elles sont également plus invasives, et sur des modèles de xénogreffe, *in vivo*, elles métastasent davantage. L'inhibition de l'expression de Twist1 rend les DU145 et PC3 (lignées androgène-indépendantes) moins invasives, et diminuent également leur capacité de migration (191).
Twist est surexprimé dans un grand nombre de cancers, dont les CaP, par rapport au tissu non tumoral, avec une expression encore plus importante dans les localisations métastatiques que dans les tissus primitifs de CaP (190–192). Dans le CaP, l'expression accrue de Twist est associée à des critères d'agressivité dans les cancers localisés, notamment au score de Gleason (190–192), et au stade métastatique comparé aux prélèvements à un stade localisé (192).

### Focus sur Zeb1, facteur de transcription-clé de la TEM dans le CaP

Zeb1 fait partie de la famille des protéines appelées « Zinc-Finger E-box-Binding », constituée de deux membres avec Zeb2.
Les protéines Zeb1 et Zeb2 participent à la régulation de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans le CaP. En effet, *in vitro* sur des lignées de CaP, Zeb1 réprime l'expression de la E-Cadhérine (193) et entraîne l'expression de la vimentine (194). De plus, Zeb1 facilite la migration et l'invasion des cellules de CaP (193,194). Des résultats similaires ont été montrés pour Zeb2. Ces facteurs de transcription participent à l'acquisition de propriétés de cellules souches (195). La relation entre Zeb1 et E-cadhérine semble toutefois plus complexe *in vivo*, les deux marqueurs ayant été fréquemment retrouvés coexprimés non seulement dans des xénogreffes de DU145 dans des tibias de souris mais également dans une cohorte de tissus métastatiques osseux de patients (196).
Les protéines Zeb1 et Zeb2 sont surexprimées dans les CaP (168). L'expression de Zeb1 augmente avec les facteurs d'agressivité du CaP que ce soit le score de Gleason (183,193,194) ou le stade pT (197). L'expression de Zeb1 augmente également dans les CaP métastatiques et les CPRC par rapport aux CaP localisés et est associée, dans les CaP métastatiques, à une diminution significative du taux de survie globale (197). Zeb1 est donc un marqueur d'agressivité et de mauvais pronostic du CaP.
Les androgènes sont capables de réguler l'expression du gène Zeb1, *via* ses deux ARE situés sur son promoteur (198).

Des tests *in vitro* sur différentes lignées de CaP ont montré que l'expression de Zeb1 et d'autres facteurs de transcriptions impliqués dans la TEM comme Zeb2, Snail et Twist, était induite par une suppression androgénique ou un traitement par enzalutamide (168,199). Ces résultats ont été confortés lors de l'analyse de l'expression des ARNm de CaP de patients traités ou non par suppression androgénique. De plus, dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une rétro boucle négative bidirectionnelle entre le RA et Zeb1 (168). Le traitement par enzalutamide conduisait également à l'expression de différents marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, fibronectine, vimentine), et aussi à une augmentation de la migration cellulaire (199).
Il est par ailleurs possible que l'émergence de variants du RA induise l'expression de Zeb1, comme cela a pu être retrouvé *in vitro*, dans une étude qui a montré qu'en présence de certains variants du RA (ARQ640X et ARV7), les marqueurs de la TEM, dont Zeb1, étaient surexprimés (41). Cependant, cette surexpression de Zeb1 n'a pas été observée pour le variant ARV7 dans une autre étude réalisée avec une approche similaire (200).
Enfin, une autre étude *in vitro* a montré que la surexpression de Zeb1 favorisait la résistance à la castration des cellules du CaP en les conduisant à exprimer des gènes de pluripotence leur conférant des caractéristiques de cellules souches (201).

### Inducteurs de la TEM du CaP

La TEM peut être induite par différents facteurs, notamment des facteurs de croissance comme le TGF-β ou l'EGF (177), mais aussi par d'autres facteurs de l'environnement que nous étudierons ici plus en détails comme l'hypoxie et la pression thérapeutique dans le CaP.

#### L'hypoxie comme inducteur de la TEM

Les tumeurs solides sont fréquemment hypoxiques, et cela a notamment été démontré dans le CaP par des mesures directement en intra-tumoral au bloc opératoire (202). Le degré d'hypoxie a été corrélé au stade clinique (cT) de la maladie pour des CaP étudiés au cours d'un traitement par curiethérapie.
Plusieurs études ont montré que l'hypoxie induisait la TEM, au moins partiellement, dans le CaP. Par exemple, *in vitro*, il a été observé, sur des LNCaP, DU145 et PC3, que l'hypoxie diminuait l'expression de marqueurs épithéliaux (la E-cadhérine, les cytokératines 8 et 18), et augmentait l'expression d'un marqueur mésenchymateux, la vimentine (203,204). Il était observé en parallèle une augmentation de leurs propriétés d'invasion et/ou de migration.
Une autre équipe travaillant sur les LNCaP, n'observait de majoration de l'invasion et de la migration qu'en cas d'hypoxie chronique (c'est-à-dire depuis plus de 6 mois) mais pas dans des conditions d'hypoxie plus courte comme fait dans l'étude précédemment citée (205,206). En cas d'hypoxie chronique, il était alors observé une forte augmentation de Slug, qui pouvait expliquer le modification des propriétés de migration et d'invasion (206). En revanche, il n'a été observé aucune modification d'expression de Snail, ni de modification d'expression de E-cadhérine, N-cadhérine ou vimentine. Enfin les cellules n'avaient pas non plus changé de morphologie. Les auteurs suggèrent que cette TEM partielle s'effectuerait plutôt *via* la surexpression d'ephrine-B1 (protéine membranaire de type I, qui jouerait un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaires) induite par Slug.

Enfin, des travaux antérieurs au laboratoire ont montré que l'hypoxie de courte durée induisait l'expression de Zeb1 dans un modèle de PC3, et augmentait les capacités de migration des cellules (207). Des résultats similaires ont été observés par une autre équipe montrant qu'une hypoxie de courte durée entrainait une diminution de l'expression de E-cadhérine et une augmentation de l'expression de N-cadhérine, tout en majorant les capacités d'invasion et de migration des cellules PC3 (208).

**La pression thérapeutique comme inducteur de la TEM**

Suppression androgénique

*In vivo* sur un modèle de xénogreffe murine, l'ajout d'une suppression androgénique fait, comme attendu, globalement diminuer la taille de la xénogreffe, mais en parallèle il est observé une initiation de TEM avec une diminution de la E-cadhérine, et une augmentation de la N-cadhérine, de la vimentine, de Zeb1, Zeb2 et Twist1, par rapport aux xénogreffes contrôles (chez des souris non castrées) (168). Les auteurs ont également observé sur une cohorte de 20 patients (10 castrés, 10 non traités) une augmentation des transcrits de la vimentine et de Zeb1, chez les patients castrés.

Chimiothérapie

*In vitro*, il a été constaté que les cellules PC3 et DU-145, quand elles deviennent résistantes au docétaxel, développent un profil mésenchymateux, c'est-à-dire que l'expression de la E-cadhérine diminue, alors que celle de marqueurs mésenchymateux (vimentine, Slug, Twist2, Zeb1, Zeb2) augmente (209–211). Ceci est associé à une augmentation de leur capacité d'invasion ou de migration (210,212). Il a également été constaté qu'en cas de surexpression de Zeb1 dans des cellules 22Rv1, on induisait une résistance au docétaxel et au contraire, en cas de répression de Zeb1 dans les cellules DU145, leur sensibilité était majorée (213). De plus, en cas de « knockdown » de Zeb1 dans des lignées résistantes au docétaxel, les auteurs parvenaient à les rendre davantage sensibles au traitement tout en diminuant leurs caractéristiques mésenchymateuses (majoration d'E-cadhérine, diminution de N-cadhérine et vimentine) (214).

De façon similaire chez des patients, il a été observé une diminution de la E-cadhérine dans des CaP de haut grade en cas d'exposition au docétaxel (209). Dans une autre cohorte de tissus tumoraux, Zeb1 était significativement plus fréquemment exprimé dans les CaP exposés au docétaxel (n=14) que dans des échantillons tumoraux de patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie (n=13) (210).

Ces résultats sembleraient plutôt spécifiques au docétaxel, puisqu'ils ne sont pas retrouvés dans le cas d'une résistance au cabazitaxel (212).

### Régulation épigénétique de la TEM dans le CaP

Plusieurs études ont mis en évidence des mécanismes de régulation épigénétique qui permettent de réguler la TEM, notamment dans le CaP.

Il a d'abord été remarqué, *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer dont des CaP, que les lignées qui n'exprimaient pas la E-cadhérine présentaient une hyperméthylation du promoteur de son gène *CDH1* (215,216). D'ailleurs, la E-cadhérine serait plus fréquemment méthylée

dans les CaP de haut grade (et plutôt sur la région du promoteur de *CDH1*) que dans les CaP de bas grade (pour lesquels la méthylation était plutôt identifiée sur des exons de *CDH1*) (217).
Toutefois une étude *in vitro* a ensuite observé que la méthylation de l'ADN était peu corrélée à la répression de l'expression des marqueurs épithéliaux observée au cours de la TEM du CaP (218). Cette étude a également montré, qu'au cours de la TEM, il y avait une globale augmentation du nombre de gènes marqués par H3K4me3 (et ces gènes étaient alors davantage exprimés), ainsi que du nombre de gènes marqués par H3K27me3 (et ces gènes étaient alors moins exprimés). Par exemple, H3K4me3 marquait le gène de la N-cadhérine, qui était alors davantage exprimé. Une tendance inverse était retrouvée pour la E-cadhérine, mais sans être statistiquement significative. Enfin, il semblerait que, dans le CaP, tous les mécanismes épigénétiques n'aient pas la même efficacité. En effet, en cas d'expression d'H3K4me3 et H3K27me3 simultanée, l'expression du gène considéré était réprimée, alors qu'en cas d'expression d'H3K4me3 associée à une méthylation de l'ADN, le gène considéré était traduit. Ce dernier résultat suggère que ce sont davantage les mécanismes de méthylation d'histone qui sont en mesure de participer à la régulation de la TEM, plutôt que les phénomènes de méthylation de l'ADN.
Une autre étude a observé des résultats qui venaient renforcer cette hypothèse, sur un modèle *in vitro* de sphéroïdes de PC3 (219). En effet l'expression de *CDH1* était diminuée dans les sphéroïdes par rapport aux PC3 cultivées en deux dimensions. Or les auteurs ont montré que le promoteur de *CDH1* était moins méthylé dans les sphéroïdes, ce qui aurait dû favoriser l'expression de ce gène. Il a par ailleurs été observé que les expressions d'H3K9ac et d'H3K4me3, au niveau du promoteur de *CDH1*, diminuaient dans les sphéroïdes, contrairement à celle d'H3K27me3 qui augmentait, tout cela étant plutôt en faveur d'une répression de l'expression du gène et venant confirmer l'hypothèse que les modifications des histones prévalent sur les mécanismes de méthylation de l'ADN. Une autre étude *in vitro*, a rapporté une augmentation d'H3K27me3 sur *CDH1* (sous l'action d'EZH2), ce qui entrainait une diminution de l'expression de la E-cadhérine (220).

Par ailleurs, il semblerait que la désacétylation des histones intervienne également dans la régulation de la TEM des cancers, dont le CaP. En effet, dans des études *in vitro*, il a été observé que Zeb1 favorisait la répression de l'expression d'E-cadhérine en activant des HDACs (221–223).
Enfin, les miARNs semblent également participer à la régulation de la TEM du CaP. En particulier, mir-145, mir-200, mir-203 et mir-205 sont des miARNs inhibiteurs de la TEM, du fait de leur action directement sur les facteurs de transcription Zeb1 et/ou Zeb2 (224). D'autres miARNs, comme mir-1 et mir-124, ciblent Snail pour diminuer son expression. *In vitro* sur des lignées de CaP, mir-34b semble participer à inhiber la TEM, puisqu'il permet de diminuer la migration et l'invasion des cellules, et de réprimer l'expression des marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine, Snail) tout en augmentant celle des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) (225). Mir-34b est sous exprimé dans les cellules PC3 et LNCaP par rapport aux cellules RWPE1 (lignée de cellules prostatiques non cancéreuses), et dans les tissus de CaP par rapport aux tissus sains (225).

## Objectifs

**Le premier objectif était de déterminer si les CPNE qui se développent du fait de la pression thérapeutique exercée par les traitements anti-androgènes étaient de nature différente, notamment sur le plan immunophénotypique, des CPNE *de novo*** (une entité plus rare de CaP identifiée dès le diagnostic du cancer, avant tout traitement). Nous nous sommes intéressés à la recherche de marqueurs pronostiques afin d'affiner l'évaluation prédictive de la gravité de cette forme de CaP en pratique clinique.
Ce travail a été publié sous forme d'un article original intitulé « Specificities of small cell neuroendocrine prostate cancer: Adverse prognostic value of TTF1 expression » dans le journal *Urologic Oncology*.

**Le deuxième objectif était d'évaluer les variations phénotypiques des cellules de CaP lorsqu'elles entrent en contact avec le TAPP, et l'hétérogénéité de ces variations.** Nous avons dans un premier temps étudié, au sein d'une cohorte de tissus tumoraux de patients, les variations immunophénotypiques des cellules cancéreuses, en fonction de leur contact ou non avec le TAPP, en se focalisant sur les marqueurs de prolifération, de TEM, et les marques épigénétiques. Dans un second temps, afin de préciser l'effet causal du TAPP sur ces variations phénotypiques, nous avons travaillé sur un modèle *in vitro* de co-culture entre des lignées de CaP (PC3 et LNCaP) et la fraction adipocytaire de TAPP de patients opérés pour des CaP, et analysé l'influence de la composition lipidique du TAPP sur les marqueurs d'agressivité des lignées cellulaires.
Ce travail a été resoumis pour publication, après révisions, sous forme d'un article original intitulé « Variable effects of periprostatic adipose tissue on prostate cancer cells: role of adipose tissue lipid composition and cancer cells related factors » à la revue *Prostate*.

**Le troisième objectif était focalisé sur l'EPA, un AGPI oméga 3 d'intérêt du fait des résultats obtenus sur l'objectif précédent, et de travaux antérieurs au sein de l'équipe de recherche.** L'effet de l'EPA sur les marqueurs d'agressivité des cellules cancéreuses a tout d'abord été étudié *in vivo*, en mesurant la croissance tumorale de xénogreffes de cellules TRAMP-C2 (une lignée de CaP murin greffée à des souris immunocompétentes), en fonction de leur régime nutritionnel : enrichi en EPA *versus* isolipidique standard. Puis nous avons mis au point un modèle de co-culture entre la lignée PC3 et le TA murin péri-épididymaire provenant des souris xénogreffées. Nous avons étudié l'influence de l'enrichissement en EPA du TA murin sur différentes caractéristiques d'agressivité des PC3 (prolifération, migration, TEM), notamment sous hypoxie.
Ce travail est toujours en cours et sera soumis pour publication ultérieurement.

# Caractéristiques immunophénotypiques du CPNE, comparaison entre les formes *de novo* et celles induites par la pression thérapeutique

Les CPNE sont des formes rares mais particulièrement agressives de CaP. Deux entités doivent être différenciées, les CPNE *de novo* et les CPNE induits par la pression thérapeutique. La fréquence de ces derniers a augmenté avec l'avènement des hormonothérapies de nouvelle génération, mais ils sont de pronostic moins défavorable que les CPNE *de novo* (60). L'objectif de ce travail était de caractériser ces deux entités sur le plan immunophénotypique, afin d'établir leurs profils respectifs. Ce travail a aussi été l'occasion de rechercher des facteurs pronostics de ces formes agressives de CaP.

Nous avons étudié une cohorte de 30 patients ayant eu un prélèvement contenant au moins un contingent de CPNE, dont 14 avaient un CPNE *de novo* et 16 avaient un CPNE survenu après échappement au traitement systémique reposant sur une suppression androgénique. Un TMA (« tissue microarray ») a été constitué à partir de ces prélèvements, afin de les analyser par immunohistochimie pour les marqueurs NE habituels (synaptophysine et chromogranine A) ainsi que TTF1 (marqueur NE moins fréquemment utilisé dans le CaP), mais aussi les marqueurs classiques du CaP (RA, ERG et NKX3.1 dont l'expression est régulée par le RA) et des marqueurs d'agressivité du CaP (Ki67 comme marqueur de prolifération, Zeb1 comme marqueur de la TEM, perte de PTEN). Nous avons cherché à déterminer si ces différents marqueurs pouvaient être corrélés à la survie globale des patients.

La cohorte comprenait 10 cas (33%) de CPNE purs, et 20 cas (67%) de CPNE mixtes avec des contingents d'adénocarcinome classiques. Les patients avaient un taux de PSA globalement bas pour des patients avec un CaP métastatique (médiane de 6 ng/ml pour les CPNE purs et 4,7 ng/ml pour les CPNE mixtes).

Tous les prélèvements présentaient au moins un contingent de petites cellules rondes et l'expression d'au moins un marqueur NE classique (chromogranine A et/ou synaptophysine). La chromogranine A était exprimée dans la majorité des cas (25/30 = 83%), dont 10/14 (soit 71%) des cas *de novo* et 15/16 (94%) des cas post traitement (p=0,64), de façon similaire entre les CPNE purs et les mixtes (p=0,15). La synaptophysine était exprimée dans la moitié des cas (16/30 = 53%), dont 9/14 (soit 64%) des cas *de novo* et 7/16 (soit 44%) des cas post traitement (p=0,70), de façon là aussi similaire entre les CPNE purs et mixtes (p=0,29). TTF1 était également exprimé dans la moitié des cas (15/30 = 50%), davantage dans les CPNE purs (8/10 = 80%) que dans les formes mixtes (7/20 = 35%, p = 0,05).
Le RA restait exprimé dans la moitié des cas (16/30 = 53%), que ce soit dans les formes *de novo* et les formes post-traitement. NKX3.1 restait exprimé dans 40% des cas, plus fréquemment dans les formes mixtes (p=0.01). L'expression du RA et de NKX3.1 était associée à une prolifération plus basse et une absence de perte de PTEN.
Il n'y avait pas de différence d'expression notable entre les marqueurs NE classiques (chromogranine A et synaptophysine) et la perte d'expression du RA. En revanche, TTF1 était significativement associé aux pertes d'expression du RA (p=0,0004) et de NKX3.1 (p=0,0001). De façon similaire les marqueurs NE classiques n'étaient pas corrélés aux marqueurs d'agressivité, contrairement à TTF1 qui était associé à une augmentation significative de la prolifération (p=0,001) et de Zeb1 (p=0,04). Enfin la survie globale des patients était significativement plus courte en cas d'expression élevée de Ki67, Zeb1 ou TTF1

(respectivement p=0,006, p=0,008 et p=0,003), et de perte d'expression de NKX3.1 (p=0,007), sans que ce soit le cas pour la chromogranine A et la synaptophysine. TTF1 était le seul marqueur corrélé à la survie globale en analyse multivariée (p=0,01).

En conclusion, le RA était toujours présent dans la moitié des CPNE, ce qui conforte dans l'intérêt de proposer des traitements hormonaux également à ces patients et rejoint les résultats de Conteduca et al. qui notaient un bénéfice des hormonothérapies de nouvelle génération dans une cohorte de patients avec un CPNE (60). Cependant, on note que les voies de signalisation du RA sont moins activées dans les CPNE purs par rapport aux mixtes (avec notamment la baisse d'expression de NKX3.1). Enfin TTF1 semble être un marqueur NE d'intérêt, se révélant ici être un facteur de mauvais pronostic.
Nous prévoyons d'étoffer cette première cohorte de patients, ce qui permettra de vérifier si ces premiers résultats sont confirmés à plus grande échelle.

Article 1

# “Specificities of small cell neuroendocrine prostate cancer: Adverse prognostic value of TTF1 expression”

Mathilde Cancel, Claire Castellier, Celine Debiais-Delpech, Thomas Charles, François Rozet, Nathalie Rioux-Leclercq, Romain Mathieu, Françoise Beltjens, Luc Cormier, Franck Bruyère, Gaëlle Fromont

Publié dans *Urologic Oncology*

ELSEVIER

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 39 (2021) 74.e17–74.e23

UROLOGIC ONCOLOGY

Laboratory-Prostate cancer

# Specificities of small cell neuroendocrine prostate cancer: Adverse prognostic value of TTF1 expression

Mathilde Cancel[a,b], Claire Castellier[c], Celine Debiais-Delpech[d], Thomas Charles[e], François Rozet[f], Nathalie Rioux-Leclercq[g], Romain Mathieu[h], Françoise Beltjens[i], Luc Cormier[j], Franck Bruyère[k], Gaëlle Fromont[a,c,*]

[a] *Inserm UMR1069 "Nutrition, Croissance et Cancer" Université de Tours, CHRU Bretonneau, Tours, France*
[b] *Department of Oncology, Tours, France*
[c] *Department of Pathology, Tours, France*
[d] *CHU Poitiers, Department of Pathology, Poitiers, France*
[e] *CHU Poitiers, Department of Urology, Poitiers, France*
[f] *Institut Mutualiste Montsouris, Department of Urology, Paris, France*
[g] *CHU Rennes, Department of Pathology, Rennes, France*
[h] *CHU Rennes, Department of Urology, Rennes, France*
[i] *Centre Georges Francois Leclerc, Department of Pathology, Dijon, France*
[j] *Centre Georges Francois Leclerc, CHU Dijon, Department of Urology, Dijon, France*
[k] *Department of Urology, Tours, France*

Received 11 May 2020; received in revised form 3 July 2020; accepted 6 July 2020

**Abstract**

**Objectives:** To determine whether small cell neuroendocrine prostate cancers (NEPCa) emerging after anti-androgen treatments are different from the rarest cases diagnosed *de novo*, and to identify effective predictive markers.

**Material and methods:** The expression of neuroendocrine markers, androgen receptor (AR) and androgen-regulated genes, as well as markers of aggressiveness, were analyzed by immunohistochemistry on a tissue microarray containing samples of 30 sNEPCa, either pure or admixed with conventional PCa, and including 14 cases diagnosed *de novo* and 16 cases subsequent to prior androgen deprivation.

**Results:** Chromogranin A is a better marker of NE differentiation than synaptophysin in post-treatment NEPCa, with 94% and 44% of positive tumors, respectively, while both markers are equally expressed in *de novo* cases. Despite the acquisition of a NE phenotype, more than half of NEPCa expressed AR and the androgen-regulated gene NKX3.1, more frequently in cases admixed with conventional PCa. TTF1 staining, present in half of NEPCa, was associated with loss of androgen-regulated genes and with markers of aggressiveness, including increased proliferation, Zeb1 expression and PTEN loss. In multivariate analysis, only TTF1 expression was significantly associated with shorter overall survival.

**Conclusion:** These results suggest the persistence of androgen signaling in a number of NEPCa cases, and the interest of TTF1 staining as a predictive biomarker. © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Prostate cancer; Neuroendocrine carcinoma; Prognosis

## 1. Introduction

Small cell euroendocrine prostate cancer (NEPCa) is a rare and highly aggressive disease, that can present *de novo*, but more commonly arises after androgen deprivation or androgen receptor (AR) targeted therapy for

Conflict of interest: None.

*Corresponding author. Gaelle Fromont, MD, PhD, Service d'Anatomie Pathologique, Hopital Bretonneau, CHRU Tours, Blvd Tonnelle, 37000 Tours, France. Tel.: +33 (0)2-47-47-82-72; fax: +33 (0)2-47-47-82-74.
*E-mail address:* gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr (G. Fromont).

https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.07.007
1078-1439/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

conventional prostate adenocarcinoma (PCa) [1,2]. Although some NEPCa are composed only by NE cells, characterized by the presence of secretory granules, others are admixed with an adenocarcinoma component [1,2].

NE phenotype in PCa cells includes low or absent expression of the androgen receptor (AR) and androgen-regulated markers, together with the acquisition of NE markers like synaptophysin and chromogranin A [3,4]. In addition, more than half of NEPCa cases have been shown to express the thyroid transcription factor-1 (TTF1), that cannot therefore be used as a marker to distinguish between lung and prostatic origin of NE carcinoma [3,4].

Rearrangements involving *ERG* and the androgen regulated gene *TMPRSS2*, that are present in around 50% of conventional acinar PCa, have also been demonstrated in NEPCa [5,6]. Since *ERG* rearrangements are prostate specific [7], this finding could help to distinguish NEPCa from NE carcinomas of other primary sites, and suggests that NEPCa is derived from acinar PCa cells. In addition, the presence of NEPCa cases mixed with conventional acinar PCa, coupled with evidence of cells that may co-express in one side NE markers and on the other side AR and its target genes, also strengthen the hypothesis that NEPCa could arise from non-NE prostatic tumor cells through a phenomenon termed transdifferentiation [2,8].

Although the molecular characterization of NEPCa has been improved in recent years, focused on the genetic aspects of the disease, it remains unclear whether there is a different immunophenotype in *de novo* and post-treatment NEPCa, and whether NE cancer cells are different in pure compared to mixed tumors. In addition, even if NEPCa is an aggressive disease, there is a need to identify markers that could distinguish patients with a better prognostic.

In the present study, we characterized the immunophenotypic profile of 30 NEPCa, in order to evaluate the differences between *de novo* and post-treatment tumors, as well as between pure and mixed cases, and to identify prognostic markers related to survival.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

Samples from 50 patients diagnosed with neuroendocrine prostate cancer (NEPCa) were retrieved from the files of 5 institutions, and subsequently selected according to the following criteria: pure NEPCa or admixed with minor conventional adenocarcinoma component, with small cell morphology, formalin fixed tissues, sufficient amount of cancer tissue available, at least 6 months follow-up after tissue collection.

At the end, with these criteria, samples from 30 patients were retained (see flowchart, supplementary Fig. 1), and included transuretral resections ($n = 19$), radical prostatectomy specimens ($n = 2$), prostate biopsies ($n = 5$), or biopsies from a metastatic site ($n = 4$). The diagnosis of NEPCa was suspected on morphologic criteria, with small cell carcinoma features (Fig. 1A), and confirmed after immunostaining with either chromogranin A or synaptophysin. Fourteen cases were diagnosed *de novo*, in the absence of any prior treatment, and 16 cases were subsequent to previous hormone deprivation. For the 16 later patients, the initial pathology on prostate biopsies was devoid of NE component; androgen deprivation therapy was initially effective, but all patients subsequently relapsed with a NE phenotype. Ten cases were pure NEPCa, and for 20 patients NEPCa was admixed with conventional adenocarcinoma, most often with an abrupt transition between the 2 components.

### 2.2. Immunohistochemistry on tissue micro-array

#### 2.2.1. TMA construction

TMAs were constructed using formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. For each case, a minimum of 3 cores (0.6 diameter) were transferred from the selected areas to the recipient block, using a TMA workstation

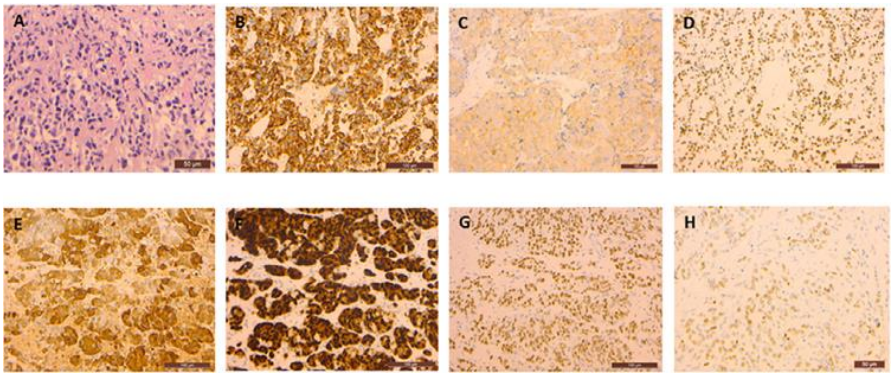



Fig. 1. HES staining of NEPCa with small cell morphology (A). Twenty five cases on 30 NEPCa were positive for chromogranin A (B), 16 cases for synaptophysin (C), and TTF1 expression was found in 15 tumors (D). The majority of NEPCa cases co-expressed chromogranin A (E) and AR (F), whereas 13 tumors on 30 were positive for NKX3.1 (G), and only 4 cases were positive for ERG (H).

(Manual Tissue Arrayer MTA Booster, Alphelys, France). Serial 3 $\mu$m sections of the TMA blocks were used for immunohistochemistry. One section on 10 was stained with hematoxylin-eosin to check that the cores adequately represented diagnostic areas.

#### 2.2.2. Immunohistochemistry

Slides were deparaffinized, rehydrated, and heated in citrate buffer pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, the primary antibodies were incubated. The panel of primary antibodies included chromogranin A (Zytomed, MSG 062, dilution 1/1, 30 minutes), synaptophysin (DakoCytomation, clone DAK-SYNAP, 1/200, 30 minutes), TTF1 (Roche, SP141, 1/1, 30 minutes), androgen receptor (AR) (Roche, clone SP107), NKX3.1 (Roche, EP356, 1/1, 30 minutes), PTEN (Cell Signaling, 138G6, 1/200), ERG (Roche, EPR 3,864, 1/1, 30 minutes), Zeb1 (Abnova, clone 4C4, 1/500, 1 hour), and the proliferation marker Ki67 (DakoCytomation, clone 39-9, 1/50, 30 minutes). Immunohistochemistry was performed with either the automated BenchMark XT slide stainer (Ventana Medical Systems Inc) using OptiView Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc) or manually (for PTEN and Zeb1) using the streptavidin-biotin-peroxydase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Slides were finally counterstained with haematoxylin. Negative controls were obtained after omission of the primary antibody or incubation with an irrelevant antibody.

#### 2.2.3. Scoring of antibody staining

The slides were analyzed by 2 observers in a blinded fashion. AR, Zeb1 and Ki67 were expressed as a percentage of cancer cells. Staining for PTEN was scored as − : no stained cells, +: low intensity, ++: high intensity. Chromogranin A, synaptophysin, TTF1, NKX3.1, and ERG were expressed as positive or negative. In case of inter-observer variability (different categories in the case of categorical data or variability more than 10% in the case of continuous data), which occurred in <5% of cases, slides were rescored until a consensus was reached.

### 2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with StatView, version 5.0, software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Comparison between groups was performed using the $\chi 2$ test for categorical data and nonparametric Mann-Whitney $U$ test or Kruskall Wallis test for continuous data. The relationship between 2 continuous variables was evaluated using the nonparametric Spearman rank correlation test. Overall survival was analyzed by Kaplan-Meier method, and the curves were compared using the log-rank test. Multivariate survival analysis was performed using Cox's regression model. $P$ values <0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Patients characteristics

Median age at diagnosis was 72 years (range 52−86), and median serum PSA was 6 ng/ml (range 0.03−1,288, 0.03−3.60 for pure cases, and 4.7−1,288 for mixed cases). Twenty three patients had metastasis at diagnosis, including 9 with visceral metastasis (liver or lung). Among the 16 cases secondary to previous hormone deprivation, 9 patients initially underwent local treatment, including prostatectomy ($n = 1$), radiation therapy ($n = 7$), or both ($n = 1$). NEPCa subsequent to prior hormone deprivation were treated with either second generation hormonotherapy or taxanes ($n = 5$), or platinium chemotherapy (alone or associated with etoposide) ($n = 6$). Among the 14 *de novo* cases, 6 patients underwent local treatment after NEPCa diagnosis , including prostatectomy ($n = 2$), radiation therapy ($n = 4$). These *de novo* cases were subsequently treated by either primary hormone deprivation (cases admixed with adenocarcinoma) ($n = 10$) then second generation hormonotherapy ($n = 1$), or platinium chemotherapy (alone or associated with etoposide) ($n = 8$, 4 with associated hormone deprivation therapy). The sequence of treatments according to tissue sampling is provided in supplementary Fig. 2. Twenty-four patients on 30 died, and the median follow-up from tissue collection to last news or death was 13 months (0.3−68 months). Written informed consents were obtained from patients in accordance with the requirements of the medical ethic committee of our institutes.

### 3.2. Immunoprofile

The expression profile of all markers is summarized Table 1. Briefly, chromogranin A is expressed in 10 on 14 *de novo* cases, and in 15 on 16 post-treatment cases

Table 1
Expression of markers of NE differentiation, androgen signalling, and aggressiveness

| | | |
|---|---|---|
| Chromogranin A | − (n) | 5 |
| | + (n) | 25 |
| Synaptophysin | − (n) | 14 |
| | + (n) | 16 |
| TTF1 | − (n) | 15 |
| | + (n) | 15 |
| AR | − (n) | 14 |
| | + (n) | 16 |
| | *% (median, range)* | *95 (20−100)* |
| NKX3.1 | − (n) | 17 |
| | + (n) | 13 |
| ERG | − (n) | 26 |
| | + (n) | 4 |
| Ki67 | *% (median, range)* | *50 (10−100)* |
| Zeb1 | *% (median, range)* | *50 (0−100)* |
| PTEN *(24 cases available)* | − (n) | 7 |
| | ± (n) | 5 |
| | + (n) | 12 |

(Fig. 1B). The 5 chromogranin negative cases were diffusely positive for synaptophysin (Fig. 1C). Staining for synaptophysin was found in 9 *de novo* and 7 post-treatment cases. No significant differences for chromogranin and synaptophysin expression were found between NEPCa subgroups, either pure versus mixed ($P = 0.15$ and 0.29, respectively) or *de novo* versus post-treatment ($P = 0.64$ and 0.70, respectively). TTF1 was expressed in half cases (Fig. 1D), in 8 on 10 pure NEPCa and in 7 on 20 admixed cases (near significance, $P = 0.05$). No significant difference in TTF1 staining was found in *de novo* versus post-treatment NEPCa ($P = 0.51$).

Thirteen cases on 30 co-expressed chromogranin A (Fig. 1E) and AR (Fig. 1F). AR, NKX3.1 (Fig. 1G) , and ERG (Fig. 1H) were expressed in respectively 53%, 43%, and 13% of tumors (Fig. 1 D– F). All ERG positive cases also stained NKX3.1, and all NKX3.1 positive cases also expressed AR. NKX3.1 staining was more frequent in the NE component of tumors admixed with conventional adenocarcinoma (12 positive cases on 20) compared to pure NEPCa (1 positive case on 10) ($P = 0.01$). No differences for AR and NKX3.1 expression were observed between *de novo* and post-treatment cases ($P = 0.53$ and .064, respectively).

Among markers of aggressiveness, the expression profile of Ki67 and Zeb1 was very heterogeneous, and PTEN expression was totally or partially lost in half of NEPCa cases.

No significant differences were found for Ki67, Zeb1 and PTEN expression between NEPCa subgroups, either pure versus mixed ($P = 0.07$, 0.88, and 0.21, respectively) or de novo versus post-treatment ($P = 0.06$, 0.55, and 0.91, respectively).

### 3.3. Correlation between markers

No significant association was found between both chromogranin A and synaptophysin staining and androgen-regulated markers. In contrast, TTF1 expression was closely associated with loss of both AR ($P = 0.0004$) and NKX3.1 ($P = 0.0001$). Only 3 cases on 30 were negative for TTF1 and NKX3.1, and 1 other case was positive for both markers.

AR and NKX3.1 expression were associated with decreased proliferation ($P = 0.0006$ and 0.0004, respectively), and absence of PTEN loss ($P = 0.04$ and 0.02, respectively).

Although we found no significant association between both chromogranin A and synaptophysin staining and markers of aggressiveness, TTF1 expression (Fig. 2A) was associated with increased proliferation (Fig. 2B) ($P = 0.001$), Zeb1 staining (Fig. 2C) ($P = 0.04$), and PTEN loss (Fig. 2D) (0.02).

### 3.4. Prognostic value

The expressions of NKX3.1, TTF1, Ki67 and Zeb1 were significantly associated with shorter overall survival (log rank, $P = 0.007$, 0.0003, 0.006 and 0.008, respectively) (Fig. 3), while chromogranin A and synaptophysin staining were not (log rank, $P = 0.8$ and 0.7,

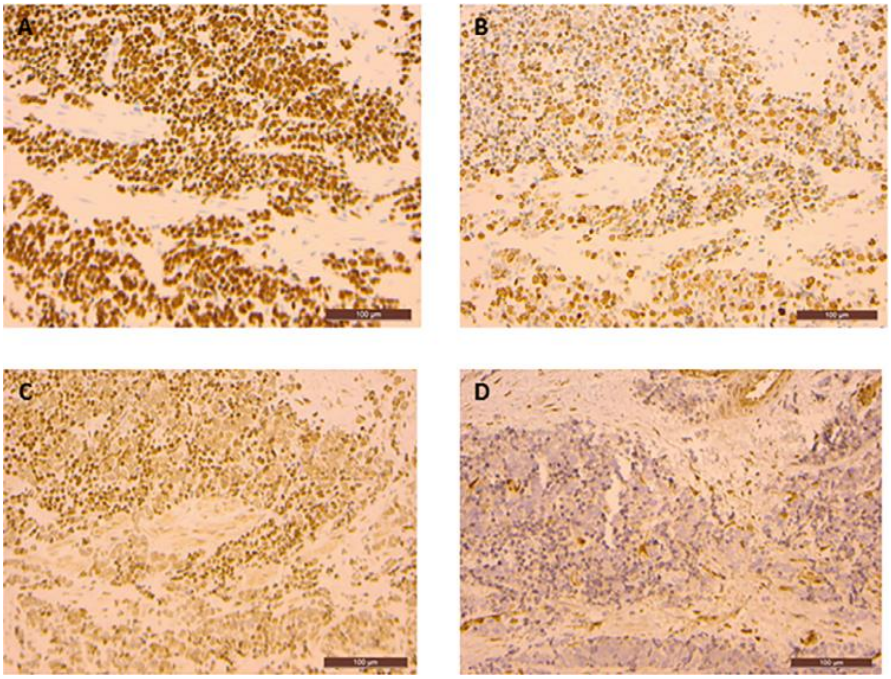



Fig. 2. TTF1 expression in NEPCa (A) was associated with high proliferation (B), positive Zeb1 staining (C), and loss of PTEN expression in cancer cells (D).

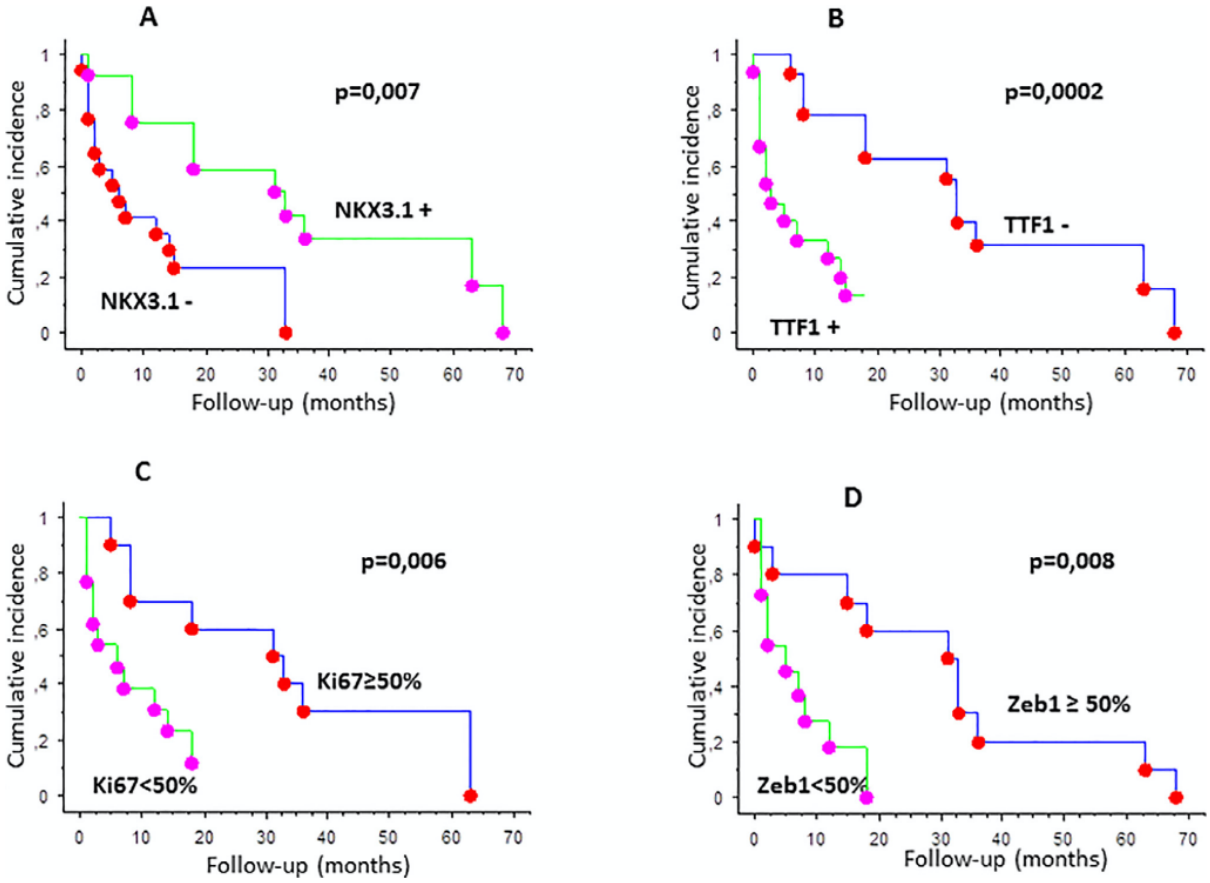



Fig. 3. Kaplan-Meier overall survival in NEPCa patients, according to NKX3.1 (A, $P = 0.007$), TTF1 (B, $P = 0.0003$), Ki67 (C, $P = 0.006$), and Zeb1 (D, $P = 0.008$) staining.

respectively). Patients with visceral metastases at diagnosis did not have a significant shorter overall survival compared to other patients ($P = 0.07$). Patients treated with platinium chemotherapy did not have a significant longer overall survival ($P = 0.12$).

In addition, cases with an admixed component of conventional adenocarcinoma showed a longer overall survival compared to pure NEPCa cases ($P = 0.003$). No significant difference was observed in term of survival between *de novo* and post-treatment NEPCa ($P = 0.9$).

In multivariate analysis, including parameters significant in univariate analysis, only TTF1 staining remained significant (Table 2).

Table 2
Markers predictive of overall survival in NEPCa in multivariate analysis (Cox)

| | HR | 95% CI | *P* |
|---|---|---|---|
| mixed NEPCa vs pure | 0.325 | 0.076–1.401 | 0.13 |
| NKX3.1 negative | 0.088 | 0.006-1.362 | 0.08 |
| TTF1 negative | 0.013 | 0.001–0.613 | **0.01** |
| Ki67 | 1.014 | 0.988–1.042 | 0.29 |
| Zeb1 | 0.999 | 0.975–1.023 | 0.92 |

Bold values are statistically significant ($P<0.05$).

## 4. Discussion

NE cells are rare components of normal prostatic glands, scattered within the epithelium, and are defined in current practice by immunohistochemical positivity for either chromogranin A, synaptophysin, or CD56 (1). Foci of NE cells, indistinguishable from other cancer cells by routine HES staining, can also be found using immunohistochemistry in typical prostate adenocarcinoma. The presence of such a focal neuroendocrine differentiation (NED) in hormone naive PCa has not been shown to worsen disease prognosis [1]. In contrast, small cell neuroendocrine prostate cancer (NEPCa) is a highly aggressive disease, that rarely arises *de novo*, and most often emerges from prostate

adenocarcinoma after androgen deprivation or androgen receptor (AR) targeted therapy [2]. The diagnosis of NEPCa, either in its pure form or admixed with an adenocarcinoma component, must be suspected on morphological criteria (small cell morphology) and only then confirmed by immunohistochemistry using NE markers, mainly chromogranin A and synaptophysin. In the present study, we selected cases with drastic NEPCa criteria, either pure or with a majority NE component. Furthermore, since our objective was to identify both immunoprofile and prognostic markers, we selected NEPCa cases with sufficient amount of cancer tissue available, and extensive clinical data including at least 6 months follow-up after tissue collection.

Considering the markers of NE differentiation, we observed that 94% of post-treatment cases expressed chromogranin A and only 44% synaptophysin, suggesting that chromogranin is a better marker of NED in treatment induced NEPCa. In contrast, both markers were found to be equally expressed in *de novo* cases. Other studies, composed mainly of *de novo* NEPCa cases, have reported a more frequent positivity for synaptophysin than for chromogranin A [3,4,9].Taken together, these findings suggest that the NE profile is different when NEPCa is treatment related. As previously described [4], we observed that half of NEPCa cases express TTF1. TTF1 staining has been shown to be positive in 7 to 80% of extra-pulmonary NE carcinomas, demonstrating that this marker cannot be used to determine the origin of NE cancer [10]. Alterations of tumor suppressors, including PTEN, have been shown to be key genetic events underlying NEPCa, with frequent combined loss of PTEN, TP53, and RB1 [11,12]. Similarly, we found that half of our NEPCa cases displayed a partial or total loss of PTEN expression.

Despite the acquisition of a NE phenotype, we observed that more than half of cases still expressed AR (53%) and most of them the androgen regulated transcription factor NKX3.1 (43%). Previous studies have reported either a similar high expression of AR [13], or lower levels for both AR and NKX3.1 [3,5].We also observed that the expression of AR and NKX3.1 is more frequent in the NE component of cases admixed with conventional adenocarcinoma when compared to pure NEPCa. As previously reported [5], we found that a minority of NEPC cases were stained for ERG, which is an androgen regulated factor in the presence of the fusion gene *TMPRSS2-ERG* [7]. The persistence of androgen regulated markers in a number of NEPCa cases strongly suggest the interest in these patients to maintain androgen targeted therapy, despite the acquisition of a NE phenotype.

After analysis of the correlations between markers, we found a strong inverse association between TTF1 expression and loss of androgen regulated markers. In fact, all TTF1 positive NEPC, except 1 case, showed a complete loss of NKX3.1 expression. TTF1 could then be considered as a marker of complete NE transdifferentiation in PCa. Moreover, we observed that complete transdifferentiation, that is loss of AR/NKX3.1, is associated with markers of aggressiveness such as increased proliferation and loss of PTEN expression. Similarly, TTF1 staining is associated with increased proliferation, loss of PTEN, and also with increased expression of the EMT transcription factor Zeb1. The inverse association between androgen regulated markers and TTF1 expression could be explained by the implication of the POU-domain transcription factor BRN2, a master regulator of neuronal differentiation [14]. In PCa, BRN2 is induced by AR suppression, and is a driver of NE differentiation [14]. In addition, BRN2 has been directly involved in TTF1 expression in NE lung cancer [15].

Although it is now well established that NED in PCa induces poor outcome, few studies have evaluated the prognostic factors among NEPCa. Recent retrospective studies without pathological review reported decreased survival in patients with pure NEPCa compared to patients with mixed cancer [16,17]. Moreover, in these patients, low serum PSA level, that reflects low expression of androgen regulated markers, has been show to predict poorer outcome [16]. Accordingly, we observed that pure NEPCa and loss of NKX3.1 were significantly associated with decreased survival. However, unlike others [17], we do not find any survival advantage for patients previously treated by hormonal therapies. In univariate analysis, we also identified other prognostic factors, such as high proliferation, zeb1 expression, and TTF1 staining. However, in multivariate analysis, only TTF1 expression remained significantly associated with shorter survival. Therefore TTF1, whose mRNA could be measured in serum samples [18], could be used as a predictive biomarker, particularly in patients under androgen deprivation or androgen receptor (AR) targeted therapy.

In conclusion, the persistence of AR expression in half of NEPCa cases strongly suggest the interest of AR targeted therapy in these patients. Compared to cases admixed with adenocarcinoma, pure NEPCa showed decreased AR signalling and increased TTF1 staining, whose expression is a marker of poor prognosis.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.07.007.

## References

[1] Epstein JI, Amin MB, Beltran H, Lotan TL, Mosquera JM, Reuter VE, et al. Proposed morphologic classification of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. Am J Surg Pathol 2014;38(6):756–67.

[2] Priemer DS, Montironi R, Wang L, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Cheng L. Neuroendocrine tumors of the prostate: emerging insights from molecular data and updates to the 2016 World Health Organization Classification. Endocr Pathol 2016;27(2):123–35.

[3] Yao JL, Madeb R, Bourne P, Lei J, Yang X, Tickoo S, et al. Small cell carcinoma of the prostate: an immunohistochemical study. Am J Surg Pathol 2006;30:705–12.

[4] Wang W, Epstein JI. Small cell carcinoma of the prostate. Am J Surg Pathol 2008;32:65–71.
[5] Lotan TL, Gupta NS, Wang W, Toubaji A, Haffner MC, Chaux A, et al. ERG rearrangements are common in prostatic small cell carcinomas. Modern Pathol 2011;24:820–8.
[6] Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald T, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. Cancer Discov 2011:487–94.
[7] Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 2005;310:644–8.
[8] Terry S, Beltran H. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Front Oncol 2014;4:1–9.
[9] Chedgy ECP, Vandekerkhove G, Herberts C, Annala M, Donoghue AJ, Sirougos M, et al. Biallelic tumour suppressor loss and DNA repair defects in *de novo* small cell prostate carcinoma. J Pathol 2018;246:244–53.
[10] Quinn AM, Blackhall F, Wilson G, Danson S, Clamp A, Ashcroft L, et al. Extrapulmonary small cell carcinoma: a clinicopathological study with identification of potential diagnotic mimics. Histopathology 2012;61:454–64.
[11] Aparicio AM, Shen L, Tapia ELN, Lu JF, Chen HC, Zhang J, et al. Combined tumor suppressor defects characterized clinically defined aggressive variant prostate cancers. Clin Cancer Res 2016;22: 1520–30.
[12] Tan HL, Sood A, Rahimi AA, Wang W, Gupta N, Hisks J, et al. Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. Clin Cancer Res 2014;20:890–903.
[13] Arggawal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas GV, et al. Clinical and genomic characterization of treatment emergent small cell neuroendocrine prostate cancer: a multi-institutional prospective study. JCO 2018;36:2492-25.3.
[14] Bishop JL, Thaper D, Vahid S, Davies A, Ketola K, Kuruma H, et al. The master neural transcription factor BRN2 is an androgen receptor-suppressed driver of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Cancer Discov 2017;7:54–71.
[15] Sakaeda M, Sato H, Ishii J, Miyata C, Kamma H, Shishido-Hara Y, et al. Neural lineage-specific homeoprotein BRN2 is directly involved in TTF1 expression in small lung cancer. Lab Invest 2013;93:408–21.
[16] Wang J, Xu W, Mierxiati A, Huang Y, Wei Y, Lin G, et al. low serum PSA level predicts poor outcome in patients with primary neuroendocrine prostate cancer. The Prostate 2019:1–9.
[17] Conteduta V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, et al. Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. Eur J Cancer 2019;121:7–18.
[18] Liu Y, Zhang G, Li H, Han L, Fu L, Zhang N, et al. Serum microRNA 365 in combinaison with its target gene TTF1 as non invasive prognostic marker for non-small cell lung cancer. Biomed Pharmacother 2015;75:185–90.

# Étude de l'influence de la composition lipidique du TAPP sur les facteurs d'agressivité du CaP

En dehors de la modification de l'agressivité du CaP métastatique sous l'effet de la pression thérapeutique, on constate également une modulation plus précocement dans l'histoire naturelle du CaP, dès le stade localisé, sous l'influence de son micro-environnement et en particulier de son micro-environnement lipidique. L'impact du TAPP dans la modulation de la progression du CaP pourrait dépendre de sa composition en différents composants pro- et anti-tumoraux, mais aussi de propriétés biologiques intrinsèques à la cellule cancéreuse, puisque différentes lignées cellulaires ne se comportent pas de la même façon en cas de co-culture avec du TAPP (226). L'objectif de ce travail était d'évaluer les variations phénotypiques des cellules de CaP lorsqu'elles entrent en contact avec le TAPP, et l'hétérogénéité de ces variations.

Nous avons dans un premier temps étudié une cohorte de 59 patients opérés pour un CaP ayant franchi la capsule prostatique, afin de comparer la zone tumorale extra-prostatique au contact du TAPP à la zone tumorale intra-prostatique. Nous nous sommes intéressés aux variations immunophénotypiques des cellules cancéreuses en nous focalisant sur les marqueurs de prolifération (Ki67), de TEM (Zeb1), et les marques épigénétiques 5mC, 5hmC, H3K27ac et H3K27me3. Dans un second temps, afin de préciser l'effet causal du TAPP sur ces variations phénotypiques, nous avons travaillé sur un modèle *in vitro* de co-culture entre des lignées de CaP (PC3 et LNCaP) et la fraction adipocytaire de TAPP de patients opérés pour un CaP, et nous avons également analysé l'influence de la composition lipidique du TAPP sur les marqueurs d'agressivité des lignées cellulaires.

Nous avons observé une grande hétérogénéité dans l'expression des différents marqueurs immunophénotypiques, malgré une augmentation globale significative de la prolifération et de la TEM dans les zones tumorales extra-prostatiques par rapport à leurs contrôles tumoraux intra-prostatiques. Nous avons également constaté une diminution globale significative des marques épigénétiques 5mC, 5hmC et H3K27ac.
Dans les modèles de co-culture *in vitro* entre lignées de cellules PC3 et LNCaP et fraction adipocytaire extraite du TAPP de patients, nous avons observé une augmentation significative des marqueurs d'agressivité (Ki67 et Zeb1) en cas de TAPP provenant de patients opérés pour des CaP agressifs.
La prolifération des PC3 était corrélée au contenu lipidique des TAPP, en particulier à sa teneur en EDA (20:2n-6) et inversement corrélée à sa teneur en EPA (20:5n-3).

En conclusion, il semblerait que l'effet du TAPP sur les cellules cancéreuses dépende non seulement de caractéristiques propres aux cellules cancéreuses, mais aussi de la composition lipidique du TAPP. C'est pourquoi il pourrait y avoir un intérêt à proposer une supplémentation nutritionnelle en EPA dans la prise en charge du CaP. Nous avons donc poursuivi l'exploration de cette hypothèse dans la suite du travail de thèse, *via* un modèle *in vivo* de xénogreffes en modifiant le régime nutritionnel des animaux.

Article 2

# “Variable effects of periprostatic adipose tissue on prostate cancer cells: role of adipose tissue lipid composition and cancer cells related factors”

Mathilde Cancel, David Crottès, Dorine Bellanger, Frank Bruyère, Coralie Mousset, Michelle Pinault, Karine Mahéo, Gaëlle Fromont

Soumis à la revue *The prostate*
En attente de décision après envoi des révisions le 11 octobre 2023

# VARIABLE EFFECTS OF PERIPROSTATIC ADIPOSE TISSUE ON PROSTATE CANCER CELLS: ROLE OF ADIPOSE TISSUE LIPID COMPOSITION AND CANCER CELLS RELATED FACTORS

*Mathilde Cancel[1,2], David Crottes[1], Dorine Bellanger[1], Frank Bruyère[3], Coralie Mousset[1,4], Michelle Pinault[1], Karine Mahéo[1], Gaëlle Fromont[1, 4].*

[1]Inserm UMR1069 "Nutrition, Croissance et Cancer" Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France

[2]Department of Medical Oncology, CHU Tours, bd Tonnellé, 37032 Tours, France

[3]Department of Urology, CHU Tours, bd Tonnellé, 37032 Tours, France

[4]Department of Pathology, CHU Tours, bd Tonnellé, 37032 Tours, France

Corresponding author: Gaëlle Fromont

Address: INSERM U1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", Université François-Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Bd Tonnellé, F-37032 TOURS Cedex, France.

Tél: (+33) 2 47 36 62 13. Fax: (+33) 2 47 36 62 26.

*E-mail address:* gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr

Short running title: "**Periprostatic fat: foe or friend"**

Number of text pages: 26

Number of tables: 3

Number of figures: 3

Supplementary material: 2 tables, 2 figures



For Peer Review

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

## ABSTRACT

Periprostatic adipose tissue (PPAT) is likely to modulate prostate cancer (PCa) progression. We analyzed the variations in the effect of PPAT on cancer cells, according to its fatty acid (FA) composition and tumor characteristics.

The expression of markers of aggressiveness Ki67 and Zeb1, and epigenetic marks that could be modified during PCa progression, was analyzed by immunohistochemistry on a tissue-micro-array containing 59 pT3 PCa, including for the same tumor intra-prostatic areas and extra-prostatic foci in contact with PPAT. In addition, we co-cultivated PC3 and LNCaP cell lines with PPAT, that have been analyzed for FA composition.

Although the contact between PPAT and cancer cells led overall to an increase in Ki67 and Zeb1, and a decrease in the epigenetic marks 5MC, 5HMC, and H3K27ac, these effects were highly heterogeneous. Increased proliferation in extra-prostatic areas was associated with the ISUP score. PC3 and LNCaP co-cultures with PPAT led to increased Ki67, Zeb1 and H3K27me3, but only for PPAT associated with aggressive PCa. PC3 proliferation was correlated with high 20.2n-6 and low 20.5n-3 in PPAT.

These results suggest that the effects of PPAT on cancer cells may depend on both PCa characteristics and PPAT composition, and could lead to propose nutritional supplementation.


**Key words:** prostate cancer; adipose tissue; fatty acids; epigenetic

For Peer Review

## INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa), the most frequent cancer in men in western countries, is a highly heterogeneous disease with variable clinical outcomes [1,2]. PCa aggressiveness and progression are dependent upon both cancer cell proliferation and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process. EMT enhances PCa cells invasion and migration, via Zeb1 (zinc finger enhancer binding protein), a key-EMT transcription factor [3,4]. We have previously demonstrated that Zeb1 expression in human PCa increased with disease progression from localized (pT2) to locally advanced (pT3) tumors and metastases. Moreover, Zeb1 expression in metastatic PCa tissues was significantly associated with decreased survival [5]. The prostate gland is surrounded by a rim of adipose tissue, named periprostatic adipose tissue (PPAT), infiltrated by cancer cells at the stage of locally advanced disease. PPAT stores energy reserves in the form of triglycerides and is also a metabolically dynamic active organ. Previous studies have supported an important role of PPAT in the modulation of PCa progression and aggressiveness, through adipokines or fatty acids (FA) release [6,7]. Although most of the mediators released by PPAT are likely to promote tumor progression, others, such as some polyunsaturated fatty acids (PUFA) and adiponectin, have been shown to have anti-tumor properties [6]. A specific FA profile of PPAT has been previously associated with features of PCa aggressiveness, characterized by low levels of eicosapentaenoic acid (EPA, a n-3 PUFA) [8]. The heterogeneity of the interplay between PPAT and PCa cells is also suggested by *in vitro* studies showing that the effects of lipids on PCa cells migration are different according to the type of FA [9]. The impact of PPAT in the modulation of PCa progression might therefore depend on the balance between its pro- and anti-tumor components. Moreover, the influence of PPAT on PCa cells could also be dependent upon the



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

type of cancer cells. In fact, the consequences of co-cultures between PPAT and PCa cell lines have been shown to differ according to the type of cell line [10].

Epigenetics is defined as changes in genome function that occur without change of the DNA sequence, but that influence gene expression through modifications of DNA accessibility. Epigenetic marks, including DNA methylation and histone modifications, have been shown to be modified during PCa development and progression. DNA methylation occurs when methyltransferase adds methyl to the 5$^{th}$ carbon of the cytosine pyrimidine ring [11]. Localized DNA methylation at CpG islands of tumor suppressor genes has been shown to occur early in PCa development, leading to silencing of genes involved in multiple cellular processes [12,13]. In contrast, genome-wide DNA hypomethylation (ie, global loss of 5-methylcytosine and/or 5-hydroxymethylcytosine) that affects large genome domains and is associated with chromosome instability, appears to be a later event in disease progression, more frequently observed in metastatic disease [14,15]. Histone modifications, mainly acetylation or methylation, are epigenetic marks that can regulate gene expression, with either transcriptional activation or repression. Some histone marks are considered active, such as H3K27 acetylation (ac), while others, including H3K27 trimethylation (me3), are considered repressive [16,17]. Several studies have reported alterations in global levels of histone modifications in PCa [18]. Particularly, increased global H3K27me3 level has been associated with PCa progression and metastasis [19,20].

Lipid composition of white adipose tissues reflects past dietary intake. There is increasing evidence that environmental factors, including diet, mostly act on cancer cells through epigenetic reprogramming [18,21]. Particularly, n-3 PUFAs have been shown to inhibit tumor growth by preventing DNA hypomethylation in colorectal cancer [22]. Moreover, it has been reported that modifications of lipid metabolism induced by diet have an impact on epigenetic marks, including histone methylation and acetylation [18].



For Peer Review

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

In the present study, we aimed to evaluate in human PCa the heterogeneity of the phenotypic variations of cancer cells when they arrived in contact with PPAT. We analyzed the implication of cancer cell related factors in these variations, and the impact of lipid composition of PPAT by using co-cultures.

## MATERIAL AND METHODS

### *Patients and tissues*

*PCa samples* used for tissue-micro-array (TMA) construction were obtained from 59 patients treated by radical prostatectomy for clinically localized PCa at Tours University Hospital. All cases were characterized by extra-prostatic extension, i.e. infiltration of PPAT by cancer cells (pT3 tumors). Patients and tumors characteristics are summarized in Table 1.

*PPAT from PCa patients*: to analyze the effects of PPAT on the PC3 and LNCaP cell lines, we used PPAT samples collected during the surgical procedure, in PCa patients treated by radical prostatectomy at Tours University Hospital. Eleven PPAT have been used for co-culture with PC3 cells, including 7 pT3 and 4 pT2 tumors, 5 tumors with ISUP score 1 or 2 (low grade), and 6 with ISUP score 3 or more (high grade). The lipid fractions of these PPAT have been analyzed for FA composition. Eleven different PPAT have been used for co-culture with LNCaP cells, including 6 pT3 and high grade tumors, and 5 pT2 and low grade tumors.

Written informed consent was obtained from patients following the requirements of the Ethical Committee/IRB.



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

*TMA Construction*

TMAs were constructed using formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. For each patient, 2 areas of tumor tissue were selected, localized either within the prostate (intra-prostatic area) or in PPAT (extra-prostatic area). For each localization, 3 cores 0.6 mm diameter were transferred from the selected areas to the recipient block, using a TMA workstation (Manual Tissue Arrayer MTA Booster, Alphelys, France). Serial 3 µm sections of the TMA blocks were used for immunohistochemistry. One section on ten was stained with hematoxylin-eosin to check that the cores adequately represented diagnostic areas.

*Immunohistochemistry on TMA and cell pellets*

Slides were deparaffinized, rehydrated, and heated in citrate buffer pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, the primary antibodies were incubated. The panel of primary antibodies included Zeb1 (Abnova, clone 4C4, dilution 1/500, 1 hour), Ki67 (DakoCytomation, clone 39-9, 1/50, 30 min), H3K27ac (Abcam, 1/100, 1 hour), H3K27me3 (Biorbyt, 1/100, 1 hour), 5-methylcytosine (5MC) (Activ motif, 1/1000, 1 hour), and 5-hydroxymethylcytosine (5HMC) (Activ motif, 1/2000, 1 hour), and ETS-related gene (ERG) (Roche, EPR 3864, 1/1, 30 min). Immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin-peroxydase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Slides were finally counterstained with haematoxylin. Negative controls were obtained after omission of the primary antibody or incubation with an irrelevant antibody. All staining were expressed was expressed as a percentage of total cancer cells, except for ERG that was scored as positive or negative.



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

*Isolation of the lipid fraction from PPAT*

Frozen PPAT samples were thawed in Krebs Ringer Buffer HEPES Albumin (KRBHA) supplemented with 3% penicillin-streptomycin (PS), then cut into 2-3 mm pieces and incubated at 37°C for 16 to 26 minutes with 2-3 ml collagenase type II (Sigma-Aldrich) at 250 CDU/ml per gram of tissue, until visualization of a floating layer of adipocyte at the top of tube, as previously described [23,24]. The solution obtained was filtered through a 100 µm cell strainer (Corning) with KRBHA-PS to separate the cells from the undigested tissues. After three minutes, the isolated lipid fraction was floating at the surface. It was then gently collected and transferred to a new tube to be rinsed twice with KRBHA-PS.

*Fatty acid (FA) analysis of PPAT*

Total lipids were extracted, according to the method of Folch, with chloroform/methanol 2:1 and saline solution. Organic phase was collected and triglycerides were purified by preparative thin-layer chromatography. FAs were transmethylated with 14% boron trifluouride in methanol, and FA methyl esters were dissolved in hexane and analysed by capillary gas chromatography. FAs were identified by comparison of their retention times with those of a standard mixture (Supelco 36 component FA methyl ester MIX, Supelco). Results for each FA expressed as mole % of total chromatogram FAs area.

*Cell culture*

Human PCa cell lines PC3 and LNCaP were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). PC3 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, 61870-010, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (PS). LNCaP cells were cultured in RPMI 1640 (ATCC modification, A10491-01, Thermo Fisher Scientific) with 10% FBS, 1%



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

PS and 1nM DHT. Cell lines were maintained in 37°C humidified incubator with 5% CO2:50 000 PC3 cells/cm$^2$ and 80 000 LNCaP cells/cm$^2$ seeded the day before, were then cultured in the presence or not of 300 µl of isolated adipocytes for 48 hours. Moreover, 50 000 PC3 cells/cm$^2$ were also seeded the day before, to be treated for 48H with different concentrations (0, 2.5, 20 and 30 µM) of EDA and EPA.

*Cell line pellets for immunohistochemistry*

Cells were washed with a Phosphate Buffered Saline solution (PBS) (CS1PBS00-01, Eurobio, Les Ulis, France), and were harvested by using TrypLE Express (12605-028, Gibco, USA). Centrifugation at 1500 rpm for 5 minutes was performed to get a cell pellet, which was subsequently fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, and cut in 3 µm sections.

*MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay*

30 000 PC3 cells per well were seeded the day before in a 24-well plate. They were then treated with different concentrations (0, 2.5, 20 and 30 µM) of EPA or EDA for 48 hours. Subsequently, 400 µl of MTT was added per well, and cells were incubated for 45 minutes at 37°C. Then, MTT was removed and 200 µl /well of DMSO was added. Absorbance was measured at 570 nm.

*Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out with StatView, version 5.0, software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Comparison between paired groups (intra and extra-prostatic areas for the same tumor, PC3 cells cultures without and with PPAT) was performed using the nonparametric paired Wilcoxon test. Comparisons between independent groups were performed using the Qui2 test (categorical data), or the non parametric Mann Whitney test



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

(continuous data). Correlation between markers expression in PC3 cells and FA composition of PPAT was assessed by using the nonparametric Spearman test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### *Differential expression of markers of aggressiveness and epigenetic marks between intra-prostatic and extra-prostatic areas*

The expression of markers of aggressiveness Ki67 and Zeb1 in cancer cells were overall increased in extra-prostatic areas when compared to the intra-prostatic contingent (p=0.01 and 0.001, respectively). In contrast, the epigenetic marks H3K27ac, 5MC and 5HMC were overall decreased when cancer cells are in contact with PPAT (p<0.0001, 0.002, and 0.004, respectively) (Table 2) (Fig. 1). No difference was observed between intra and extra-prostatic areas for the expression of H3K27me3. ERG expression, which attests to the presence of the *TMPRSS2/ERG* fusion in PCa cells, was found in 19 tumors on 59 in both intra-prostatic and extra-prostatic areas.

However, these phenotypic variations according to the proximity with PPAT are heterogeneous. Increased Ki67 and Zeb1 expression in cancer cells was observed only in 28 and 16 cases, respectively. Decreased expression of the marks H3K27ac, 5MC, and 5HMC was found in 21, 14, and 9 cases, respectively. The variations of the epigenetic marks are associated with each other: decreased expression of 5MC in extra-prostatic areas was associated with decreased expression of 5HMC (p=0.01, 6 patients in common), and with decreased expression of H3K27ac (p=0.0004, 11 patients in common). Increased expressions



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

of Ki67 and Zeb1 in extra-prostatic areas were significantly associated neither with each other, nor with decreased expression of epigenetic marks.

*Role of factors related to cancer cells in phenotypic variations between intra and extra-prostatic areas*

Variations of markers expression (increase or decrease) in extra-prostatic areas (compared to intra-prostatic areas) have been correlated with factors related to cancer cells, i.e. the ISUP score, and the ERG status. We observed that Ki67 expression is more often increased in extra-prostatic areas in high grade tumors (ISUP score 3 and 4) compared to ISUP 2 tumors (p=0.03, Qui2 test). ERG positive status was found in 19 on 59 tumors. Decreased 5MC expression in extra-prostatic areas (compared to intra-prostatic localisation) was most often observed in ERG positive (9 on 16, 56%) than in ERG negative tumors (5 on 29, 17%) (p=0.01, Qui2 test). No significant difference was observed according to the ERG status in the variation of other markers in extra-prostatic areas, including Ki67 (p=0.58), Zeb1 (p=0.63), H3K27ac (p=0.06), and 5HMC (p=0.56).

*Role of PPAT in the heterogeneity of phenotypic variations*

The BMI of the patients was not significantly associated with the variations in the expression in the extra-prostatic zones of Ki67 (26.3 versus 29.4, p=0.1, Mann Whitney test), Zeb1 (27.5 versus 27.7, p=0.8), H3K27ac (27.2 versus 26.1, p=0.4), 5MC (27.1 versus 26.6, p=0.5), and 5HMC (27.5 versus 26.4, p=0.3).

To analyze the role of PPAT in the variability of cancer cells phenotype, we co-cultivated the PC3 and LNCaP cell lines with and without PPAT from patients surgically treated for PCa. The expressions of Ki67, Zeb1, H3K27ac, H3K27me3, 5MC and 5HMC on PC3 cells were compared between the control condition and the co-cultures, according to the grade and stage



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

of PCa associated with PPAT (Table 3) (Fig. 2). Briefly, the expressions of Ki67 and Zeb1 were increased (compared to the control condition) after co-culture with PPAT associated with pT3 (p=0.02 and 0.03, respectively) and high grade tumors (ISUP score 3 or more) (p=0.05 and 0.04, respectively), while no difference was found between the control condition and co-culture with PPAT associated with either pT2 or low grade tumors (ISUP score 1 or 2). We also observed an increase in H3K27me3 expression after co-culture with PPAT associated with pT3 tumors when compared to the control condition, with a difference close to significance (p=0.06), whereas no difference was found between the control condition and co-culture with PPAT associated with pT2 PCa.

Comparable results were observed after co-culture between the LNCaP cell line and PPAT. Increased expressions of Ki67 and Zeb1 (p=0.04 and 0.03, respectively) were observed after co-culture with PPAT associated with pT3/high grade tumors, together with an increase close to significance in H3K27me3 expression (p=0.08). In contrast, no difference was found between the control condition and co-culture with PPAT associated with pT2/low grade tumors (supplementary Table 1, supplementary Figure 1).

FA composition of PPAT used for co-culture with PC3 cells is provided in the supplementary Table 2. Briefly, the lipid profile of PPAT is composed of saturated FAs (median 30.5 mole%), mono unsaturated FAs (median 54 mole%), n-6 PUFAs (median 11.5 mole%) , n-3 PUFAs (median 1.5 mole%) including EPA (median 0.09 mole%). No significant association was found between FA composition and the stage and grade of PCa associated with PPAT. However, we observed that EPA content was lower in PPAT associated with pT3 tumors compared to PPAT associated with pT2 tumors, with a difference close to significance (p=0.08). After correlation between FA composition of PPAT and markers expression after co-culture, no significant association was observed for both saturated and monosaturated FAs. In contrast, we found a positive correlation between Ki67 expression in PC3 cells and the



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

amount of 20.2 n-6 (eicosadienoic acid (EDA)) in PPAT (p=0.02) (Fig. 3A), and an inverse correlation between Ki67 expression and the amount of 20.5n-3 (EPA) in PPAT (p=0.04) (Fig. 3B). Moreover, H3K27me3 expression in PC3 cells was also inversely correlated with EPA content in PPAT (p=0.01) (Fig.3C).

Given the association found between cancer cell proliferation and both EDA and EPA content in PPAT, we cultivated PC3 cells with either EDA or EPA at different concentrations for 48H. We observed a significant decrease of Ki67 staining in PC3 cells treated with EPA at 30 µM (n=5) (median 60% positive cells), compared to the control condition (n=5) (median 80% positives cells) (p=0.04), whereas no difference was found between the control condition and cell proliferation after treatment with EDA (median of 80% positive cells) (p=0.15) (supplementary Figure 2). Moreover, we found a significant decrease of H3K27me3 expression in PC3 cells treated with EPA (no positive cells), compared to the control condition (median 2% of positive cells) (p=0.04), whereas no difference was found between the control condition and H3K27me3 expression after treatment with EDA (median 2% of positive cells) (p=0.79) (supplementary Figure 2). In addition, the MTT assays (n=5) showed a significant 16% decrease of PC3 cell viability after 48 hours EPA treatment at 30 µM, without any significative changes with either lower doses of EPA or EDA treatment.

For Peer Review

## DISCUSSION

Several studies have determined that the crosstalk between white adipose tissue and solid tumors favors cancer aggressiveness [25–27]. However, most reports have analyzed the impact of adipose tissue on cancer cells as an overall pro-tumoral effect without taking into

account the heterogeneity and the composition of adipose tissue. In the present study, we evidenced an heterogeneity in the phenotypic variations of PCa cells when they arrived in contact with PPAT, by using a human PCa cohort of pT3 stage, that allowed to compare for the same tumor intra-prostatic and extra-prostatic areas, where adipocytes are part of the tumor microenvironment.

We first observed an overall significant increase in PCa cell proliferation in extra-prostatic areas, as previously observed [4]. We also found a significant increase in Zeb1 expression, a key transcription factor of the EMT, when cancer cells are in contact with PPAT. Zeb1 has been shown to be highly expressed in advanced and aggressive PCa, and is therefore a marker of aggressiveness [5]. Moreover, we observed in extra-prostatic foci an overall significant decrease of H3K27ac expression. Since Zeb1 has been shown to recruit histone deacethylases (HDACs) in several cancers including PCa, EMT could interact with histone marks [28,29]. However, in the present study, we found no correlation between increased Zeb1 expression in extra-prostatic areas and decreased H3K27ac. In PCa, global DNA hypomethylation (i.e. global reduction of 5MC) is reported to occur late in cancer progression, at the stage of metastatic disease [14,15]. Moreover, it has been reported that the DNA methylation variant 5HMC is downregulated in castration resistant PCa [30]. In our study, 5MC and 5HMC were strongly expressed (median ~ 90-100%) in intra-prostatic areas of locally advanced tumors, and were downregulated for some patients in extra-prostatic areas, suggesting induced hypomethylation as cancer progresses beyond the capsule. In human tissues we observed that the repressive mark H3K27me3 was highly expressed, even in intraprostatic areas (median 100% of positive cells), and remained expressed in extraprostatic foci. H3K27me3 is induced by the methyl transferase enhancer of zest homolog 2 (EZH2). Upregulation of EZH2 seems to be an early event in prostate carcinogenesis, since it can be expressed in high grade prostatic intra-epithelial neoplasia (PIN), a key PCa precursor lesion [32]. It is likely that such



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

a high basal expression of H3K27me3 expression in human PCa does not allow to evidence an increase linked to contact with PPAT. In contrast, in cell culture, we observed that the basic expression of K3K27me3 is much lower in control condition (median 5% of positive cells), which allows to highlight an increased expression when the cells are co-cultured with certain PPATs.

Besides these global variations, we observed that for some patients the contact between cancer cells and PPAT is associated with increased expression of markers of aggressiveness and variations of epigenetic marks, and in contrast for other patients no difference is found. This differential impact of the interplay between PCa cells and PPAT could be related to either cancer cells or adipose tissue.

It has been previously shown that the effect of PPAT on PCa cells could depend on the type of cancer cells, with more pronounced impact on the androgen dependent cell line LNCaP than on the androgen independent cell line PC3 [10,32]. We showed herein that the increase of cancer cell proliferation in contact with PPAT is associated with the ISUP score of the tumor, Ki67 expression being more often increased in extra-prostatic areas compared to intra-prostatic areas in high grade tumors than in low grade tumors. Moreover, we found that the decrease of 5MC expression in extra-prostatic areas is more frequent in ERG positive PCa. A link between ERG and epigenetic markers, particularly 5MC, has been previously evidenced in PCa, with a significant association between ERG positive status and 5MC expression [33].

Several effects of both quantitative and qualitative variations of PPAT on the crosstalk with cancer cells have been previously reported. It has been shown that obesity is associated with increased expression of markers of oxydative stress in PPAT, leading to enhanced PCa cell invasion [34]. PPAT thickness has been associated with the ISUP score of the tumor, however without any correlation with whole body adiposity measures such as BMI, suggesting that PPAT volume is independent of total adiposity [35, 36]. In the present study, we found no



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

association between the BMI of the patients and variations of markers expression in extra-prostatic areas.

PPAT composition is likely to play a key role on its interactions with PCa cells. In the present study, we analyzed the phenotypic variations of PC3 and LNCaP cells after co-culture with different types of PPAT. We observed that PPAT from patients with pT3 and/or high grade PCa induce increased expression of markers of aggressiveness in both cell lines compared to the control condition, while no difference was found between the control condition and co-culture with PPAT from patients with either pT2 and/or low grade tumors. An effect of PPAT on EMT transcription factors has already been shown after co-culture between PC3 and PPAT, but without analysis according to the type of PPAT [10]. It is likely that the contact between cancer cells and adipose tissue in pT3 PCa could modify PPAT composition, since it has been shown that tumor conditioned medium is able to upregulate the expression of some cytokines in adipose tissue [37]. We also observed an upregulation of the pro-tumoral epigenetic mark H3K27me3 after co-culture with pT3/high grade PPAT, although the difference was not significant. In our study, the co-cultures might have been too short (48h) to allow significant changes of the epigenetic marks. In fact, other studies have demonstrated global epigenetic modifications in PCa cell lines, but after a longer time of culture [38,39]. The impact of PPAT on epigenetic markers has been previously shown, since adipose tissue from mice with metabolic syndrome has been reported to induce differential epigenetic modifications, i.e. increased miR production, in PCa cells, when compared to control adipose tissue [40]. After analyze of the FA composition of PPAT used for co-culture with PC3 cells, we observed that EPA content was lower in PPAT associated with pT3 tumors compared to PPAT associated with pT2 tumors, with a difference close to significance. In a previous work analyzing 106 PPAT from Caucasian patients with PCa, the FA composition, and particularly low EPA level, was found to be associated with high PCa grade and stage [8]. It is likely that



For Peer Review

in the present study, the number of PPAT cases was insufficient to identify a significant difference. In fact, when compared with our previous report mentionned above, we observed that the lipid profiles in the present study are very close for each class of FAs, including EPA. After correlation between FA composition of PPAT and markers expression after co-culture, we found a significant positive correlation between Ki67 expression in PC3 cells and the amount of 20.2 n-6 (EDA) in PPAT, and an inverse correlation between the amount of EPA and both Ki67 and H3K27me3 expression. By using PC3 treatment by either EPA or EDA, we confirmed a causal relationship between EPA and decreased cancer cell proliferation, assessed by both immunohistochemistry and MTT assays. Our results also suggest that EPA could act at least in part through modulation of the epigenetic mark H3K27me3. In contrast, PC3 cell proliferation was not significantly modified by EDA treatment. It is likely that the balance between pro- and anti-tumor FAs (represented by the lipid fraction as a whole) could have a greater impact on cancer cells than the effect of an isolated FA. The anti-tumoral effect of EPA in PCa has already been suggested by several studies. EPA is able to decrease EMT in PCa cells [41], to reduce PCa growth [42], and to reduce PCa vascularity [43]. In contrast EDA is a n-6 FA, whose role in PCa remains unknown. However, a recent study analyzing plasma metabolomics in PCa patients and controls has shown that plasma EDA levels are significantly associated with an increased risk to develop PCa [44]. We acknowledge certain limitations of our study. First, most of the data presented herein are descriptive by nature, and the mechanisms by which EPA and EDA could impact the proliferation and migration of PCa cells remain to be evaluated. Moreover, besides the lipid composition, other PPAT components, such as soluble factors, are also likely to be involved in the variable impact of adipose tissue on cancer cells. At the end, the links between the lipid composition of the adipose microenvironment and the variations of the epigenetic marks remain now to be further evaluated.



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

All together, these results suggest that the effects of PPAT on PCa cells may depend both on the specific characteristics of the tumor, and on the composition of adipose tissue. Nutritional supplementation with EPA could decrease the impact of the adipose microenvironment on PCa aggressiveness and therefore disease progression.

For Peer Review



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

## REFERENCES


1. Damber JE, Aus G. Prostate Cancer. Lancet 2008, 371: 1710–1721. doi:10.1016/S0140-6736(08)60729-1.
2. Zhou CK, Check DP Lortet-Tieulent, J.; Laversanne, M.; Jemal, A.; Ferlay, J.; Bray, F.; Cook, M.B.; Devesa, S.S. Prostate Cancer Incidence in 43 Populations Worldwide: An Analysis of Time Trends Overall and by Age Group. Int J Cancer 2016, 138: 1388–1400. doi:10.1002/ijc.29894.
3. Dongre A, Weinberg RA. New Insights into the Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Implications for Cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 2019, 20: 69–84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
4. Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah V.A, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, Liu T, Simons JW, O'Regan RM. Insulin-like Growth Factor-I-Dependent up-Regulation of ZEB1 Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells. Cancer Res 2008, 68: 2479–2488. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2559.
5. Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G. Clinical Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Prostate Cancer. Hum Pathol 2017, 61: 26–32. doi:10.1016/j.humpath.2016.10.013.
6. Cancel M, Pouillot W, Maheo K, Fontaine A, Crottès D, Fromont, G. Interplay between Prostate Cancer and Adipose Microenvironment: A Complex and Flexible Scenario. Int J Mol Sci 2022, 23: 10762. doi:10.3390/ijms231810762.
7. Nassar ZD, Aref AT, Miladinovic D, Mah CY, Raj GV, Hoy AJ, Butler LM. Peri-Prostatic Adipose Tissue: The Metabolic Microenvironment of Prostate Cancer. BJU Int 2018, 121 Suppl 3: 9–21. doi:10.1111/bju.14173.




ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

8. Figiel S, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, Guibon R, Besson P, Tavernier E, Blanchet P, Multigner L, Bruyère F, Haillot O, Mathieu R, Vincendeau S, Rioux-Leclercq N, Lebdai S, Azzouzi AR, Perrouin-Verbe MA, Fournier G, Doucet A, Rigaud J, Renaudin K, Maheo K, Fromont G. Fatty Acid Profile in Peri-Prostatic Adipose Tissue and Prostate Cancer Aggressiveness in African–Caribbean and Caucasian Patients. Eur J Cancer 2018, 91: 107–115. doi:10.1016/j.ejca.2017.12.017.
9. Figiel S, Bery F, Chantôme A, Fontaine D, Pasqualin C, Maupoil V, Domingo I, Guibon R, Bruyère F, Potier-Cartereau M, Vandier C, Fromont G, Maheo K. A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. Cancers 2019, 11: 1814. doi:10.3390/cancers11111814.
10. Altuna-Coy A, Ruiz-Plazas X, Sánchez-Martin S, Ascaso-Til H, Prados-Saavedra M, Alves-Santiago M, Bernal-Escoté X, Segarra-Tomás J, Chacón MR. The Lipidomic Profile of the Tumoral Periprostatic Adipose Tissue Reveals Alterations in Tumor Cell's Metabolic Crosstalk. BMC Med 2022, 20: 255. doi:10.1186/s12916-022-02457-3.
11. Majumdar S, Buckles E, Estrada J, Koochekpour S. Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer. Curr Genomics 2011, 12: 486–505. doi:10.2174/138920211797904061.
12. Zhao Y, Hu X, Yu H, Liu X, Sun H, Shao C. Alternations of Gene Expression in PI3K and AR Pathways and DNA Methylation Features Contribute to Metastasis of Prostate Cancer. Cell Mol Life Sci 2022, 79: 436. doi:10.1007/s00018-022-04456-2.
13. Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ, Moon KC, Cho YM, Kim D, Kang GH. Hypermethylation of CpG Island Loci and Hypomethylation of LINE-1 and Alu Repeats in Prostate Adenocarcinoma and Their Relationship to Clinicopathological Features. J Pathol 2007, 211: 269–277. doi:10.1002/path.2106.



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

14. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, Irizarry RA, Morgan J, Hicks J, DeWeese TL, Isaacs WB, Bova GS, De Marzo AM, Nelson WG. DNA Hypomethylation Arises Later in Prostate Cancer Progression than CpG Island Hypermethylation and Contributes to Metastatic Tumor Heterogeneity. Cancer Res 2008, 68: 8954–8967. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6088.

15. Florl AR, Steinhoff C, Müller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, Ackermann R, Schulz WA. Coordinate Hypermethylation at Specific Genes in Prostate Carcinoma Precedes LINE-1 Hypomethylation. Br J Cancer 2004, 91: 985–994. doi:10.1038/sj.bjc.6602030.

16. Goel S, Bhatia V, Biswas T, Ateeq, B. Epigenetic Reprogramming during Prostate Cancer Progression: A Perspective from Development. Semin Cancer Biol 2022, 83: 136–151. doi:10.1016/j.semcancer.2021.01.009.

17. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life. Nature 2011, 469: 343–349. doi:10.1038/nature09784.

18. Pardo JC, Ruiz de Porras V, Gil J, Font A, Puig-Domingo M, Jordà M. Lipid Metabolism and Epigenetics Crosstalk in Prostate Cancer. Nutrients 2022, 14: 851. doi:10.3390/nu14040851.

19. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, Hofstädter F, Bastian PJ, von Ruecker A, Müller SC, Rogenhofer S. Global Histone H3K27 Methylation Levels Are Different in Localized and Metastatic Prostate Cancer. Cancer Invest 2012, 30: 92–97. doi:10.3109/07357907.2011.636117.

20. Ngollo M, Lebert A, Daures M, Judes G, Rifai K, Dubois L, Kemeny JL, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L, Bernard Gallon D . Global Analysis of H3K27me3 as an Epigenetic Marker in Prostate Cancer Progression. BMC Cancer 2017, 17: 261. doi:10.1186/s12885-017-3256-y.



For Peer Review

21. Labbé DP, Zadra G, Ebot EM, Mucci LA, Kantoff PW, Loda M, Brown M. Role of Diet in Prostate Cancer: The Epigenetic Link. Oncogene 2015, 34: 4683–4691. doi:10.1038/onc.2014.422.

22. Huang Q, Wen J, Chen G, Ge M, Gao Y, Ye X, Liu C, Cai C. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibited Tumor Growth via Preventing the Decrease of Genomic DNA Methylation in Colorectal Cancer Rats. Nutr Cancer 2016, 68: 113–119. doi:10.1080/01635581.2016.1115526.

23. Attané C, Estève D, Moutahir M, Reina N, Muller, C. A Protocol for Human Bone Marrow Adipocyte Isolation and Purification. STAR Protoc 2021, 2: 100629. doi:10.1016/j.xpro.2021.100629.

24. Fontaine A, Bellanger D, Guibon R, Bruyère F, Brisson L, Fromont, G. Lipophagy and Prostate Cancer: Association with Disease Aggressiveness and Proximity to Periprostatic Adipose Tissue. J. Pathol. 2021, 255: 166–176. doi:10.1002/path.5754.

25. Lysaght J, van der Stok EP, Allott EH, Casey R, Donohoe CL, Howard JM, McGarrigle SA, Ravi N, Reynolds JV, Pidgeon GP. Pro-Inflammatory and Tumour Proliferative Properties of Excess Visceral Adipose Tissue. Cancer Lett 2011, *312*: 62–72. doi:10.1016/j.canlet.2011.07.034.

26. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, Le Gonidec S, Toulet A, Nieto L, Zaidi F, Majed B, Garandeau D, Socrier Y, Golzio M, Cadoudal T, Chaoui K, Dray C, Monsarrat B, Schiltz O, Wang YY, Couderc B, Valet P, Malavaud B, Muller C. Periprostatic Adipocytes Act as a Driving Force for Prostate Cancer Progression in Obesity. Nat Com 2016, 7: 10230. doi:10.1038/ncomms10230.

27. Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, Lau A, Narula N, Petricoin EF, Zaldivar F, Santos R, Tyson DR, Ornstein DK. Periprostatic Adipose Tissue as a Modulator of Prostate Cancer Aggressiveness. J Urol 2009, 182: 1621–1627. doi:10.1016/j.juro.2009.06.015.



For Peer Review

28. Roche J, Nasarre P, Gemmill R, Baldys A, Pontis J, Korch C, Guilhot J, Ait-Si-Ali S, Drabkin H. Global Decrease of Histone H3K27 Acetylation in ZEB1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. Cancers (Basel) 2013, 5: 334–356, doi:10.3390/cancers5020334.

29. Byles V, Zhu L, Lovaas JD, Chmilewski LK, Wang J, Faller DV, Dai Y. SIRT1 Induces EMT by Cooperating with EMT Transcription Factors and Enhances Prostate Cancer Cell Migration and Metastasis. Oncogene 2012, 31: 4619–4629. doi:10.1038/onc.2011.612.

30. Takayama K, Misawa A, Suzuki T, Takagi K, Hayashizaki Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S, Urano T, Inoue S. TET2 repression by androgen hormone regulates global hydroxymethylation status and prostate cancer progression. Nat Com 2015; 6: 8219. doi: 10.1038/ncomms9219

31. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002, 419:624–629.

32. Kaneko A, Satoh Y, Tokuda Y, Fujiyama C, Udo K, Uozumi J. Effects of Adipocytes on the Proliferation and Differentiation of Prostate Cancer Cells in a 3-D Culture Model. Int J Urol 2010, 17: 369–376. doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02472.x.

33. Storebjerg TM, Strand SH, Høyer S, Lynnerup AS, Borre M, Ørntoft T.F, Sørensen KD. Dysregulation and Prognostic Potential of 5-Methylcytosine (5mC), 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-Formylcytosine (5fC), and 5-Carboxylcytosine (5caC) Levels in Prostate Cancer. Clin Epigenetics 2018, 10: 105. doi:10.1186/s13148-018-0540-x.



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

34. Laurent V, Toulet A, Attané C, Milhas D, Dauvillier S, Zaidi F, Clement E, Cinato M, Le Gonidec S, Guérard A, Lehuyde C, Garandeau D, Nieto L, Renaud Gabaros E, Prats AC, Valet P, Malavaud B, Muller C. Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. Mol Cancer Res 2019, 17: 821–835. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-0748.

35. Woo S, Cho JY, Kim SY, Kim SH. Periprostatic Fat Thickness on MRI: Correlation with Gleason Score in Prostate Cancer. AJR Am J Roentgenol 2015, 204, W43-47. doi:10.2214/AJR.14.12689.

36. Roumiguié M, Estève D, Manceau C, Toulet A, Gilleron J, Belles C, Jia Y, Houël C, Pericart S, Le Gonidec S, Vallet P, Cormont M, Tanti JF, Malavaud B, Bouloulié A, Milhas D, Muller C. Periprostatic Adipose Tissue Displays a Chronic Hypoxic State That Limits Its Expandability. Am J Pathol 2022, 192: 926–942. doi:10.1016/j.ajpath.2022.03.008.

37. Ribeiro RJT, Monteiro CPD, Cunha VFPM, Azevedo ASM, Oliveira MJ, Monteiro R, Fraga AM, Príncipe P, Lobato C, Lobo F, Morais M, Silva V, Sanches Magalhaes J, Oliveira J, Guimaraes JT, Lopes CMS, Medeiros RM. Tumor Cell-Educated Periprostatic Adipose Tissue Acquires an Aggressive Cancer-Promoting Secretory Profile. Cell Physiol Biochem 2012, 29: 233–240. doi:10.1159/000337604.

38. Fatma Karaman E, Caglayan M, Sancar-Bas S, Ozal-Coskun C, Arda-Pirincci P, Ozden S. Global and region-specific post-transcriptional and post-translational modifications of bisphenol A in human prostate cancer cells. Environ Pollut. 2019; 255: 113318. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113318.

39. Treas JN, Tyagi T, Singh KP. Effects of chronic exposure to arsenic and estrogen on epigenetic regulatory genes expression and epigenetic code in human prostate epithelial cells. PLoS One. 2012, 7(8): e43880. doi: 10.1371/journal.pone.



For Peer Review

40. Massillo C, Dalton GN, Porretti J, Scalise GD, Farré PL, Piccioni F, Secchiari F, Pascuali N, Clyne C, Gardner K, de Luca P, de Siervi A. CTBP1/CYP19A1/Estradiol Axis Together with Adipose Tissue Impacts over Prostate Cancer Growth Associated to Metabolic Syndrome. Int J Cancer 2019, 144, 1115–1127, doi:10.1002/ijc.31773.

41. Bery F, Cancel M, Chantôme A, Guibon R, Bruyère F, Rozet F, Mahéo K, Fromont G. The Calcium-Sensing Receptor Is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. Cancers (Basel) 2020, 12, doi:10.3390/cancers12040860.

42. Bilodeau JF, Gevariya N, Larose J, Robitaille K, Roy J, Oger C, Galano JM, Bergeron A, Durand T, Fradet Y, Julien P, Fradet V. Long Chain Omega-3 Fatty Acids and Their Oxidized Metabolites Are Associated with Reduced Prostate Tumor Growth. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2021, 164: 102215, doi:10.1016/j.plefa.2020.102215.

43. Gevariya N, Lachance G, Robitaille K, Joly Beauparlant C, Beaudoin L, Fournier É, Fradet Y, Droit A, Julien P, Marette A, Bergeron A, Fradet V. Omega-3 Eicosapentaenoic Acid Reduces Prostate Tumor Vascularity. Mol Cancer Res 2021, 19: 516–527, doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0316.

44. Lin X, Lécuyer L, Liu X, Triba MN, Deschasaux Tanguy M, Demidem A, Liu Z, Palama T, Rossary A, Vasson MP, Hercberg S, Galan P, Savarin P, Xu G, Touvier M. Plasma Metabolomics for Discovery of Early Metabolic Markers of Prostate Cancer Based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. Cancers (Basel) 2021, 13: 3140, doi:10.3390/cancers13133140.

For Peer Review

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Locally advanced pT3 PCa: phenotypic variations of cancer cells in extra-prostatic areas when compared to intra-prostatic areas.** When cancer cells are in contact with PPAT, the percentage of Ki67 positive cells increased in 28 of 59 cases (B), and the percentage of Zeb1 expressing cells increased in 16 cases (D), when compared to intra-prostatic localization (A, C, respectively)). The expression of H3K27ac, 5MC, and 5HMC decreased in extra-prostatic areas (F, H J, respectively) in 21, 14, and 9 cases respectively, when compared to intra-prostatic localization (E, G I, respectively). Scale bars: 100 μm.

**Figure 2: Phenotypic variations of PC3 cells after co-culture with PPAT.** When compared to the control condition (A, D), the percentage of Ki67 and Zeb1 expressing cells was not modified after co-culture with PPAT from pT2 PCa patients (p= 0.18 and 0.15, respectively)) (B, E), and was increased after co-culture with PPAT from pT3 PCa patients (p= 0.02 and 0.03, respectively) (C, F). The percentage of H3K27me3 positive cells was identical in control conditions (G) and after co-culture with PPAT from pT2 PCa patients (p= 0.18) (H), with an increase near significance increased after co-culture with PPAT from pT3 PCa patients (p=0.06) (I). Scale bars: 100 μm.

**Figure 3: Correlation between Ki67 expression in PC3 cells and FA content of PPAT used for co-culture**. The percentage of Ki67 expressing cells was positively correlated with EDA (20.2 n-6) (p=0.02, Spearman test) (A), and negatively correlated with EPA (20.5 n-3) (p=0.04) (B). The percentage of H3K27me3 positive cells was negatively correlated with EPA content (p=0.01) (C).



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

**SUPPLEMENTARY MATERIALS**: Legends

**Supplementary Table 1: Expression of Zeb1, Ki67 and epigenetic markers in LNCaP cells in control condition and after co-culture with PPAT**

**Supplementary Table 2: Fatty acid composition of PPAT used for co-culture with PC3 cells**

**Supplementary Figure 1: Phenotypic variations of LNCaP cells after co-culture with PPAT.** When compared to the control condition (A, D), the percentage of Ki67 and Zeb1 expressing cells was not modified after co-culture with PPAT from pT2 low grade PCa patients (p=0.11 and 0.99, respectively) (B, E), and was increased after co-culture with PPAT from pT3 high grade PCa patients (p=0.04 and 0.03, respectively) (C, F). The percentage of H3K27me3 positive cells was identical in control conditions (G) and after co-culture with PPAT from pT2 PCa patients (p=0.18) (H), with an increase near significance after co-culture with PPAT from pT3 PCa patients (p=0.08) (I). Scale bars: 100 µm.

**Supplementary Figure 2: Phenotypic variations of PC3 cells after 48H culture with either EDA or EPA at 30µm.** When compared to the control condition (A, D), the percentage of Ki67 and H3K27me3 expressing cells was not significantly different when cells were treated with EDA (B, E). In contrast, both Ki67 and H3K27me3 expressions were decreased when cells were treated with EPA (p=0.04) (C, F). Scale bars: 100 µm.

**ACKNOWLEDGEMENTS**: The authors thanks the Region Centre Val de Loire for financial support

**CONFLICT OF INTEREST**: we have no conflict of interest to declare



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

For Peer Review

**Table 1: Patients and tissues characteristics**.

| | |
|---|---|
| **Age: median (range)** | 66 y (48-75) |
| **PSA: median (range)** | 8.9 ng/ml (2.5-26) |
| **BMI: median (range)** | 26.2 (18-34.5) |
| **ISUP score** | |
| **2** | n= 28 |
| **3** | n= 18 |
| **4-5** | n= 13 |

y: years; BMI: Body Mass index

For Peer Review



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

**Table 2: Expression of Zeb1, Ki67 and epigenetic markers in prostate tissues**

.

| | Intraprostatic area | Extraprostatic area | *p* |
|---|---|---|---|
| **Ki67** (median % + cells, range) | 3.1 (1-38) | 5.2 (1-27) | **0.01** |
| **Zeb1** (median % + cells, range) | 0 (0-90) | 20 (0-100) | **0.0003** |
| **H3K27ac** (median % + cells, range) | 100 (30-100) | 80 (0-100) | **<0.0001** |
| **H3K27me3** (median % + cells, range) | 100 (50-100) | 100 (50-100) | 0.18 |
| **5MC** (median % + cells, range) | 90 (60-100) | 90 (5-100) | **0.002** |
| **5HMC** (median % + cells, range) | 100 (40-100) | 100 (0-100) | **0.004** |

For Peer Review

**Table 3: Expression of Zeb1, Ki67 and epigenetic markers in PC3 cells in control condition and after coculture with PPAT**

.

| Culture condition | Ki67 (median % + cells, range) | Zeb1 (median % + cells, range) | H3K27ac (median % + cells, range) | H3K27me3 (median % + cells, range) | 5MC (median % + cells, range) | HMC (median % + cells, range) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Control** | 50 (30-60) | 50 (10-100) | 100 (70-100) | 5 (0-20) | 70 (40-100) | 100 (20-100) |
| **Coculture pT2 PPAT** | 60 (40-80) | 90 (30-100) | 100 (100-100) | 5 (2-8) | 90 (80-90) | 100 (100-100) |
| ***p*** | 0.18 | 0.15 | 0.90 | 0.18 | 0.11 | 0.55 |
| **Coculture pT3 PPAT** | 65 (30-75) | 100 (100-100) | 100 (40-100) | 12 (2-20) | 95 (50-100) | 100 (100-100) |
| ***p*** | **0.02** | **0.03** | 0.26 | 0.06 | 0.10 | 0.15 |
| **Coculture low grade PPAT** | 55 (30-70) | 100 (30-100) | 100 (40-100) | 5 (2-8) | 90 (50-100) | 100 (100-100) |
| ***p*** | 0.11 | 0.10 | 0.65 | 0.11 | 0.11 | 0.40 |
| **Coculture high grade PPAT** | 70 (40-80) | 100 (100-100) | 100 (90-100) | 10 (5-20) | 95 (90-100) | 100 (100-100) |
| ***p*** | 0.05 | **0.04** | 0.91 | 0.10 | 0.10 | 0.15 |

.

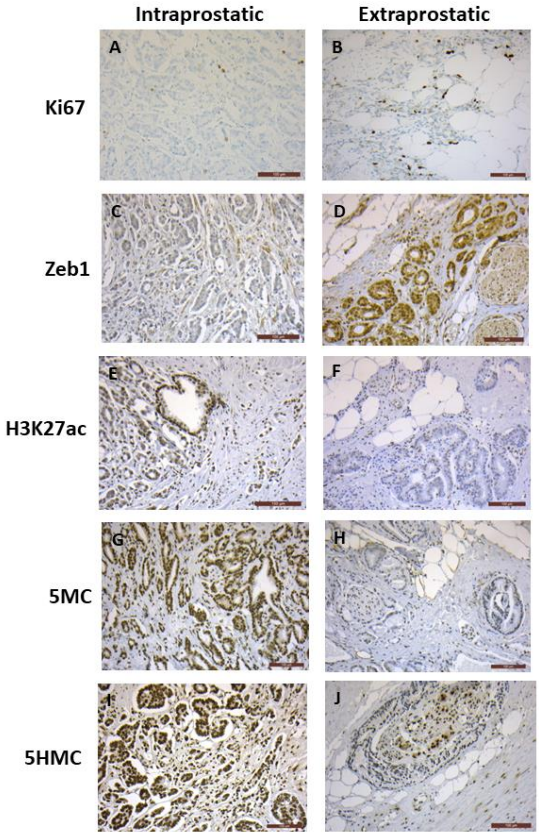
For Peer Review



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

# Figure 1

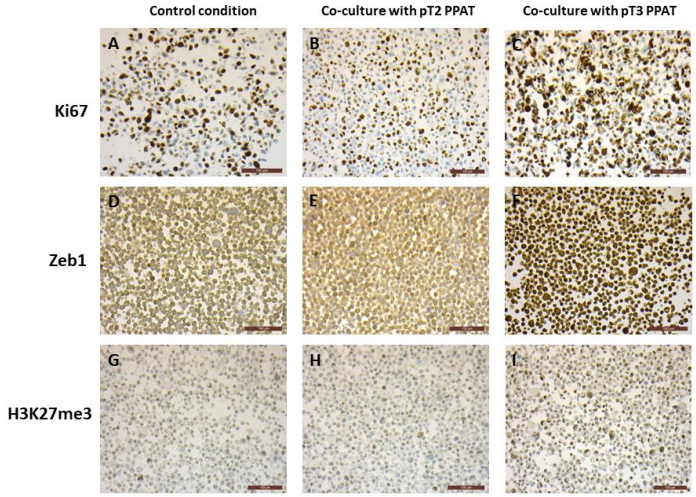





60x81mm (300 x 300 DPI)

# Figure 2

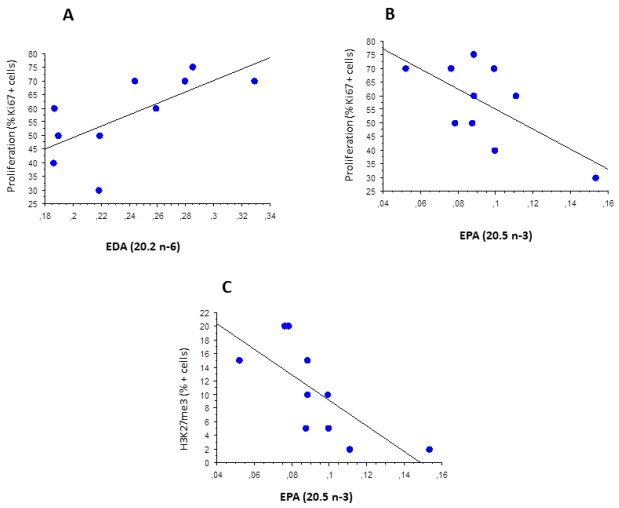





81x60mm (300 x 300 DPI)

# Figure 3

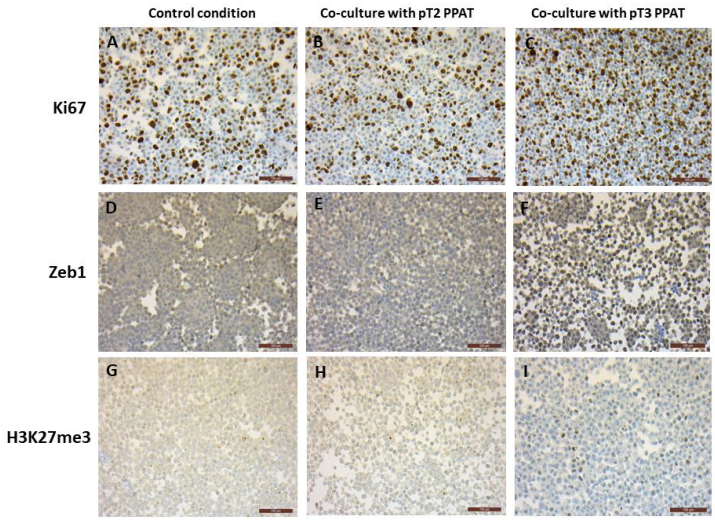





81x60mm (300 x 300 DPI)

# Supplementary figure 1






81x60mm (300 x 300 DPI)

**Supplementary Table 1: Expression of Zeb1, Ki67 and epigenetic markers in LNCaP cells in control condition and after co-culture with PPAT**

.

| Culture condition | Ki67 (median % + cells, range) | Zeb1 (median % + cells, range) | H3K27ac (median % + cells, range) | H3K27me3 (median % + cells, range) |
|---|---|---|---|---|
| **Control** | 40 (40-50) | 0 (0-10) | 100 (30-100) | 0 (0-5) |
| **Coculture pT2/low grade PPAT** | 40 (30-50) | 0 (0-10) | 100 (100-100) | 0 (0-10) |
| ***p*** | 0.11 | 0.99 | 0.90 | 0.18 |
| **Coculture pT3/high grade PPAT** | 60 (40-70) | 7.5 (5-30) | 100 (100-100) | 2.5 (0-5) |
| ***p*** | **0.04** | **0.03** | 0.99 | 0.08 |

.

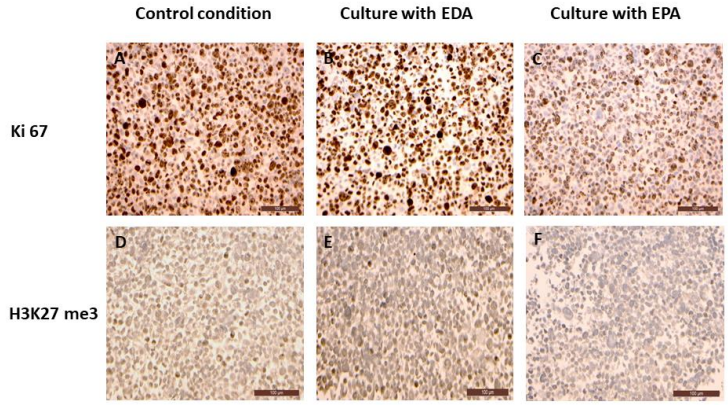
For Peer Review

**Supplementary Table 2**: Fatty acid composition of PPAT used for co-culture with PC3 cells

| Fatty acids mole %, | | Median (range) (n=10) |
|---|---|---|
| **Saturated fatty acids** | | **30.48 (25.42-36.21)** |
| 14:0 | | 3.22 (2.20-4.20) |
| 15:0 | | 0.33 (0.18-0.54) |
| 16:0 | Palmitic acid | 22.08 (18.23-25.91) |
| 17:0 | | 0.27 (0.18-0.40) |
| 18:0 | | 4.69 (2.77-6.15) |
| 20:0 | | 0.17 (0.12-0.25) |
| **Mono insaturated fatty acids** | | **54.18 (48.24-57.15)** |
| 14:1 | | 0.30 (0.23-0.53) |
| 15:1 | | 0.12 (0.05-0.19) |
| 16:1 | | 4.69 (3.97-6.91) |
| 17:1 | | 0.26 (0.18-0.35) |
| 18:1 | Oleic acid | 46.39 (42.82-50.40) |
| 20:1 | | 0.77 (0.55-0.93) |
| 22:1 | | 0.08 (0.01-0.14) |
| **n-6 PUFA** | | **11.48 (8.76-17.87)** |
| 18:2n-6 | Linoleic acid | 10.56 (7.87-16.86) |
| 18:3n-6 | | 0.07 (0.02-0.13) |
| 20:2n-6 | Eicosadienoic acid | 0.23 (0.19-0.33) |
| 20:3n-6 | | 0.17 (0.11-0.34) |
| 20:4n-6 | Arachidonic acid | 0.29 (0.19-0.43) |
| 22:4n-6 | | 0.14 (0.09-0.20) |
| **n-3 PUFA** | | **1.56 (0.96-2.08)** |
| 18:3n-3 | Alpha-linolenic acid | 0.83 (0.52-1.46) |
| 20:5n-3 | Eicosapentaenoic acid | 0.09 (0.05-0.15) |
| 22:5n-3 | Docosapentaenoic acid | 0.28 (0.16-0.38) |
| 22:6n-3 | Docosahexaenoic acid | 0.21 (0.14-0.48) |
| **Ratio** | | |
| n-6 PUFA / n-3 PUFA | | 8.37 (5.23-10.13) |

# Supplementary figure 2






81x60mm (300 x 300 DPI)

# Effet de l'EPA sur la croissance tumorale dans un modèle murin de CaP

Dans la partie 2, nous avons observé *in vitro* que la prolifération des cellules PC3 était inversement corrélée au contenu en EPA du TAPP des patients, ce qui vient appuyer des résultats antérieurs du laboratoire. L'ensemble de ces résultats nous a donc conduit à réaliser une expérimentation animale, afin de chercher à confirmer l'effet anti-tumoral de l'EPA sur un modèle *in vivo* de CaP.

L'expérimentation animale a été réalisée à Rennes, par l'équipe du Pr Amélie Rebillard, au moyen de xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques murines (TRAMP-C2) à des souris males immunocompétentes. Ces souris ont ensuite été alimentées par un régime contrôle ou un régime isolipidique enrichi en EPA. La transcriptomique des xénogreffes a été explorée au décours de l'expérimentation par séquençage ARN pour trois échantillons de chaque groupe expérimental. Nous avons également étudié la composition lipidique des TA péri-épididymaires des souris.
Au décours de l'expérimentation animale, nous avons réalisé, *in vitro*, des co-cultures de cellules PC3 avec des explants de TA murin, afin d'étudier si les TA issus des souris supplémentées en EPA pouvaient modifier les caractéristiques d'agressivité des cellules cancéreuses (prolifération, migration, expression de Zeb1) par rapport aux explants de TA issus des souris alimentées avec le régime contrôle. Nous avons également recherché si cela entrainait une modification du contenu lipidique des cellules PC3 ou une modulation des entrées calciques SOCE.

Tout d'abord, nous avons observé que la supplémentation en EPA avait diminué la croissance tumorale des xénogreffes de manière statistiquement significative ($p < 0,01$).
De plus, les TA issus du groupe supplémenté en EPA étaient très enrichis en EPA, puisqu'ils contenaient 100 fois plus d'EPA que les TA issus du groupe avec alimentation contrôle ($p < 0,001$). A noter que ces TA contenaient *a contrario* significativement moins d'EDA que les TA contrôles ($p < 0,001$). Cette balance EPA/EDA était également suggérée dans nos résultats antérieurs (partie 2), où la prolifération des cellules PC3 était corrélée à la teneur en EDA des TAPP et inversement corrélée à leur teneur en EPA.
Après co-culture entre des cellules PC3 et les explants de TA issus des souris xénogreffées, nous avons observé que la supplémentation en EPA des TA induisait : une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses, sans modifier leur migration (sur un modèle de migration en cellule isolée), ce qui était accompagné d'une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques et une diminution des entrées calciques SOCE. Enfin lorsqu'on a réalisé les co-cultures en condition d'hypoxie afin d'induire la TEM des cellules cancéreuses, on a observé une diminution de la CAIX (marqueur d'hypoxie) et du facteur de transcription de la TEM, Zeb1.

En conclusion, cette dernière partie du travail de thèse vient étayer nos données préalables sur le rôle anti-tumoral de l'EPA dans le développement du CaP, avec un effet anti-prolifératif que soit sur le modèle de xénogreffe *in vivo* ou sur notre modèle de co-culture *in vitro*. Nous avons également observé une diminution de l'induction de la TEM (transcrits de Zeb1) en conditions d'hypoxie.

### Xénogreffe de cellules cancéreuses prostatiques TRAMP-C2 chez des souris C57BL/6

Les cellules TRAMP-C2 sont des cellules murines de cancer de prostate. Elles proviennent d'un don de l'équipe de monsieur Ramon Alemany Bonastre, de l'Institut Catalan d'Oncologie (ICO) en Espagne. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM (41965-039, Gibco) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (A3160801, Gibco), 5% de Nu-Serum (355100, Corning™), 1% d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine, A5955, Gibco), 4 µg/l de dehydroisoandrosterone 3-sulfate sodium salt dihydrate (D5297, Sigma) et 5 µg/ml d'insuline (I6634, Sigma), à pH = 6,7. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO2. L'absence de mycoplasme a été vérifiée.

27 souris males C57BL/6 (souris immunocompétentes) âgées de 7 à 9 semaines, ont été xénogreffées par injection sous cutanée dans le flanc droit de $2.10^6$ cellules TRAMP-C2. Le jour de la xénogreffe a été nommé J0. En raison d'un échec de prise de xénogreffe pour une souris, seulement 26 souris ont été analysées.

L'ensemble de l'expérimentation animale a été réalisée par l'équipe du Pr Rébillard à l'université de Rennes.

### Intervention : régime alimentaire supplémenté en EPA

Les souris xénogreffées ont été étudiées selon deux modalités différentes. La moitié recevait un régime contrôle, l'autre moitié recevait un régime isocalorique isolipidique enrichi en EPA. Le tableau 9 décrit la composition lipidique des deux régimes nutritionnels que nous avons élaborés. Dans les deux régimes, les AG représentaient 5% des lipides. Les régimes nutritionnels ont débuté 5 jours après la xénotransplantation. Les souris ont été placées dans des cages individuelles. La quantité de nourriture ingérée a été estimée quotidiennement pour chaque souris.

A noter que l'apport lipidique en AG saturés, monoinsaturés et polyinsaturés de ces régimes nutritionnels est cohérent avec l'alimentation humaine « occidentale » (~45% saturés, ~40% monoinsaturés, ~10% polyinsaturés) (227). Le rapport omégas 6/omégas 3 était de 9 dans le régime contrôle et de 0,9 dans le régime EPA.

Tableau 9 : Composition en acides gras des deux régimes (contrôle ou enrichi en EPA)

| | **Régime Contrôle** | **Régime EPA** |
|---|---|---|
| **Origine des AG du régime (%)** | 15% d'huile de colza,<br>65% d'huile de palme,<br>20% d'huile d'arachide | 13% d'huile de colza,<br>55% d'huile de palme,<br>16% d'huile d'arachide,<br>16% d'EPA |
| **Contenu en AG (mole%)** | | |
| **AG saturés** | 36,74 | 32,10 |
| dont 16:0 (acide palmitique) | 30,57 | 25,90 |
| **AG mono-insaturés** | 50,09 | 43,28 |
| dont 18:1n-9 (acide oléique) | 49,07 | 41,82 |
| **AG poly insaturés** | | |
| **Omégas 6** | 11,51 | 10,70 |
| dont 18:2n-6 (acide linoléique) | 11,45 | 9,79 |
| 20:2n-6 (EDA) | 0,02 | 0,10 |
| **Omégas 3** | 1,28 | 12,22 |
| dont 18:3n-3 (acide α–linolénique) | 1,25 | 1,13 |
| 20:5n-3 (EPA) | 0,01 | 9,93 |
| 22:6n-3 (DHA) | 0,00 | 0,94 |
| **Rapport omégas 6/omégas 3** | 9,0 | 0,9 |

Abréviations : AG : acides gras, EDA : acide écosadiénoïque ; EPA : acide écosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque

La croissance tumorale a été relevée deux à trois fois par semaine en estimant le volume tumoral à partir de la mesure au pied à coulisse de la largeur, la longueur et la hauteur de chaque tumeur. A partir de ces mesures, le volume tumoral était estimé à l'aide de la formule suivante :

Volume tumoral ($mm^3$) = Largeur (mm) x Longueur (mm) x Hauteur (mm) x 0,523.

A J55 les souris ont été sacrifiées. Le déroulement de l'expérimentation animale est résumé en figure 12.

La courbe de la croissance moyenne +/- SEM (erreur standard de la moyenne) des tumeurs de chaque groupe a été représentée à l'aide de GraphPad Prism version 7.0a.

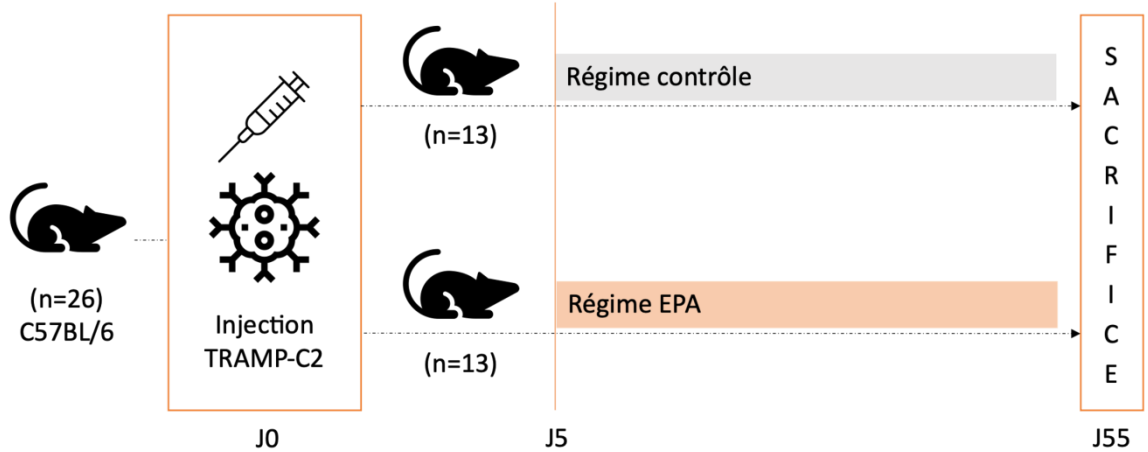



Figure 12 : Résumé du protocole expérimental animal *(adapté du schéma de l'équipe du Pr Rébillard)*

**Tissus prélevés au sacrifice**

Au sacrifice des souris, les tumeurs, les TA sous-cutanés péritumoraux, et les TA péri-épididymaires (équivalent anatomique murin du TAPP humain, voir figure 13) ont été prélevés.

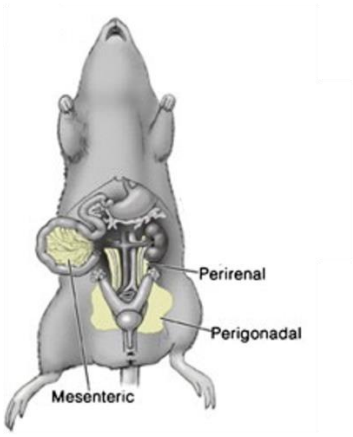



Figure 13 : Localisation des différents TA pour la souris, notamment du TA péri-épididymaire appelé « perigonadal » en anglais. *(Adapté de Bartness et al. (228))*
*Abréviations : TA = tissu adipeux*

Les tumeurs ont été en partie inclues en paraffine pour réaliser des IHC, et en partie congelées à -80°C pour en extraire les ARNs. Les prélèvements des TA sous cutané péritumoraux ont été inclus en paraffine pour IHC. Une partie des TA péri-épididymaires a été conservée à l'état frais pour réaliser des co-cultures avec des cellules cancéreuses PC3. Une autre partie a été congelée à -80°C en vue de l'analyse de leur composition lipidique.

**Analyse lipidique du TA péri-épididymaire des souris**

Nous avons analysé 13 TA du groupe avec régime contrôle et 8 TA du groupe avec régime EPA pour déterminer leur composition lipidique en AG.
Il a tout d'abord été réalisé une extraction des lipides totaux du TA par la méthode de Folch à l'aide de solvants, soit un mélange de chloroforme et méthanol en ratio 2 pour 1 (en volumes), puis d'un lavage à l'aide d'une solution saline. La phase organique a ensuite été collectée, puis les triglycérides ont été purifiés grâce à une chromatographie en couche mince.
Par la suite, les AG des triglycérides purifiés ont été transméthylés par du trifluorure de bore à une concentration de 14% dans du méthanol. Les méthyls esters d'AG obtenus ont été dissous dans de l'hexane, puis analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les AG ont été identifiés en comparant leur temps de rétention avec ceux d'une gamme étalon standard industrielle (MIX de 36 composés de méthyls esters d'AG de Supelco).
Les résultats obtenus pour chaque type d'AG est exprimé en mole% de l'aire totale du chromatogramme d'AG.

**Préparation du TA péri-épididymaire pour les co-cultures**

Nous avions initialement prévu d'extraire les adipocytes des TA murins en vue d'une co-culture avec les cellules cancéreuses. En amont du protocole expérimental animal, nous avons donc travaillé sur la technique d'isolement d'adipocytes à partir de TA.
Nous avions d'abord constaté que l'extraction réalisée à partir de TA congelé, comme décrit en partie 2, ne permet de récupérer que peu d'adipocytes viables. C'est pourquoi on parle plutôt d'un isolement de « fraction adipocytaire » de tissu adipeux dans ce travail antérieur.

Nous avons alors réalisé des isolements d'adipocytes à partir de TA frais provenant de souris sacrifiées depuis moins d'une heure (don du Dr William Raoul de notre laboratoire INSERM U1069), voir figure 14. On constate qu'on obtient davantage d'adipocytes viables comparativement au rendement des extractions à partir de TA congelé. Les adipocytes viables sont visualisés par le double marquage positif du cytosquelette (représenté en vert) et des gouttelettes lipidiques (représentées en rouge). A noter que de nombreuses gouttelettes lipidiques apparaissent sur la préparation, indiquant qu'un certain nombre d'adipocytes ont dû être altérés et ont déversé leur contenu.

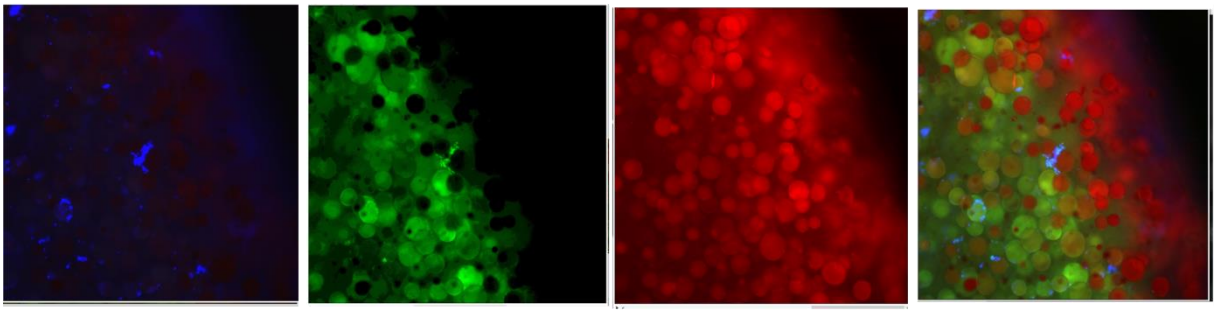


Figure 14 : Adipocytes isolés à partir de TA murin frais.
*Grossissement x10. De gauche à droite : marquage nucléaire (Hoechst, en bleu), marquage cytosquelette (Actine, en vert), marquage lipidique (Oil Red O, en rouge), photo avec les trois marquages.*

Quelle que soit la méthode d'isolement d'adipocytes utilisée, nous avons constaté que lors de la mise en co-culture, que ce soit directement dans le milieu de culture (voir figure 15) ou au moyen d'inserts de co-culture habituellement utilisés de type « filtre », une lyse de la majorité des adipocytes survenait dans les minutes suivant la mise en co-culture. Nous avons supposé que cela venait du contact des adipocytes avec l'air et/ou de leur fragilité après avoir été extraits du tissu adipeux. Même le modèle A2 de droite sur la figure 15 n'a pas permis de garder les adipocytes immergés, car ils avaient tendance à remonter le long des parois de l'insert pour se retrouver à l'interface air/milieu de culture.
C'est pourquoi nous avons par la suite développé un modèle de co-culture directement à partir d'explants de TA frais. Afin de protéger le TA du contact de l'air qui participe en grande partie à la lyse des adipocytes, l'explant de TA a été placé dans des inserts adhérents au fond du puits de co-culture, et immergés dans le milieu de culture.

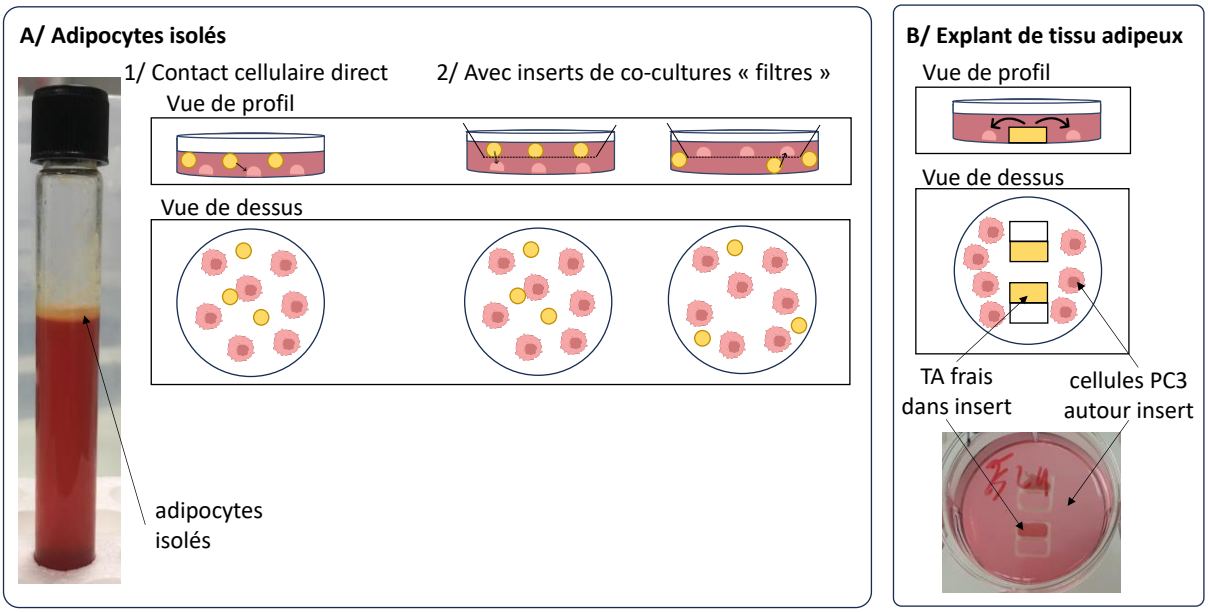



Figure 15 : Représentation des différentes méthodes de co-culture testées.
*Les flèches noires représentent les échanges qui s'opèrent des adipocytes vers les cellules cancéreuses. Il existe probablement des échanges dans l'autre sens, mais nous ne les avons pas étudiés dans ce travail.*

### Co-culture TA-PC3

La lignée PC3 provient de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les cellules ont été amplifiées en milieu RPMI 1640 (61870-010, Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 5% de SVF (CVFSVF00-01, Eurobio scientific) et 1% d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine), dans un incubateur avec 5% de CO2 et à 37°C. Les cellules n'ont jamais été cultivées au-delà de 15 passages. Elles ont été régulièrement testées pour les mycoplasmes et ces tests sont toujours restés négatifs.

Le matin de la mise en co-culture (soit le jour du sacrifice des souris), des inserts de culture destinés à recevoir le TA frais ont été déposés dans des plaques 6 puits. Les cellules PC3 ont été ensemencées autour de ces inserts, à 130 000 cellules par puits, dans 2 ml de milieu DMEM (41966, Gibco) supplémenté avec 1% de SVF et 1% d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine).

Le soir, 140 mg de TA murin frais a été disposé dans les chambres des inserts de co-culture. Puis du milieu DMEM avec 1% de SVF et 1% de PS a été ajouté pour un volume total de 7 ml par puits, afin de s'assurer de l'immersion complète du TA pour le préserver des contacts avec l'air. Les co-cultures ont été réalisées avec 22 explants de TA dont 11 provenaient des souris avec le régime contrôle et 11 de celles avec le régime EPA.

La co-culture a été poursuivie pendant 3,5 jours. Un tiers des co-cultures a été réalisée en chambre à hypoxie (Invivo$O_2$, Baker Ruskinn) à 1% d'$O_2$, 5% de $CO_2$ et à 37°C, dans l'objectif de se rapprocher des conditions physiopathologiques et d'induire la TEM des PC3.

### Test de viabilité cellulaire : MTT

Ce test a été utilisé afin de mesurer l'effet du TA murin plus ou moins enrichi en EPA sur la prolifération cellulaire des PC3.

Ce test permet d'estimer le nombre de cellules viables en quantifiant l'activité mitochondriale de chaque condition. Le réactif MTT contenant du milieu de culture et des sels de tétrazolium a été utilisé. Les sels de tétrazolium sont réduits en cristaux de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. L'ajout de DMSO permet de dissoudre les cristaux et génère une coloration violette, proportionnelle au nombre de cellules viables, dont l'absorbance à 570 nM est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Pour cette expérience, 10 000 cellules PC3 issues des co-cultures avec le TA murin ont été ensemencées, en triplicat, dans des plaques 96 puits, pour 8 échantillons de chaque groupe. Le test a été réalisé après 48h de culture, en milieu DMEM avec 1% de SVF et 1% de PS, dans un incubateur à 37°C et à 5% CO2.

### Migration en cellule isolée

Après la co-culture, 20 000 cellules PC3 par échantillon ont été ensemencées en plaque 12 puits, pour 6 échantillons de chaque groupe. Les cellules ont été placées en chambre thermostatée à 37°C avec 5% de CO2 et leur migration, cellule par cellule, a été suivie pendant 40 heures, au cours desquelles, 2 photos étaient prises par puits toutes les 15 minutes, à l'aide du microscope Nikon Eclipse et du logiciel NIS-Elements version 4 .51.01.

Les photographies ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji ImageJ2, afin de suivre 12 cellules PC3 pour chaque champ, soit un total de 24 cellules PC3 par échantillon. Ont été sélectionné pour ce suivi des cellules qui ne se sont pas divisées au cours des 40h, qui ne sont pas sorties du champ et qui étaient encore viables à la fin du suivi.

Nous avons analysé d'une part la **distance euclidienne maximale** parcourue par la cellule (ce qui correspond à la distance « à vol d'oiseau ») par rapport au point de départ de la cellule. La distance euclidienne entre deux points (A et B) se calculant à l'aide de la formule :

$$\text{Distance euclidienne entre A et B} = \sqrt{((x_B - x_A)^2 + (y_B - y_A)^2)}.$$

D'autre part nous avons analysé la **distance cumulée totale** parcourue par la cellule en additionnant l'ensemble des distances parcourues toutes les 15 minutes (intervalle de temps entre deux prises de photographies).

Pour donner un exemple, la figure 16 présente l'ensemble des parcours réalisés par les 24 cellules qui ont été suivies pour un échantillon. L'ensemble des suivis a été centré, en ramenant le point de départ de chaque cellule à la position (x ; y) = (0 ; 0).

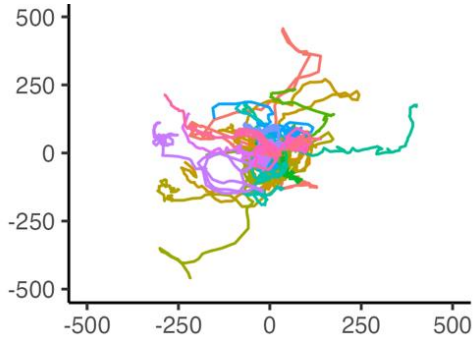
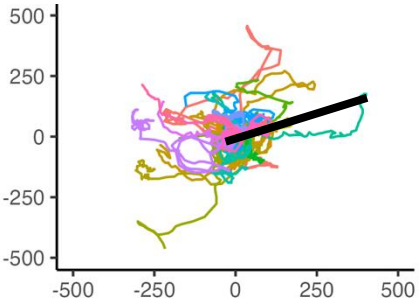



Figure 16 : Représentation de l'ensemble des chemins parcourus, centrés, pour un échantillon. *Chaque couleur représente le suivi d'une cellule.*

Puis nous avons calculé la distance euclidienne maximale sur l'échantillon et la distance cumulée parcourue par chaque cellule. Ces mesures sont représentées figure 17.

A




B

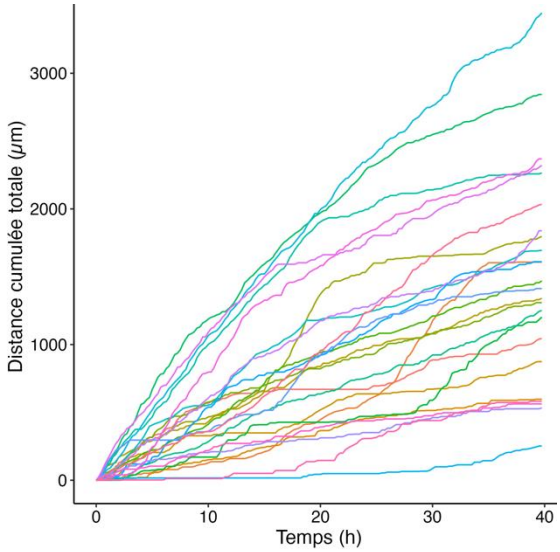



Figure 17 : Représentation de la distance euclidienne maximale (A) et des distances cumulées totales (B) pour l'échantillon présenté figure 16.

*A : La distance euclidienne maximale de l'échantillon est représentée en trait noir épais.*

*B : La distance cumulée totale est représentée pour chacune des 24 cellules suivies pour l'échantillon.*

**Marquage fluorescent des lipides, du cytosquelette et des noyaux des cellules PC3**

Après la co-culture avec les TA, 10 000 cellules PC3 par échantillon ont été disposées dans des chambres de culture individuelles (Labtek, Nunc), pour 8 échantillons par groupe. Le lendemain elles ont été lavées au PBS 1X avant d'être fixées au formol 4% (20 minutes, à température ambiante). Les membranes cellulaires ont été perméabilisées à l'aide d'une solution de PBS 1X Triton X100 0,5% (T8787, Sigma) pendant 10 minutes. Après deux rinçages en PBS 1X, une solution de PBS 1X avec SVF 10%, BSA 0,5% (A7096, Sigma), Triton X100 0,05% et Sodium Azide 0,1% a été appliquée afin de saturer les sites non-spécifiques de liaison des anticorps (90 minutes, à température ambiante).

L'actine, les lipides et les noyaux ont ensuite été marqués par l'ajout successivement d'une solution de PBS 1X contenant de la phalloïdine « DyLight 488 » (#21833, Thermoscientific, à la dilution de 1/400, pendant 90 minutes à température ambiante), puis de l'Oil Red O 0,3% (pendant 30 minutes, à température ambiante), et enfin du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, Merk, à la dilution 1/1000, pendant 5 minutes, à température ambiante).
La chambre de culture a ensuite été retirée et du milieu de montage (LifeTechnologie) ajouté sur la lame afin de préserver la fluorescence avant de recouvrir d'une lamelle fine. Les structures cellulaires ont ensuite été visualisées par fluorescence à l'aide d'un microscope confocal (Leica SP8). La taille et le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule ont été déterminés à l'aide du logiciel Fiji d'ImageJ2 (version 2.14.0/1.54f).

**Mesure des variations de l'influx calcique induit par la vidange des réserves calciques du reticulum endoplasmique (RE) (encore appelé influx SOCE pour « Store Operated Calcium Entry »)**

Les variations de concentration intracellulaire de calcium sont mesurées à l'aide d'une sonde ratiométrique fluorescente, le FURA-10-AM (acétoxyméthylester) (Molecular Probes). Le groupement AM la rend perméable à la membrane cellulaire et l'empêche de fixer le calcium. Une fois que la sonde a rejoint le cytosol, le groupement AM est clivé par des estérases non spécifiques, ce qui induit la fluorescence et la rétention du fluorophore à l'intérieur de la cellule. La liaison du calcium avec la sonde fluorescente entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. Le FURA-10 présente deux longueurs d'onde d'excitation à 354 nm et à 415 nm et une longueur d'onde d'émission à 524 nm. L'excitation à 354 nm (F354) correspond à la forme de la sonde liée au calcium, celle à 415 nm (F415) correspond à la forme libre de la sonde n'ayant pas fixé de calcium. Le passage d'une condition sans calcium dans le milieu extracellulaire à une condition avec calcium se traduit par une augmentation de la fluorescence à 354 nm et une diminution de la fluorescence à 415 nm. Le rapport des fluorescences F354 / F415 mesuré est le reflet de la concentration en calcium cytosolique.

Pour la mesure de l'entrée SOCE, au décours de la co-culture avec le TA murin, 10 000 cellules PC3 par échantillon ont été ensemencée dans des plaques 96 puits à parois noires, en quadruplicat. Le lendemain, les cellules ont été incubées pendant une heure dans une solution de RPMI contenant 4,5 µM de Fura-10-AM afin de permettre l'internalisation de la sonde ratiométrique et son clivage par les estérases. Chaque puits a ensuite été rincé deux fois dans une solution physiologique saline dépourvues de calcium (NaCl 145 mM, Kcl 4 mM, MgCl2 1 mM, HEPES 10 mM, D-Glucose 10 mM, EGTA 0,1 mM). La mesure de l'entrée SOCE a ensuite été réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre (FlexStation 3, Molecular Devices). La fluorescence émise à 525 nm suite à une excitation à 354 ou 415 nm a été mesurée toutes les 4 secondes pendant 800 secondes. Après un premier temps de stabilisation de 100 secondes, la vidange des réserves calciques du RE est réalisée par l'application extracellulaire d'une solution physiologique dépourvue de calcium contenant de la thapsigargine (Tg) à 2 µM (Life Technologies). La Tg est un inhibiteur des pompes SERCA présentes à la surface du RE et empêche ainsi le repompage du calcium dans le RE et donc l'augmentation de sa concentration dans le cytosol. Lorsque la concentration calcique cytosolique revient à son état

basal (à 600 secondes), une solution physiologique contenant du calcium (2 mM) est ensuite appliquée, permettant l'influx de calcium par les canaux calciques. Les analyses de l'amplitude maximale de la fluorescence mesurée après les injections respectives de Tg puis de calcium ont été obtenues à l'aide du logiciel RStudio version 2023.03.1+446 pour R version 4.3.0.

### Extraction d'ARN des PC3

L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du Kit NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH &Co, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur.
La quantité d'ARN a ensuite été déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm, en utilisant la loi de Beer-Lambert. De plus, la mesure des rapports des longueurs d'onde 260/230 et 260/280 a permis de s'assurer de la qualité des ARNs extraits.

### Séquençage ARN (RNA-seq) des tumeurs obtenues après xénogreffes de TRAMP-C2

Un RNA-seq a été réalisé à partir des ARN totaux extraits de 3 xénogreffes de chaque groupe par la Plateforme GENOM'IC de l'Institut Cochin (Paris). Afin d'être le plus représentatif possible du groupe, des échantillons tumoraux de taille proche de la médiane de chaque groupe ont été sélectionnés. Pour le régime contrôle, les échantillons sélectionnés mesuraient 498, 449 et 644 $mm^3$ (soit une moyenne de 530 $mm^3$). Pour le régime supplémenté en EPA, ils mesuraient 234, 128 et 199 $mm^3$ (soit une moyenne à 187 $mm^3$). Brièvement, la qualité des ARN a été contrôlée par BioAnalyser Nano avant séquençage par NextSeq Illumina.

Les données de séquençage obtenues ont ensuite été alignées sur le génome (Ensembl release 101) avant d'être filtrées et normalisées à l'aide du package DESeq2. L'exploration des données normalisées a ensuite été réalisée d'une part à l'aide du logiciel Cytoscape version 3.8.0 afin de rechercher les modifications d'expression d'ARNm les plus importantes entre les deux groupes sur différentes voies de signalisation cellulaire (le cycle cellulaire, l'apoptose, la TEM), d'autre part à l'aide de RStudio, afin de rechercher les gènes dont l'expression était la plus fortement modifiée.

### RT-qPCR

La reverse transcription (RT) permet d'obtenir des ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN précédemment extraits.
Nous avons utilisé le kit PrimeScriptTM RT Reagent (Perfect Real Time) (TAKARA, RR037A) contenant les oligonucléotides, le tampon adéquat pour l'activité enzymatique et la reverse transcriptase, en suivant les instructions du fournisseur. La réaction s'effectue en thermocycleur (SensoQuest, Labcycler) à 37°C pendant 15 minutes pour la synthèse des brins d'ADNc par la reverse transcriptase, puis à 85°C pendant 5 secondes pour inactiver l'enzyme.

A partir de l'ADNc obtenu nous avons ensuite réalisé des qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), qui consiste à suivre cycle après cycle la réaction d'amplification d'un gène d'intérêt au moyen d'un agent intercalant de l'ADN double brin. Nous avons utilisé ici, le

Platinum SYBRGreen® (TAKARA, RR420A), qui émet un signal de fluorescence après excitation par des rayonnements ultraviolets.
Pour permettre cette amplification, nous avons donc réalisé un mix « SYBRGreen I » contenant la Taq polymérase, les dNTPs, du MgCl2 et l'agent intercalant SYBR Green, auquel nous avons ajouté notre ADNc et les amorces nucléotidiques spécifiques du gène d'intérêt dont nous souhaitions quantifier l'expression.

La qPCR se déroule en 40 cycles, avec une phase de dénaturation de l'ADNc à 95°C pendant 30 secondes, puis une phase d'hybridation des amorces à 60°C pendant 1 minute et une phase d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 72°C pendant 30 secondes. Ceci est réalisé à l'aide de l'appareil CFX ConnectTM de chez BIORAD.
L'évolution de la fluorescence est suivie à chaque cycle de PCR. L'intersection de la courbe de fluorescence avec le seuil (Threshold), placé dans la partie exponentielle de la courbe, permet de déterminer un cycle seuil (appelé Ct pour « Cycle de Threshold ») pour le gène d'intérêt testé. Ce Ct fourni donc une estimation indirecte du nombre de copie de ce gène initialement présent dans l'échantillon. Si le gène est peu exprimé, le Ct sera plus grand.
La vérification de la spécificité des amorces, est réalisée après l'amplification grâce à la courbe de fusion, sur laquelle on observe la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. La fluorescence diminue rapidement lors de la séparation des brins d'ADN qui survient avec l'augmentation progressive de la température. Ainsi l'amplicon généré sera visualisé par la présence d'une courbe en cloche dont la fluorescence maximale correspond à la température de fusion des amorces. Les produits non spécifiques seront représentés par des pics généralement plus larges avec une température de fusion différente.
Nous avons utilisé une méthode de quantification relative, qui consiste à normaliser le Ct d'un gène d'intérêt par le Ct d'un gène de référence, aussi appelé gène de ménage. La quantification se fait alors à l'aide des formules suivantes :

$$\Delta Ct = Ct \text{ du gène cible} - Ct \text{ du gène de référence}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (condition expérimentale)} - \Delta Ct \text{ (condition contrôle)}$$

Le facteur de changement (« fold change ») dans l'expression du gène cible en condition expérimentale par rapport à celle du gène cible en condition contrôle est exprimé en : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Les amorces nucléotidiques utilisées pour les gènes de ménage (humain et murin) et pour quantifier les transcrits des gènes d'intérêt proviennent de chez Sigma-Aldrich et sont répertoriées dans le tableau 10.
Pour les cellules PC3 :
- CAIX, l'anhydrase carbonique IX a été étudiée comme marqueur d'hypoxie
- Zeb1 comme marqueur de la TEM
- Orai1 et Orai3 ont également été étudiés, car les protéines Orais forment des canaux calciques qui peuvent être responsables de l'entrée SOCE, et parmi les trois isoformes connus, Orai1 et Orai3 ont déjà été observées dans la biologie du CaP (229,230).

Dans le tableau figure aussi les séquences des amorces murines qui ont été utilisées pour l'étude des gènes cible : CAIX, Zeb1, MMP-3, Smad3 et TNFα, sur les tumeurs issues des xénogreffes de TRAMP-C2.

Tableau 10 : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces pour les gènes analysés en qPCR

| Gène | Séquence des amorces | |
|---|---|---|
| hu-ALAS1 gène de ménage | Sens | AGA TCT GAC CCC TCA GTC CC |
| | Anti-sens | TCC ACG AAG GTG ATT GCT CC |
| hu-HPRT1 gène de ménage | Sens | TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA |
| | Anti-sens | GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT |
| hu-CAIX | Sens | CCT CAA GAA CCC CAG AAT AAT GC |
| | Anti-sens | CCT CCA TAG CGC CAA TGA CT |
| hu-Zeb1 | Sens | TGC ACT GAG TGT GGA AAA GC |
| | Anti-sens | TGG TGA TGC TGA AAG AGA CG |
| hu-Orai1 | Sens | AGG TGA TGA GCC TCA ACG AG |
| | Anti-sens | CTG ATC ATG AGC GCA AAC AG |
| hu-Orai3 | Sens | CCA CGT ACC GGG AGT TCG |
| | Anti-sens | ACT CGT GGT CAC TCT CCA GC |
| mu-RPL4 gène de ménage | Sens | CGC AAC ATC CCT GGT ATT ACT |
| | Anti-sens | TGT GCA TGG GCA GGT TAT AGT |
| mu-RPL19 gène de ménage | Sens | CAC AAG CTC TTT CCT TTC GC |
| | Anti-sens | TCA TTG GTC TCA TTG GGA TCC A |
| mu-HPRT gène de ménage | Sens | AGG ACC TCT CGA AGT GTT GG |
| | Anti-sens | TTG CAG ATT CAA CTT GCG CT |
| mu-CAIX | Sens | CAC ACG GTA CAG CTG ACT CT |
| | Anti-sens | GTT CTG AGC CTG GGT GAT CT |
| mu-ZEB1 | Sens | GCC AGC AGT CAT GAT GAA AA |
| | Anti-sens | TAT CAC AAT ACG GGC AGG TG |
| mu-MMP-3 | Sens | TGC TCA TCC TAC CCA TTG CA |
| | Anti-sens | TTC CCT GTC ATC TCC AAC CC |
| mu-SMAD3 | Sens | CAG CCA CCA TGA ATT ACG GG |
| | Anti-sens | ACA CTG GAG GTA GAA CTG GC |
| mu-TNFα | Sens | GGT GCC TAT GTC TCA GCC TCT T |
| | Anti-sens | GCC ATA GAA CTG ATG AGA GGG AG |

*Abréviations : hu- = humain, mu- = murin*

### Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel SPSS version 25 d'IBM, ou sous R version 4.3.0 à l'aide de RStudio version 2023.03.1+446.

Pour la comparaison de deux groupes avec des variables continues, le test U de Mann-Whitney était utilisé. Un test était considéré statistiquement significatif au seuil $p < 0,05$.

**Un apport nutritionnel en EPA diminue la croissance tumorale**

La croissance des xénogreffes de TRAMP-C2 est significativement diminuée par la supplémentation nutritionnelle en EPA (figure 18). A noter qu'au sein du groupe supplémenté en EPA, une tumeur a arrêté d'augmenter en taille à partir de J20, puis elle a totalement régressé et n'a plus été mesurable à partir de J54.

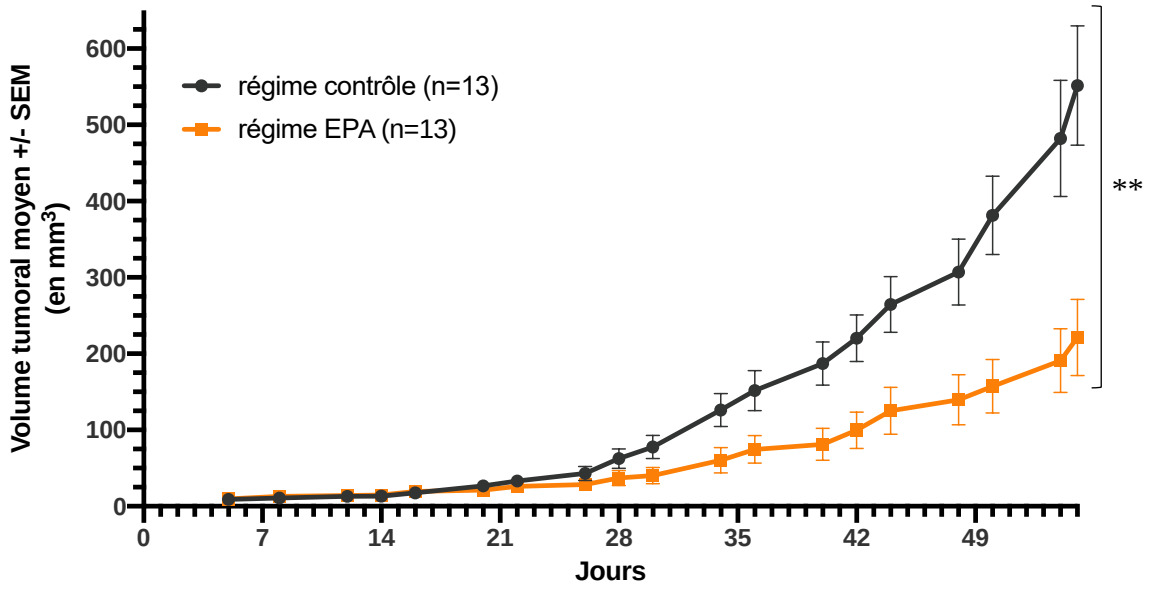



Figure 18 : Courbe des croissances tumorales des xénogreffes de TRAMP-C2.
*La taille des tumeurs est significativement différente à la fin de l'expérimentation (soit à J55).*
*Abréviations : SEM : erreur standard de la moyenne.* ** : p <0,01*

Tout au long de l'expérimentation, les souris ont consommé en moyenne 5,8 (+/- 0,3) g/j de nourriture dans le groupe contrôle et 5,6 (+/- 0,2) g/j de nourriture dans le groupe supplémenté en EPA.
La prise de poids des souris a été linéaire au cours du temps, similaire dans les deux groupes avec un poids moyen au sacrifice de 28,7 g dans le groupe contrôle (prise de poids de 12%) et 28,8 g dans le groupe supplémenté en EPA (prise de poids de 17%).
On observe que le délai d'apparition des tumeurs était similaire dans les deux groupes.

**Un apport nutritionnel en EPA modifie la composition lipidique du TA péri-épididymaire qui s'enrichit en EPA et s'appauvrit en EDA**

L'analyse de la composition en AG du TA des souris montre une différence significative du contenu en AG entre le groupe ayant reçu le régime contrôle par rapport au groupe supplémenté en EPA, avec notamment une augmentation d'un facteur 4 du contenu en AGPI omégas 3, voir tableau 11.

Tableau 11 : Résumé du contenu en AG des TA péri-épididymaires murins, en fonction de leur régime alimentaire

| | **Régime contrôle**, n=13 | **Régime EPA**, n=8 | p |
|---|---|---|---|
| **AG en mole%**, médiane (min-max) | | | |
| **AG saturés** | **23,02 (21,25-26,17)** | **28,53 (26,10-30,76)** | *** |
| dont 16:0 (acide palmitique) | 20,27 (18,69-23,02) | 25,10 (23,03-27,01) | *** |
| 18:0 (acide stéarique) | 1,27 (1,17-1,52) | 1,64 (1,46-1,78) | *** |
| **AG mono-insaturés** | **61,06 (57,50-62,57)** | **55,31 (53,59-56,79)** | *** |
| dont 16:1 (acide palmitoléique) | 9,87 (7,51-14,42) | 9,59 (8,55-10,22) | NS |
| 18:1 (acide oléique) | 49,56 (41,71-51,24) | 44,35 (42,79-46,15) | *** |
| **AG poly-insaturés** | | | |
| **Omégas 6** | **13,96 (12,33-17,51)** | **11,62 (9,31-14,20)** | * |
| dont 18:2n-6 (acide linoléique) | 13,34 (11,74-17,00) | 11,13 (8,91-13,73) | * |
| 20:2n-6 (EDA) | 0,18 (0,12-0,24) | 0,10 (0,09-0,12) | *** |
| 20:4n-6 (acide arachidonique) | 0,16 (0,14-0,22) | 0,17 (0,15-0,20) | NS |
| **Omégas 3** | **0,64 (0,55-0,84)** | **2,69 (2,18-3,09)** | *** |
| dont 18:3n-3 (acide α-linolénique) | 0,53 (0,44-0,76) | 0,62 (0,49-0,73) | * |
| 20:5n-3 (EPA) | 0,01 (0,01-0,02) | 0,97 (0,65-1,12) | *** |
| 22:5n-3 (acide docosapentaénoïque) | 0,02 (0,01-0,03) | 0,48 (0,41-0,56) | *** |
| 22:6n-3 (DHA) | 0,06 (0,05-0,08) | 0,62 (0,50-0,76) | *** |
| **Rapport omégas 6/omégas 3**, médiane (min-max) | 22,12 (18,54-26,26) | 4,38 (3,39-6,10) | *** |

*Abréviations : AG : acides gras, EDA : acide écosadiénoïque ; EPA : acide écosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque.*

** : p < 0,05 ;  ** : p <0,01 ; *** : p <0,001 ; NS : pas de différence significative*

Le contenu en omégas 3 est très nettement modifié par l'incorporation importante en EPA (de près d'un facteur 100) dans le TA du groupe nutritionnel EPA, comme illustré par la figure 19. On constate par ailleurs que cela entraîne une nette augmentation des acides gras omégas 3 en aval de l'EPA : l'acide docosapentaénoïque (22:5n-3) par un facteur 24, et l'acide docosahéxaénoïque (22:6n-3) d'un facteur 10, même si l'incorporation se fait dans une moindre mesure comparativement à l'EPA.

De façon inverse, le contenu en omégas 6 s'appauvrit, avec une légère diminution de l'acide linoléique (18:2n-6). A noter que l'EDA est également impacté avec une diminution quasiment de moitié (figure 19).

Ces modifications aboutissent à un TA ayant un rapport omégas6/omégas3 cinq fois plus bas pour le régime EPA en comparaison au régime contrôle.

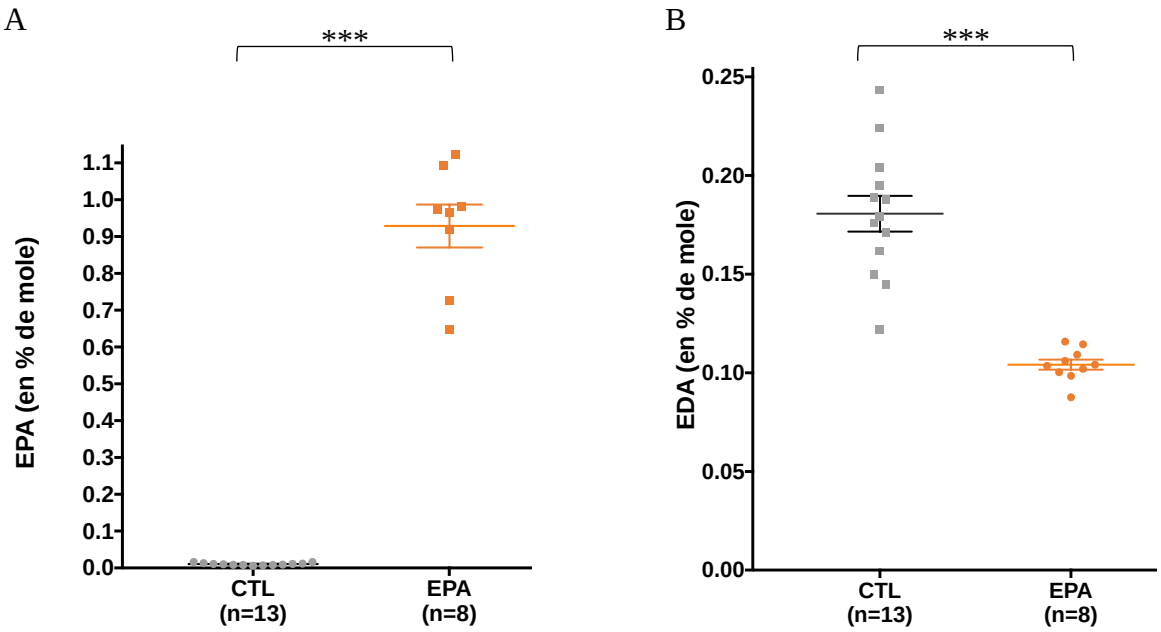



Figure 19 : Contenu en EPA (A) et en EDA (B) des TA péri-épididymaires murins, en fonction de leur régime alimentaire.

*Les points représentent les valeurs individuelles, les traits horizontaux représentent la moyenne +/- SEM.* *** : $p < 0,001$*

**La co-culture avec le TA enrichi en EPA diminue la prolifération des cellules PC3**

Au décours de la co-culture des PC3 avec le TA murin, nous avons réalisé des tests fonctionnels afin de rechercher un effet de la composition du TA sur le comportement des cellules cancéreuses. Dans un premier temps, nous avons étudié les capacités de prolifération au moyen d'un test MTT et observé une diminution de 44% en moyenne de la prolifération des PC3 co-cultivées avec du TA enrichi en EPA (figure 20A). En parallèle, nous avons également étudié la migration en cellule isolée au time lapse pendant 40 h au décours de la co-culture avec du TA enrichi ou non en EPA. Nous n'avons noté aucune différence de migration des cellules entre les deux groupes, que ce soit en distance euclidienne maximale ou en distance cumulée totale parcourue par rapport au point de départ (figure 20B).

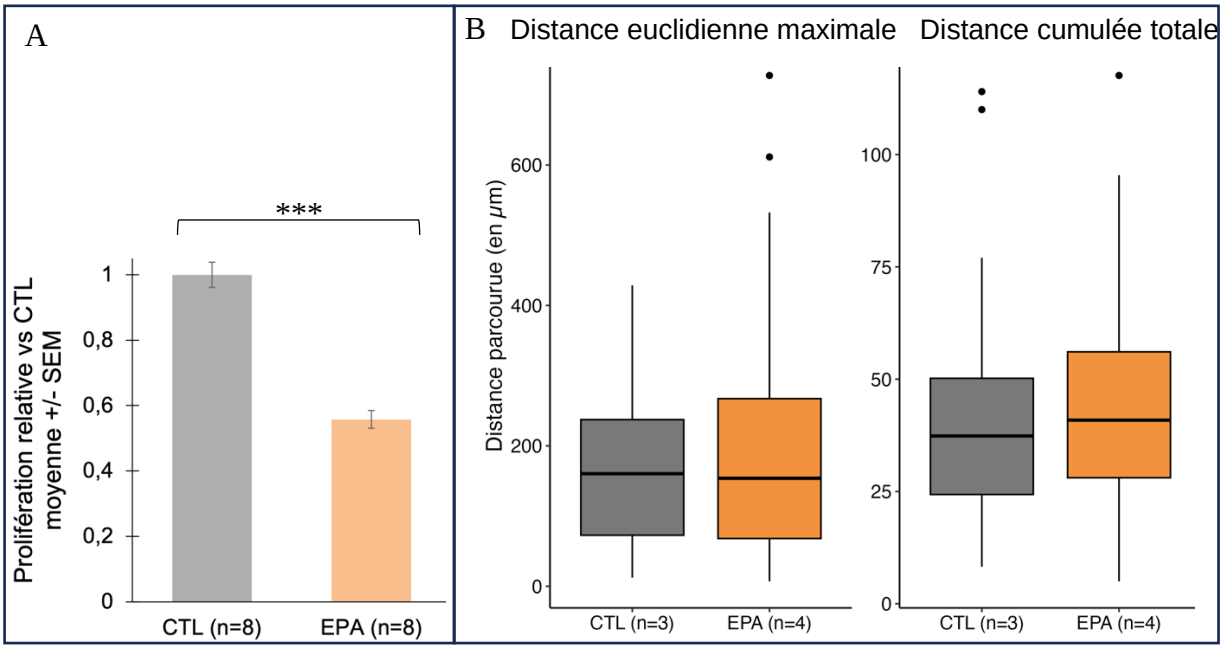



Figure 20 : Le TA enrichi en EPA diminue la prolifération des PC3 sans affecter leur capacité de migration.

*A : Résultat du test MTT réalisé sur les PC3 48h après avoir été préalablement en co-culture avec du TA enrichi ou non en EPA. Les mesures de densité optique ont été normalisées par rapport au groupe « régime contrôle » et sont représentées en moyenne +/- SEM.*

*B : Résultat du test de migration en cellule isolée. Représentation en boîte à moustache de la médiane, des interquartiles et des valeurs minimales et maximales, de chaque groupe.*

**** p < 0,001.*

### La co-culture avec le TA enrichi en EPA modifie le contenu en gouttelettes lipidiques des cellules PC3

Au décours des 3,5 jours de co-culture des PC3 avec un prélèvement de TA murin, nous avons réalisé une coloration des cellules PC3 pour marquer les gouttelettes lipidiques (en rouge), les noyaux (en bleu) et l'actine (en vert). Une image représentative de chaque groupe est présentée figure 21.

A CTL B EPA

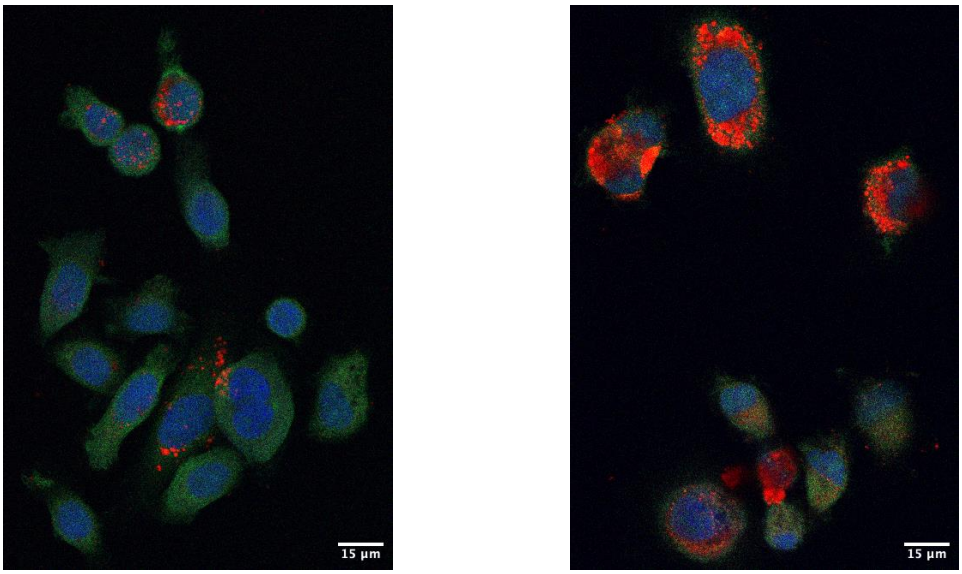



Figure 21 : Images de microscopie confocale de cellules PC3 après co-culture avec TA murin, de souris recevant un régime contrôle (A) ou un régime enrichi en EPA (B).
*Grossissement x40. Phalloïdine en vert, DAPI en bleu, Oil Red O en rouge.*

Nous avons observé une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques lorsque les PC3 sont co-cultivées avec le TA enrichi en EPA par rapport à celles qui ont été co-cultivées avec le TA contrôle. Ainsi, la taille médiane des gouttelettes lipidiques passe de 0,51 $\mu m^2$ à 1,08 $\mu m^2$ ($p<0,05$) (figure 22A), soit une augmentation de 112%. De même, le nombre de gouttelettes lipidiques médian par cellule a tendance à augmenter pour les PC3 co-cultivées avec du TA enrichi en EPA sans que ce soit statistiquement significativement différent (25 gouttelettes contre 10 dans la condition contrôle, $p = 0,25$) (figure 22B).

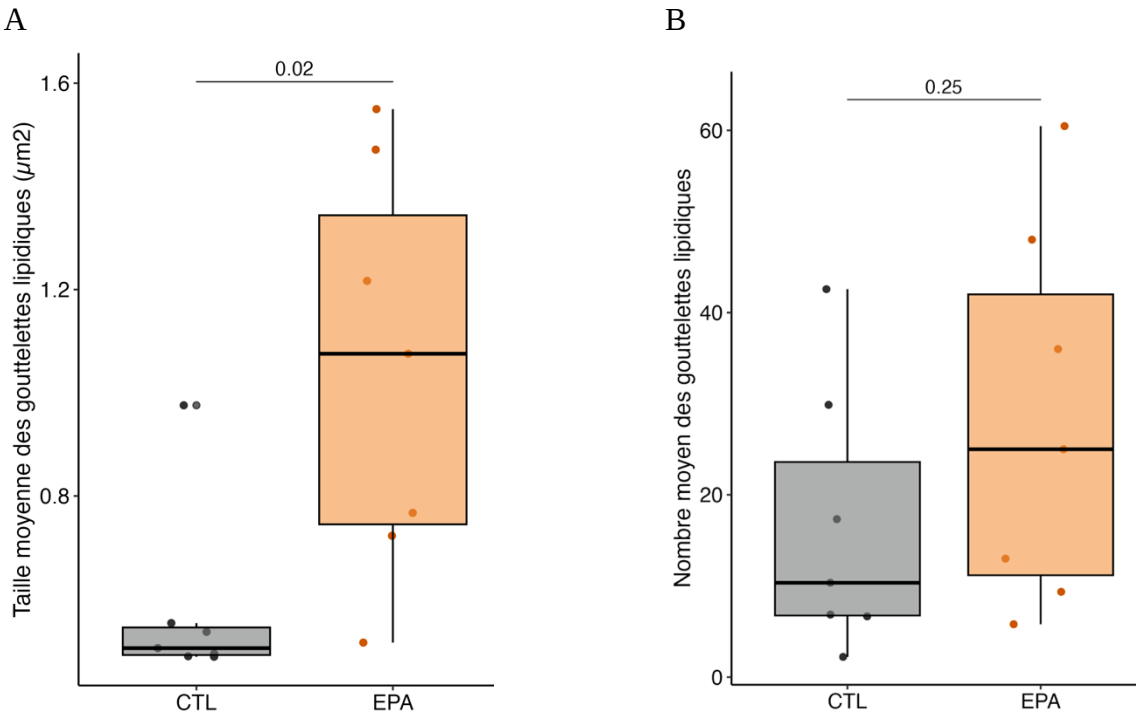



Figure 22 : Taille (A) et quantité (B) de gouttelettes lipidiques dans les PC3 après co-culture avec le TA murin contrôle ou supplémenté en EPA.

*Représentation en boîte à moustache de la médiane, des interquartiles et des valeurs minimales et maximales, de chaque groupe, n= 7 par groupe. Chaque point représente la valeur moyenne après analyses de l'ensemble des cellules PC3 visibles sur un champ d'observation (5 à 23 cellules analysées selon les échantillons).*

### La co-culture avec le TA enrichi en EPA diminue l'entrée calcique SOCE des cellules PC3

Nous nous sommes intéressés aux conséquences de la supplémentation en EPA sur les entrées calciques des cellules PC3 après co-culture avec les TA. Nous avons étudié l'entrée calcique SOCE. Nous observons une diminution statistiquement significative de l'entrée SOCE pour le groupe EPA ($p < 0,05$) (figure 23). Cette diminution du SOCE dans les cellules PC3 semble indépendante de l'expression des canaux calciques Orai, puisque l'expression des transcrits Orai1 et Orai3 n'est pas modifiée par l'enrichissement en EPA du TA en co-culture (en condition normoxie) (résultats non montrés).

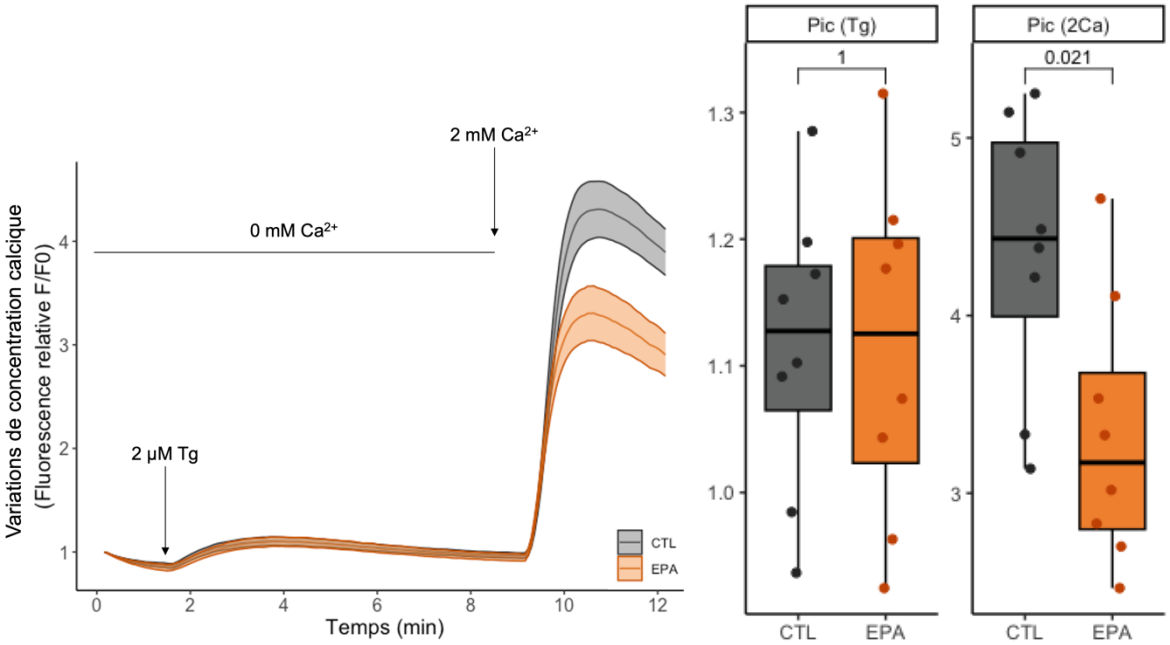



Figure 23 : Diminution de l'entrée calcique SOCE pour les cellules PC3 après co-culture avec le TA enrichi en EPA.

*A gauche : Concentration en calcium au cours de l'expérimentation.*

*A droite : Représentation en boîte à moustache de la médiane, des interquartiles et des valeurs minimales et maximales, de chaque groupe, pour la valeur maximale après l'injection de Tg et la valeur maximale après l'ajout de Calcium en extra-cellulaire, n= 8 par groupe.*

**Exploration des acteurs moléculaires régulés par l'EPA sous hypoxie**

La co-culture avec le TA enrichi en EPA en condition normoxie ne modifie pas l'expression des ARNm codant la CAIX et de Zeb1 (résultats non montrés). En revanche, sous hypoxie, l'expression de Zeb1 dans les cellules PC3 est diminuée après co-culture avec le TA enrichi en EPA comparé aux co-cultures avec le TA contrôle (p=0,001). On constate également une diminution importante de l'induction de CAIX (p=0,002). Les résultats sont représentés en figure 24.

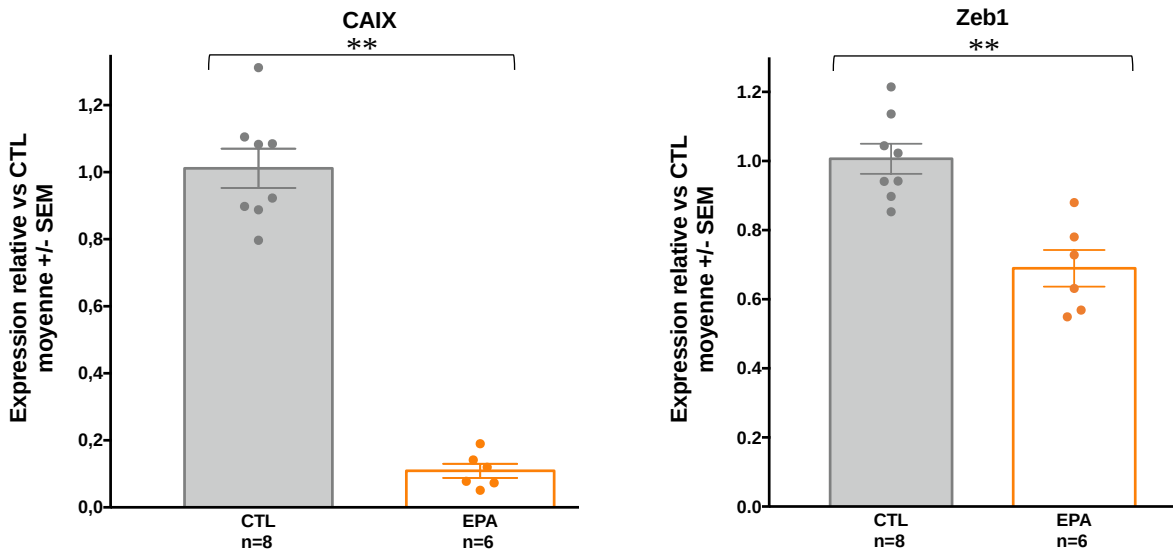



Figure 24 : Effet des TA enrichis en EPA, en condition d'hypoxie, sur l'expression de CAIX, Zeb1 et MMP3, dans les cellules PC3.

*Abréviations : CAIX : anhydrase carbonique IX ; CTL : cellules PC3 après co-culture avec le TA provenant des souris xénogreffées alimentées par un régime contrôle ; EPA : cellules PC3 après co-culture avec le TA provenant des souris xénogreffées supplémentées en EPA.* *** : p<0,01*

**Un apport nutritionnel en EPA diminue l'expression de Zeb1 au sein des tumeurs murines issues des xénogreffes**

Nous avons analysé les données de RNA-seq des 3 tumeurs de chaque groupe nutritionnel en fonction de la différence d'expression entre les deux groupes (voir annexe 1). Les gènes les plus fortement diminués par le régime EPA sont ceux codant pour la Kallikréine 7 (Klk7, une protéase à sérine), pour les kératines Krt6a, Krt5 et Krt1, ainsi que la Calmoduline 4 (Calm4). Les gènes les plus fortement augmentés par le régime EPA codent tous pour des immunoglobulines principalement de type kappa (voir annexe 1). A noter que la différence d'expression entre les deux groupes nutritionnels n'est significative que pour un faible nombre de gènes suggérant une certaine hétérogénéité dans le profil transcriptomique des tumeurs obtenues et/ou que le nombre d'échantillons analysés n'est pas suffisant et mériterait d'être augmenté.

Nous avons également réalisé différentes analyses de voies de signalisation cellulaire à l'aide de Cytoscape qui sont présentées en annexe 2. Pour la TEM, nous avons pu mettre en évidence que : non seulement l'expression moyenne de Zeb1 était diminuée par le régime EPA mais aussi celles de MMP-3 et de Smad3 (figure 25A). Pour l'apoptose, TNFα semble être le gène le plus fortement modulé par la supplémentation en EPA (log2(fold change) = 0,92), entrainant une augmentation de son expression (figure 25B).

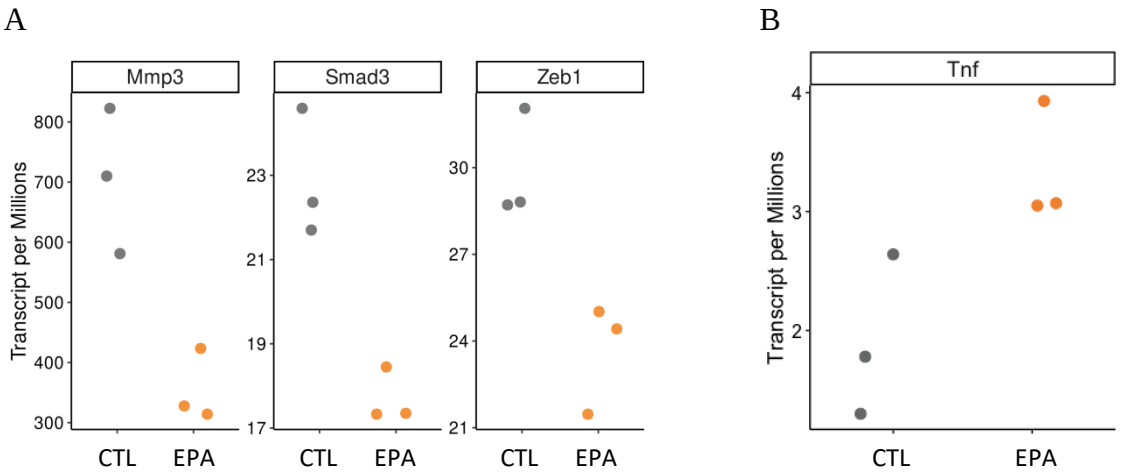



Figure 25 : Quantité de transcrits pour les 3 gènes d'intérêt de la TEM (A) identifiés *via* Cytoscape : MMP-3, Smad3, Zeb1. Même chose pour le gène TNFα (B) qui a été identifié dans l'apoptose et l'angiogenèse.

*Abréviations : CTL = groupe régime contrôle, EPA = groupe supplémenté en EPA.*

Ces 4 gènes candidats ont ensuite été analysés en RT-qPCR sur l'ensemble des ARNs extraits des xénogreffes (soit 11 contrôles et 9 EPA). Seule l'expression de Zeb1 était significativement diminuée par la supplémentation en EPA (p=0,03) (figure 26). Les expressions des autres ARNm cibles n'étaient pas significativement modifiées. A noter tout de même que l'expression de MMP-3 a tendance à être diminuée avec la supplémentation en EPA, sans que ce soit statistiquement significatif (p=0,08).

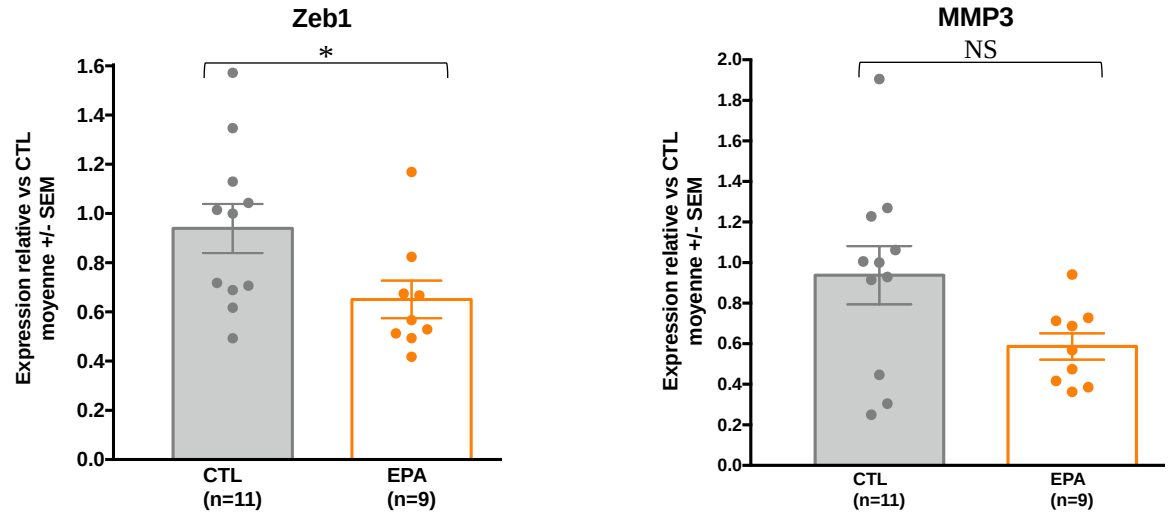



Figure 26 : Expression de Zeb1 et MMP3 dans les xénogreffes.

*Abréviations : CTL : groupe contrôle, EPA : groupe EPA.  NS : non significatif.  * : p < 0,05*

De plus, devant la forte réduction de l'expression de CAIX après co-culture, nous avons également analysé CAIX dans ces échantillons, sans observer de modification de son expression dans le groupe EPA (résultat non montré).

## Discussion

Durant ce travail de thèse, nous avons voulu explorer l'hétérogénéité du CaP pour mieux comprendre les mécanismes qui participent à réguler son agressivité d'une part à un stade déjà évolué (métastatique résistant à la castration), puis à un stade beaucoup plus précoce en poursuivant les travaux antérieurs de l'équipe sur les interactions du CaP avec le TAPP.

Dans un premier temps, nous avons donc étudié une cohorte de 30 échantillons tumoraux de CPNE, dont 14 étaient des formes *de novo* et 16 des formes induites par la pression thérapeutique. Ce travail a montré que **TTF1 était un facteur pronostic**, car corrélé à la survie globale, **pour les CPNE**. Il était moins exprimé que les marqueurs classiques du CPNE mais tout de même présent dans la moitié des cas. De plus, il était associé à différents marqueurs biologiques d'agressivité du CaP (prolifération, TEM, perte d'expression des gènes régulés par le RA, perte de PTEN).

**Notre objectif initial dans ce travail était de mieux caractériser la biologie des CPNE *de novo* et de ceux apparaissant sous la pression thérapeutique, afin de les différencier**. En effet, les deux types de CPNE pourraient avoir une origine différente, les formes *de novo* pouvant provenir d'une transformation maligne des cellules neuroendocrines physiologiquement présentes au sein de la glande prostatique, alors que les formes apparaissant au décours du traitement d'adénocarcinomes classiques se développeraient plutôt du fait d'un mécanisme de résistance au traitement par transdifférenciation des cellules cancéreuses prostatiques (231). On pourrait donc supposer que leur sensibilité aux traitements puisse être différentes et que chaque forme puisse bénéficier d'un traitement plus personnalisé.

Notre étude ne nous a finalement pas permis d'identifier de différence significative d'expression parmi les différents marqueurs biologiques étudiés. Nous avons plutôt constaté des différences entre les formes pures et les formes mixtes de CPNE (par exemple NKX3.1 était moins exprimé dans les formes pures, ce qui montre bien que la transdifférenciation est plus aboutie dans les formes pures, puisqu'elles ont perdu la signalisation du RA). Conteduca *et al*. non plus n'étaient pas parvenus à identifier de différence génomique entre ces deux formes de CPNE, après s'être intéressés aux altérations moléculaires de différentes cibles classiquement altérées dans le CaP (*RA, RB1, TP53*, gènes de réparation de l'ADN, gènes régulés par le RA) sur une cohorte de 87 patients (60). Une méta analyse très récente, reprenant les données de 14 publications différentes, s'est aussi attelée à cette question à l'aide d'une cohorte beaucoup plus conséquente de 449 patients (232). Ceci lui a permis d'observer que les formes *de novo* avaient une prévalence plus élevée d'altérations concomitantes de *RB1* et *TP53* par rapport aux formes post-traitement. Les auteurs en concluent que les tumeurs présentant cette double association de mutations « driver » vont plus aisément développer des formes neuroendocrines avant même l'ajout de la pression thérapeutique.

En fait, les formes *de novo* étant beaucoup plus rares que les formes induites par la pression thérapeutique, la majorité des études publiées sur le sujet se sont focalisées sur les formes post-traitement afin de comprendre les mécanismes de transdifférenciation de l'adénocarcinome vers la forme neuroendocrine. Il a été établi que ce sous-type de CPNE pouvait être caractérisé par son profil de méthylation, notamment plusieurs travaux ont

observé une surexpression d'EZH2 et l'importance de son action, faisant de lui un acteur majeur dans la biologie des CPNE induits par les traitements (127,146,147,233). Cela ouvre d'ailleurs de nouvelles pistes thérapeutiques avec entre autres un espoir d'efficacité des inhibiteurs d'EZH2 dans cette entité. Il reste à déterminer si on observerait les mêmes modifications épigénétiques dans les CPNE *de novo*, de telles données n'étant à ma connaissance pas publiées à ce jour.
Un autre résultat intéressant de ce travail était l'observation que le RA restait exprimé dans la moitié de notre cohorte de CPNE, ce qui laisse donc penser qu'un traitement standard avec une hormonothérapie de nouvelle génération peut tout à fait rester efficace et reste une option thérapeutique à ne pas négliger dans cette maladie au pronostic sombre. Ce constat rejoint d'ailleurs ce qui a été montré par Conteduca *et al*. sur la réponse radiologique en première ligne de CPNE *de novo* : elle était plus prolongée pour les patients ayant reçu une hormonothérapie de nouvelle génération que pour les patients ayant reçu de la chimiothérapie y compris avec un sel de platine (60).

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés au CaP à un stade plus précoce, en nous concentrant sur les interactions entre les cellules cancéreuses et le TAPP.
Nous avons observé, sur une cohorte de 59 CaP pT3, que le contingent tumoral qui avait franchi la capsule prostatique, exprimaient plus les marqueurs d'agressivité (en termes de prolifération et de TEM) que le contingent étudié en intra prostatique.
Nous avons aussi étudié différentes marques épigénétiques pour rechercher si elles pourraient être associées à ces facteurs d'agressivité. Sur cette cohorte, les marques 5mC, 5hmC et H3K27ac étaient toutes diminuées en extra prostatique par rapport à leur prélèvement apparié en intra prostatique, avec une forte association de l'expression de 5mC avec celle des deux autres marques. Globalement ces différentes marques étaient fortement exprimées, leur médiane d'expression allant de 80 à 100% des cellules selon le contingent étudié. Ces résultats diffèrent du niveau d'expression de 5mhC, qui est décrit plus bas dans une autre cohorte de 30 CaP avec des caractéristiques clinico-pathologiques similaires et également issus de prostatectomies (123). Ces différences sont possiblement liées à l'utilisation de l'anticorps qui était 10 fois plus dilué dans leur étude, ce qui a pu modifier son seuil de détection. Par ailleurs, une autre étude a retrouvé des taux d'expression très élevés de 5mC et 5hmC, similaires aux nôtres, sur une cohorte de plus de 300 CaP (121). Les auteurs ont constaté également une corrélation entre les expressions des deux marques épigénétiques.
**Au vu des différences d'expression des marqueurs d'agressivité en intra et en extra-prostatique pour une même tumeur, nous avons posé l'hypothèse que cette différence était liée à l'influence du TAPP au contact duquel se trouvent les cellules qui ont franchi la capsule prostatique**. C'est pourquoi nous avons réalisé des co-cultures de lignées de CaP avec des TAPP prélevés sur des patients opérés pour un CaP. Nous avons observé que cette co-culture rendait les cellules plus agressives, par rapport à leurs caractéristiques en culture cellulaire classique « seule », si le TAPP provenait des patients ayant les cancers les plus agressifs (CaP de stade pT3 ou CaP de haut grade de l'ISUP). En revanche, en cas de co-culture avec du TAPP provenant de patients avec des cancers indolents (CaP de stade pT2 ou CaP de bas grade de l'ISUP) cela ne modifiait pas significativement l'agressivité des cellules.

Ceci suggère donc que ce sont les caractéristiques du TAPP qui influencent l'agressivité du CaP.
Une autre étude s'est intéressée comme nous à l'influence de co-culture de TAPP de patients avec des PC3 ou des LNCaP et a montré que cela entraînait davantage d'agressivité des cellules cancéreuses *via* la TEM (avec une augmentation de l'expression de Twist1 et de MMP-9) (226). Les auteurs n'ont malheureusement pas différencié l'effet des co-cultures en fonction du grade et/ou du stade des CaP des patients dont provenait le TAPP, sachant qu'ils ont étudié 7 CaP de bas grade et 3 de haut grade.
Un autre argument en faveur de l'influence de la composition du TAPP sur l'agressivité du CaP, vient des **corrélations** que nous avons pu établir **entre la prolifération des cellules cancéreuses et le contenu du TAPP en EDA ou à l'inverse avec sa teneur en EPA**.
A noter qu'auparavant, d'autres travaux au laboratoire avaient identifié une corrélation inverse entre le contenu en EPA du TAPP et l'agressivité du CaP, sur une cohorte caucasienne de 106 CaP (95). Nous avons d'ailleurs observé dans ce travail la même tendance sans que le résultat ne soit significatif sur notre cohorte beaucoup plus restreinte de 10 TAPP.
Nous avons ensuite cherché à montrer que c'était bien l'EPA et/ou l'EDA contenus dans le TAPP qui influençaient la prolifération des PC3. Et, en effet, lorsqu'on supplémente les PC3 avec 30 µM d'EPA on constate une diminution de sa prolifération (Ki67 en IHC et test MTT). En revanche nous n'avons pas observé d'effet pro-prolifératif de l'EDA.
Nous disposons de peu de données dans la littérature sur le rôle pro-tumoral de l'EDA, hormis une étude de cohorte (234). Elle a permis de comparer 146 individus ayant développé un CaP dans les 13 ans suivant l'inclusion avec 272 personnes contrôles appariées en 2 :1, et a observé que les personnes ayant développé un CaP avait un taux d'EDA détectable dans le sang significativement plus élevé que les personnes contrôles. L'EDA pourrait jouer un rôle comme modulateur de l'inflammation, selon un travail publié sur un modèle *in vitro* de macrophages, mais avec des effets antagonistes qui rendent difficile l'interprétation du rôle définitif de l'EDA dans l'inflammation (235). En effet, les auteurs ont observé une augmentation de la production de prostaglandine E2, de l'expression de la cyclooxygénase de type II et de la translocation du facteur nucléaire kappa B (NF-κB), mais qui était associée à une diminution de la production de NO et de l'activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS).
Si on s'intéresse maintenant à l'EPA, nous avons déjà abordé son effet anti-prolifératif, rapporté dans d'autres travaux *in vitro* sur des lignées de CaP dont des PC3 (100–103).
Cependant, il est probable que l'effet observé lors des co-cultures avec le TAPP résulte de la modification simultanée de différents lipides et non de l'effet isolé d'un seul AG. C'est d'ailleurs aussi ce que semble montrer notre expérimentation animale dans la partie suivante. En effet même si on cherche seulement à enrichir en EPA le régime nutritionnel des animaux, cela impacte légèrement les autres classes de lipides, dans un régime isolipidique. La composition résultante met en évidence un enrichissement important du TA en EPA au détriment d'autres lipides (comme l'acide oléique, acide α-linoléique et EDA). Il n'est ensuite pas si aisé d'attribuer l'ensemble des modifications observées sur les cellules cancéreuses exclusivement à l'enrichissement du contenu en EPA du TA.
**Lors de la supplémentation en EPA des cellules PC3, nous avons également constaté une diminution significative d'H3k27me3** (sans que cette marque épigénétique ne soit

augmentée sous EDA). Ceci concorde avec la tendance observée dans les cellules cancéreuses après co-culture avec les TAPP agressifs, où H3K27me3 était augmentée de manière non significative. Cette augmentation n'avait pas été observée dans le contingent extra prostatique par rapport au contingent intra prostatique sur la cohorte de patients, mais cela s'explique par le fait qu'H3K27me3 était très fortement exprimé dans les tumeurs humaines, contrairement au niveau d'expression dans les lignées cellulaires en condition contrôle qui est beaucoup plus faible. Cette diminution d'H3K27me3 est corrélée à l'augmentation du contenu en EPA du TAPP.
Ces résultats peuvent suggérer que l'effet de l'EPA sur les cellules cancéreuses du CaP pourrait être associé à des modifications épigénétiques comme la diminution d'H3K27me3.
Une autre étude a proposé une association similaire *via* l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2 *in vitro* (236). H3K27me3 résultant de l'action d'EZH2 sur H3K27, l'inhibition d'EZH2 va donc diminuer la formation d'H3K27me3. Or dans cette étude, il a été observé que l'inhibition d'EZH2 induisait une augmentation de différents AGPI dont l'EPA (mais aussi l'acide α-linolénique et le DHA) dans les cellules cancéreuses. D'ailleurs cette inhibition a augmenté le niveau d'expression d'ELOVL2 (une élongase participant à la synthèse des AGPI) en diminuant H3K27me3 sur ce gène, *in vitro*, sur plusieurs types de lignées cancéreuses (hors CaP), ce qui confirme bien l'effet de l'inhibition d'EZH2 sur l'expression d'H3K27me3.
Les principales limites rencontrées dans ce travail ont été la faible viabilité des adipocytes isolés du TAPP, ce qui nous a fait considérer ces « co-cultures » plus comme une mesure de l'effet du contenu des adipocytes sur les cellules cancéreuses. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous avons ensuite testé différentes méthodes de co-culture avant de retenir un autre modèle dans notre troisième partie du travail. Sur le plan épigénétique, nous n'avons mesuré qu'une expression globale des marques dans les cellules cancéreuses, il pourrait être intéressant de faire des analyses davantage ciblées pour déterminer quel gène est plus ou moins méthylé, quelles conformations d'histones (acétylées, méthylées) sont plus ou moins liées aux gènes d'intérêt déterminés.

Dans un troisième temps, nous nous sommes ensuite concentrés sur l'influence de l'EPA sur l'agressivité du CaP au moyen notamment d'un modèle animal.
Tout d'abord, nous avons établi un régime nutritionnel qui permet de modifier le rapport omégas 6/omégas 3 de façon bénéfique, comme recommandé pour l'alimentation humaine (237). On constate qu'avec cette alimentation enrichie en EPA les xénogreffes de TRAMP-C2 se développent moins rapidement que dans le groupe contrôle. Cela vient conforter l'effet anti-prolifératif de l'EPA préalablement observé *in vitro* (comme discuté dans la partie précédente). Des résultats *in vivo* similaires ont déjà été rapportés dans la littérature, que ce soit avec une supplémentation en omégas 3 ou spécifiquement en EPA, sur un modèle de TRAMP-C2 ou avec d'autres lignées de CaP (238–242).
Nous avons ensuite constaté que cette alimentation avait modifié la composition du TA péri-épididymaire en augmentant très nettement son contenu en EPA (d'un facteur 100), mais aussi des omégas 3 en aval (acide docosapentaénoïque, DHA). Ceci était associé à une diminution de presque de moitié de son contenu en EDA. Nous avons été interpellé par cette modification en miroir de l'EDA par rapport à l'EPA. Or l'élongation de l'EDA se fait à partir de l'acide linoléique par l'élongase 5 qui a plusieurs substrats dont l'EPA (243).

L'apport important d'EPA par l'alimentation a donc probablement entraîné une compétition pour les substrats au détriment de l'acide linoléique.

**Nous avons ensuite réalisé des co-cultures à l'aide du TA enrichi en EPA avec des cellules PC3, qui ont montré que la migration n'était pas modifiée par rapport aux co-cultures avec les TA contrôles**. Une étude *in vitro* a pourtant rapporté que l'EPA (à 50 µg/ml soit 165 µM) diminuait la migration et l'invasion des cellules PC3 (103). Nous n'avons pour notre part, au laboratoire, jamais observé de diminution de la migration par une supplémentation en EPA (en chambre de Boyden). En revanche, une supplémentation en EPA est capable d'inhiber la migration induite par le TGF-β (92). Ici nous avons réalisé des co-cultures à partir du TA péri-épididymaire pour avoir un TA viscéral le plus semblable possible au TAPP. Une limite de ce modèle vient de l'éloignement physique entre ce TA et la tumeur (en sous-cutané, dans le flanc de la souris), ce qui fait que le TA ne contient donc probablement pas d'« adipocytes associés au cancer », qui auraient été bien utiles pour induire la migration puisqu'ils sont supposés augmenter les capacités migratoires des cellules cancéreuses (83). Il est aussi possible que ce test de migration en cellules isolées n'ait pas été adapté pour cette situation et qu'il aurait été préférable de réaliser un test de migration en cicatrice (« wound healing ») ou à l'aide de chambres de Boyden.

**Ces co-cultures ont en revanche permis de montrer une diminution de la prolifération cellulaire**, ce qui concorde avec l'effet anti-tumoral de l'EPA mesuré sur les xénogreffes déjà évoqué plus haut. Cela renforce également nos résultats de la partie 2 en faveur d'un effet du TAPP (en fonction de sa composition lipidique et notamment en EPA) sur l'agressivité du CaP. Et ce modèle montre de plus qu'une « simple » intervention nutritionnelle pourrait jouer un rôle dans la prise en charge des CaP en clinique. Deux essais cliniques de phase II ont d'ailleurs déjà été réalisés à ce sujet, montrant qu'une supplémentation en EPA et DHA ou encore en graines de lin (qui sont riches en omégas 3, principalement en acide α-linolénique) permettait dans les deux cas de diminuer la prolifération tumorale sur la pièce tumorale de la prostatectomie réalisée au décours de cette intervention nutritionnelle faite pendant les 3 à 6 semaines précédant l'opération chirurgicale (244,245). Malheureusement, ces études ne rapportent aucune donnée sur l'impact clinique de cette intervention, notamment sur le taux de rechute biochimique. Un troisième essai clinique de phase II est en cours (246), qui a l'intérêt d'étudier spécifiquement l'effet d'une supplémentation en EPA en néo-adjuvant pendant 4 à 10 semaines avant l'opération, et encore pendant un an en adjuvant après, sur une cohorte de 130 patients. De nouveau, l'objectif principal de l'étude est de diminuer la prolifération sur la pièce opératoire, avec des analyses de qualité de vie également prévues, mais toujours sans critère clinique d'efficacité de l'intervention. Les résultats de qualité de vie de cet essai ont été publiés récemment, et montrent pour seule différence significative entre les deux groupes, une amélioration des signes urinaires fonctionnels dans le groupe supplémenté en EPA (247).

Nous avons ensuite cherché des pistes « mécanistiques » pouvant expliquer cet effet anti-tumoral anti-prolifératif de l'EPA, toujours à partir de notre modèle de co-culture. **Nous avons tout d'abord constaté une augmentation des gouttelettes lipidiques des PC3 dans le groupe EPA (significativement en ce qui concerne leur taille).** Ce résultat nous a d'abord semblé contre-intuitif, car il est plutôt établi que l'accumulation de gouttelettes lipidiques est un critère d'agressivité pour les cellules cancéreuses (248,249). Dans le CaP,

certaines études ont montré que les tissus tumoraux de CaP de haut grade contenaient significativement plus de gouttelettes lipidiques que les CaP de bas grade (250,251). Une autre publication a rapporté une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques dans différentes lignées de CaP dont des PC3, après ajout d'un milieu conditionné, en association avec une plus grande agressivité des cellules (252). D'autres études ont néanmoins rapporté des résultats concordant avec les nôtres. Une première étude a montré *in vitro,* sur différentes lignées de cancer du sein, qu'un traitement par inhibiteur d'EZH2 avait un effet anti-tumoral, en diminuant la prolifération et en augmentant l'apoptose des cellules cancéreuses. Or cet effet anti-tumoral était associé à une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques dans les cellules cancéreuses (253). Cela est d'autant plus intéressant que l'on a déjà évoqué précédemment une étude en faveur d'un lien entre inhibition d'EZH2 et augmentation du contenu en EPA dans les cellules cancéreuses. Ceci nous porte donc à supposer que l'EPA pourrait induire un effet anti-tumoral *via* l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules cancéreuses en modifiant des mécanismes épigénétiques et notamment en diminuant H3K27me3.

Une autre explication possible pourrait être une augmentation des gouttelettes lipidiques due à une diminution de leur « consommation » dans la cellule, par diminution des phénomènes de lipolyse, comme cela a pu être évoqué auparavant (254).

Nous avons par ailleurs constaté que **cet effet anti-prolifératif pouvait être lié à une diminution de l'entrée calcique SOCE des PC3 après co-culture avec le TA enrichi en EPA.** Cela rejoint les résultats de travaux antérieurs réalisés au laboratoire qui avaient montré que l'entrée SOCE induite par le TGF-β était régulée par l'EPA dans explants et lignées cancéreuses de prostate (92). Nous avons ensuite posé l'hypothèse que cette régulation de l'entrée SOCE passait par la modulation de l'expression des canaux calciques Orai mais les résultats de RT-qPCR ne sont pas en faveur de cette hypothèse. D'autres canaux calciques mériteraient d'être explorés pour comprendre les effets de l'EPA sur l'entrée SOCE.

Enfin, en cas de co-culture sous conditions hypoxiques, nous avons constaté une diminution de l'expression des ARNm codant pour la CAIX et Zeb1, ce qui n'était pas le cas en conditions de normoxie. Cette diminution de Zeb1 est également identifiée dans les tumeurs issues des xénogreffes, ce qui est **en faveur d'un effet de l'EPA sur la TEM**. Il peut sembler surprenant que l'EPA régule Zeb1 sans affecter la migration alors qu'il a été montré dans des travaux antérieurs au laboratoire que l'inhibition de ce facteur de transcription diminuait fortement la migration des cellules de CaP (92). Pour rappel, nous avons effectué le test de migration en normoxie et non pas en hypoxie, ce qui rejoint d'ailleurs l'absence de modification de Zeb1 au décours des co-cultures réalisées en normoxie. Comme nous le rappelions précédemment, il faut sans doute se rapprocher des conditions physiopathologiques (en reproduisant l'environnement inflammatoire par l'ajout de TGF-β ou en reproduisant les conditions d'hypoxie auxquelles les cellules cancéreuses sont généralement soumises) comme dans travaux antérieurs du laboratoire qui ont observé que TGF-β induisait Zeb1 (et donc la TEM) dans des lignées de CaP, et que Zeb1 était ensuite diminué lors de l'ajout d'EPA (92).

L'importante diminution de l'expression de CAIX, sous hypoxie, après les co-cultures avec TA enrichi en EPA par rapport à celles avec TA contrôle, suggère que les mécanismes d'hypoxie qui se mettent habituellement en place lors du développement de la tumeur seraient

fortement inhibés par l'EPA, ce qui participerait à expliquer l'effet anti-tumoral de l'EPA sur les xénogreffes. Pour autant, on n'observe pas de modification de l'expression de CAIX dans les tumeurs murines. Ce résultat est à nuancer car la CAIX ne semble pas non plus être un marqueur très sensible *in vivo*, du moins dans les tumeurs humaines. En effet, alors que l'on sait que les cancers sont hypoxiques de façon générale, on ne retrouve d'expression de CAIX que dans peu d'entre eux (quasiment exclusivement dans le carcinome rénal à cellules claires) (255). Dans cette étude, il n'a d'ailleurs jamais été identifié d'expression de CAIX dans les 66 échantillons de CaP testés.

Par ailleurs, sur les xénogreffes, différentes voies de signalisation ont été investiguées à l'aide du RNA-seq, sans qu'on n'identifie de voie plus nettement impliquée qu'une autre pour nous permettre d'expliquer l'effet anti-tumoral constaté de l'EPA. On note tout de même que **la TEM semble être partiellement inhibée par l'EPA**, du fait de la diminution significative de l'expression de Zeb1 et d'une tendance à la diminution de l'expression de MMP-3, mais sans qu'on ait constaté de modification de Smad3 (contrairement à ce que nous avait fait supposer les analyses en RNA-seq). Des analyses complémentaires seraient intéressantes, notamment pour tester d'autres marqueurs de la TEM, qui ont déjà été impliqués dans l'agressivité du CaP comme : les kératines KRT18, KRT19, la mucine 1 (MUC1), le collagène de type IV (COL4A1), la β-caténine (CTNNB1) et le facteur de transcription SNAI2 (256). Les analyses RNA-seq sont d'autre part en faveur de l'augmentation de l'expression de nombreuses immunoglobulines, ce qui suggère un possible effet de l'EPA sur la réponse immunitaire. Concernant les autres voies de signalisation explorées, nous avons vu que celle de l'apoptose pouvait également constituer une piste intéressante, puisqu'une étude a lié l'effet de l'EPA à une augmentation de l'apoptose (102). Dans notre travail, parmi les gènes impliqués dans l'apoptose, l'analyse en RNA-seq montrait principalement une augmentation de TNFα dans le groupe EPA. Ceci concorde avec une étude *in vitro* ayant montré que les cellules stromovasculaires issues du TA de félins sains sécrétaient davantage de TNFα quand elles étaient supplémentées en EPA (257). Toutefois, dans notre travail, après analyse en RT-qPCR sur l'ensemble des xénogreffes, l'expression de TNFα n'était pas modifiée. A noter que dans l'étude d'Eser *et al*. qui s'intéressait à l'apoptose, l'expression de TNFα n'était pas non plus significativement modulée par l'EPA, contrairement à d'autres gènes impliqués dans l'apoptose comme ATF-3 qui était augmenté, et Bcl-2 qui était diminué (102). Une autre étude a proposé un effet anti-angiogénique de l'EPA, à partir d'expérimentations sur un modèle animal tout à fait similaire à celui que nous avons utilisé de ce travail (240). Ainsi le fait d'observer une tendance à la diminution de MMP-3 dans le groupe EPA nous encourage à explorer davantage la piste de l'angiogenèse, puisqu'il a déjà été montré que MMP-3 était impliqué dans l'angiogenèse sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de CaP (258).

Les principales limites que nous avons identifié dans cette dernière partie de notre travail reposent sur le choix du modèle de xénogreffe, l'injection sous cutanée de TRAMP-C2 étant un modèle permettant davantage d'étudier la prolifération que la migration. Dans ce sens, nous avons observé des effets sur la croissance tumorale mais sans argument pour un potentiel métastatique puisqu'aucune souris n'a développé de métastase. Ceci pose donc la question de la possibilité d'observer des modifications de la migration et/ou de la TEM *via* ce modèle. Par ailleurs, puisque nous avons pris le parti de réaliser les co-cultures avec des explants de TA et

non après avoir isolé les adipocytes du TA, nous mesurons donc l'effet d'un ensemble de populations cellulaires et pas seulement l'effet des adipocytes sur les cellules cancéreuses. Il reste donc à déterminer dans quelle mesure l'effet observé résulte des adipocytes ou d'autres cellules du TA. De plus, ces co-cultures ont été réalisées entre du TA d'origine murine et une lignée de cellules cancéreuses humaines, ceci peut donc avoir limité les interactions entre ces deux types cellulaires provenant d'espèces différentes. On observe néanmoins des interactions différentes selon que le TA est ou non enrichi en EPA. L'idéal aurait été de réaliser des co-cultures également avec des cellules cancéreuses murines TRAMP-C2 mais la quantité de TA prélevée était insuffisante pour pouvoir réaliser les deux types de co-cultures simultanément. Enfin, la partie expérimentale réalisée en hypoxie montre des résultats intéressants en RT-qPCR mais sans avoir pu les associer à des tests fonctionnels complémentaires par manque de matériel et limites techniques pour réaliser certains tests sous hypoxie. Cela limite donc l'interprétation qu'on peut faire de ces résultats.

## Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis de montrer que **TTF1 était un facteur pronostique pour le CPNE.** Ce résultat repose toutefois sur un échantillon limité de 30 patients, ce qui a d'ailleurs probablement aussi participé au fait que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de différence phénotypiques entre les CPNE *de novo* et les CPNE induits par la pression thérapeutique. Il pourrait donc être intéressant d'augmenter cette cohorte en réalisant un recueil multicentrique. Par ailleurs, d'autres études sont nécessaires pour rechercher d'autres pistes permettant de différencier ces deux formes, et surtout d'envisager de nouvelles thérapeutiques plus efficaces, le CPNE restant à ce jour de très mauvais pronostic avec une réponse souvent très modérée au standard de traitement actuel à base de chimiothérapie par sels de platine. Enfin, le diagnostic de CPNE reste difficile à faire, reposant sur l'analyse anatomo-pathologique d'un prélèvement tumoral, alors que les patients sont rarement biopsiés à ce stade de leur maladie. En pratique clinique courante, on s'appuie donc sur un faisceau d'arguments cliniques (rapidité d'évolution de la maladie, apparition de métastases viscérales, PSA peu exprimé et non corrélé à l'importance de la masse tumorale évaluée en imagerie) et biologiques (élévation de la chromogranine A et/ou de la NSE dans le sang), mais ces dosages ne sont pas toujours accessibles en pratique courante. Il serait donc également intéressant de mettre au point d'autres outils diagnostics de cette forme de CaP. Le dosage du TTF1 dans le sang pourrait également être une piste intéressante à étudier comme marqueur pronostique.

La deuxième partie de notre travail suggère que **la composition lipidique du TAPP participe à moduler l'agressivité du CaP**. Cela renforce donc l'intérêt d'étudier l'impact d'une supplémentation en EPA sur la réponse aux différents traitements déjà disponibles dans le CaP. De plus, ce travail a montré un **potentiel lien entre EPA, prolifération des cellules cancéreuses et régulation épigénétique en particulier *via* H3K27me3**. Il sera intéressant de poursuivre les recherches dans ce sens afin de mieux comprendre le lien reliant ces trois éléments, notamment en cherchant quels gènes pourraient être régulés par H3K27me3 en cas de supplémentation par EPA. On pourrait également explorer plus en détails la régulation épigénétique des gènes impliqués non seulement dans la prolifération mais également dans la TEM, en particulier Zeb1 qui en est un acteur important dans le CaP. Une connaissance plus « fine » des mécanismes épigénétiques en jeu pourra peut-être, à terme, conduire au développement de traitements davantage ciblés. Force est de constater qu'à ce jour les inhibiteurs d'EZH2 peinent à se développer, notamment dans les tumeurs solides. Ils font l'objet d'essais cliniques en cancérologie depuis déjà plus de 10 ans, mais les premières molécules développées se sont révélées délicates à manier du fait de leur profil de tolérance. Cette classe thérapeutique reste néanmoins à l'étude notamment dans des essais les combinant avec d'autres thérapeutiques afin d'optimiser leur efficacité, notamment dans le CPMRC (259).
Enfin, d'autres mécanismes épigénétiques pourraient être explorés, notamment toute la régulation réalisée par les miARNs. Nous avons d'ailleurs commencé à travailler sur le possible caractère prédictif des miARNs dans la réponse aux traitements réalisés en pratique clinique courante pour le CPMRC. Cette partie du travail est encore trop peu avancée pour avoir pu être présentée dans le cadre de cette thèse mais fera l'objet d'un travail ultérieur.

La dernière partie de notre travail est venue étayer le **caractère anti-tumoral de l'EPA notamment par son effet anti-prolifératif dans le CaP**. Les mécanismes biologiques aboutissant à cet effet restent à confirmer. Une des pistes que nous envisageons est la modification du métabolisme lipidique des cellules cancéreuses, puisque l'on a observé une augmentation des gouttelettes lipidiques dans les PC3 après co-culture avec le TA enrichi en EPA. D'autres études seraient intéressantes à réaliser afin de déterminer le type de lipides contenus dans ces gouttelettes, même si cela semble techniquement difficile à envisager au vu de la quantité de cellules qui serait nécessaire afin de les étudier en chromatographie en phase gazeuse. Il serait important également de déterminer par quel mécanisme les gouttelettes lipidiques s'accumulent dans les cellules et pourquoi contrairement à ce qui est le plus communément admis, cela ne semble pas être ici source d'agressivité pour la cellule cancéreuse. L'autre piste mécanistique que nous envisageons est une régulation de la prolifération *via* les entrées calciques notamment *via* l'entrée SOCE. Il serait intéressant de poursuivre les recherches sur la signalisation calcique, pour déterminer d'une part si d'autres types d'entrées calciques sont régulées par l'EPA et d'autre part comment le SOCE est régulé par l'EPA et *via* quels canaux calciques. Enfin nous prévoyons de poursuivre l'exploration des modifications induites par l'EPA sur les tumeurs murines, en explorant de façon plus approfondie les gènes de la TEM, de l'apoptose et de l'angiogenèse.

**Actuellement le CPMRC reste incurable et de pronostic sombre, de nouvelles armes thérapeutiques sont donc nécessaires. Ce projet a permis d'initier différentes voies de recherche, dans le CPNE d'une part et renforçant l'intérêt de continuer à explorer l'effet d'une supplémentation en EPA chez les patients traités pour un CaP d'autre part.**

## Bibliographie


1. Zhou CK, Check DP, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Ferlay J, et al. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. Int J Cancer. 2016 Mar 15;138(6):1388–400.
2. Cozar JM, Robles-Fernandez I, Martinez-Gonzalez LJ, Pascual-Geler M, Rodriguez-Martinez A, Serrano MJ, et al. Genetic markers a landscape in prostate cancer. Mutat Res Rev Mutat Res. 2018;775:1–10.
3. Brandt A, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Age-specific risk of incident prostate cancer and risk of death from prostate cancer defined by the number of affected family members. Eur Urol. 2010 Aug;58(2):275–80.
4. Smith ZL, Eggener SE, Murphy AB. African-American Prostate Cancer Disparities. Curr Urol Rep. 2017 Aug 14;18(10):81.
5. Okobia MN, Zmuda JM, Ferrell RE, Patrick AL, Bunker CH. Chromosome 8q24 variants are associated with prostate cancer risk in a high risk population of African ancestry. The Prostate. 2011 Jul;71(10):1054–63.
6. Koochekpour S, Buckles E, Shourideh M, Hu S, Chandra D, Zabaleta J, et al. Androgen receptor mutations and polymorphisms in African American prostate cancer. Int J Biol Sci. 2014;10(6):643–51.
7. Karakas C, Wang C, Deng F, Huang H, Wang D, Lee P. Molecular mechanisms involving prostate cancer racial disparity. Am J Clin Exp Urol. 2017;5(3):34–48.
8. Robbins CM, Hooker S, Kittles RA, Carpten JD. EphB2 SNPs and sporadic prostate cancer risk in African American men. PloS One. 2011;6(5):e19494.
9. Ploussard G, Fiard G, Barret E, Brureau L, Créhange G, Dariane C, et al. French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Diagnosis and management of localised disease. Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol. 2022 Nov;32(15):1275–372.
10. Wilson KM, Shui IM, Mucci LA, Giovannucci E. Calcium and phosphorus intake and prostate cancer risk: a 24-y follow-up study. Am J Clin Nutr. 2015 Jan;101(1):173–83.
11. Mitrou PN, Albanes D, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, et al. A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland). Int J Cancer. 2007 Jun 1;120(11):2466–73.
12. Orlich MJ, Mashchak AD, Jaceldo-Siegl K, Utt JT, Knutsen SF, Sveen LE, et al. Dairy foods, calcium intakes, and risk of incident prostate cancer in Adventist Health Study-2. Am J Clin Nutr. 2022 Aug 4;116(2):314–24.
13. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol. 2016 Feb;40(2):244–52.
14. Zumsteg ZS, Spratt DE, Pei I, Zhang Z, Yamada Y, Kollmeier M, et al. A new risk classification system for therapeutic decision making with intermediate-risk prostate cancer patients undergoing dose-escalated external-beam radiation therapy. Eur Urol. 2013 Dec;64(6):895–902.
15. George DJ, Sartor O, Miller K, Saad F, Tombal B, Kalinovský J, et al. Treatment Patterns and Outcomes in Patients With Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in a Real-world Clinical Practice Setting in the United States. Clin Genitourin Cancer. 2020 Aug;18(4):284–94.
16. Halwani AS, Rasmussen KM, Patil V, Li CC, Yong CM, Burningham Z, et al. Real-world practice patterns in veterans with metastatic castration-resistant prostate cancer. Urol Oncol. 2020 Jan;38(1):1.e1-1.e10.

17. Shore ND, Laliberté F, Ionescu-Ittu R, Yang L, Mahendran M, Lejeune D, et al. Real-World Treatment Patterns and Overall Survival of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer in the US Prior to PARP Inhibitors. Adv Ther. 2021 Aug;38(8):4520–40.
18. Carreira S, Romanel A, Goodall J, Grist E, Ferraldeschi R, Miranda S, et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. Sci Transl Med. 2014 Sep 17;6(254):254ra125.
19. Attard G, Murphy L, Clarke NW, Cross W, Jones RJ, Parker CC, et al. Abiraterone acetate and prednisolone with or without enzalutamide for high-risk non-metastatic prostate cancer: a meta-analysis of primary results from two randomised controlled phase 3 trials of the STAMPEDE platform protocol. Lancet Lond Engl. 2022 Jan 29;399(10323):447–60.
20. Ploussard G, Roubaud G, Barret E, Beauval JB, Brureau L, Créhange G, et al. French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Management of metastatic disease and castration resistance. Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol. 2022 Nov;32(15):1373–419.
21. Martínez-Jiménez F, Movasati A, Brunner SR, Nguyen L, Priestley P, Cuppen E, et al. Pan-cancer whole-genome comparison of primary and metastatic solid tumours. Nature. 2023 Jun;618(7964):333–41.
22. Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E leong. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacol Sin. 2015 Jan;36(1):3–23.
23. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. Nat Rev Cancer. 2015 Dec;15(12):701–11.
24. Jiang M, Ma Y, Chen C, Fu X, Yang S, Li X, et al. Androgen-responsive gene database: integrated knowledge on androgen-responsive genes. Mol Endocrinol Baltim Md. 2009 Nov;23(11):1927–33.
25. Lamont KR, Tindall DJ. Androgen regulation of gene expression. Adv Cancer Res. 2010;107:137–62.
26. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Verri E, Scarpelli M, et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. Cells. 2020 Dec 10;9(12):2653.
27. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet. 1995 Apr;9(4):401–6.
28. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. Eur Urol. 2013 May;63(5):920–6.
29. Hamid ARAH, Kusuma Putra HW, Sari NP, Diana P, Sesari SS, Novita E, et al. Early upregulation of AR and steroidogenesis enzyme expression after 3 months of androgen-deprivation therapy. BMC Urol. 2020 Jun 19;20(1):71.
30. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. Science. 2009 May 8;324(5928):787–90.
31. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Dec 14;173(2):534–40.
32. Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 1993 Dec;46(6):759–65.
33. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. Cell. 2015 May 21;161(5):1215–28.

34. Hara T, Miyazaki J ichi, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. Cancer Res. 2003 Jan 1;63(1):149–53.
35. Zhao XY, Malloy PJ, Krishnan AV, Swami S, Navone NM, Peehl DM, et al. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. Nat Med. 2000 Jun;6(6):703–6.
36. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Sep 28;107(39):16759–65.
37. Kim S, Au CC, Jamalruddin MAB, Abou-Ghali NE, Mukhtar E, Portella L, et al. AR-V7 exhibits non-canonical mechanisms of nuclear import and chromatin engagement in castrate-resistant prostate cancer. eLife. 2022 Jul 18;11:e73396.
38. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. N Engl J Med. 2014 Sep 11;371(11):1028–38.
39. Efstathiou E, Titus M, Wen S, Hoang A, Karlou M, Ashe R, et al. Molecular characterization of enzalutamide-treated bone metastatic castration-resistant prostate cancer. Eur Urol. 2015 Jan;67(1):53–60.
40. Erdmann É, Ould Madi Berthélémy P, Cottard F, Angel CZ, Schreyer E, Ye T, et al. Androgen receptor-mediated transcriptional repression targets cell plasticity in prostate cancer. Mol Oncol. 2022 Jul;16(13):2518–36.
41. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat JP, Kurtz JE, Céraline J. Constitutively active androgen receptor variants upregulate expression of mesenchymal markers in prostate cancer cells. PloS One. 2013;8(5):e63466.
42. Cai C, Chen S, Ng P, Bubley GJ, Nelson PS, Mostaghel EA, et al. Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. Cancer Res. 2011 Oct 15;71(20):6503–13.
43. Armstrong CM, Gao AC. Dysregulated androgen synthesis and anti-androgen resistance in advanced prostate cancer. Am J Clin Exp Urol. 2021;9(4):292–300.
44. Kalogirou C, Linxweiler J, Schmucker P, Snaebjornsson MT, Schmitz W, Wach S, et al. MiR-205-driven downregulation of cholesterol biosynthesis through SQLE-inhibition identifies therapeutic vulnerability in aggressive prostate cancer. Nat Commun. 2021 Aug 20;12(1):5066.
45. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. Cancer Res. 2008 Jun 1;68(11):4447–54.
46. Locke JA, Guns ES, Lubik AA, Adomat HH, Hendy SC, Wood CA, et al. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. Cancer Res. 2008 Aug 1;68(15):6407–15.
47. Liu C, Lou W, Zhu Y, Yang JC, Nadiminty N, Gaikwad NW, et al. Intracrine Androgens and AKR1C3 Activation Confer Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer. Cancer Res. 2015 Apr 1;75(7):1413–22.
48. Liu C, Armstrong CM, Lou W, Lombard A, Evans CP, Gao AC. Inhibition of AKR1C3 Activation Overcomes Resistance to Abiraterone in Advanced Prostate Cancer. Mol Cancer Ther. 2017 Jan;16(1):35–44.
49. Yang JC, Xu P, Ning S, Wasielewski LJ, Adomat H, Hwang SH, et al. Novel inhibition of AKR1C3 and androgen receptor axis by PTUPB synergizes enzalutamide treatment in advanced prostate cancer. Oncogene. 2023 Feb;42(9):693–707.

50. Cleutjens CB, Steketee K, van Eekelen CC, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J. Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. Endocrinology. 1997 Dec;138(12):5293–300.
51. Isikbay M, Otto K, Kregel S, Kach J, Cai Y, Vander Griend DJ, et al. Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. Horm Cancer. 2014 Apr;5(2):72–89.
52. Sahu B, Laakso M, Pihlajamaa P, Ovaska K, Sinielnikov I, Hautaniemi S, et al. FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. Cancer Res. 2013 Mar 1;73(5):1570–80.
53. Yemelyanov A, Bhalla P, Yang X, Ugolkov A, Iwadate K, Karseladze A, et al. Differential targeting of androgen and glucocorticoid receptors induces ER stress and apoptosis in prostate cancer cells: a novel therapeutic modality. Cell Cycle Georget Tex. 2012 Jan 15;11(2):395–406.
54. Puhr M, Hoefer J, Eigentler A, Ploner C, Handle F, Schaefer G, et al. The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2018 Feb 15;24(4):927–38.
55. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD, et al. Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. Cell. 2013 Dec 5;155(6):1309–22.
56. Lundberg A, Zhang M, Aggarwal R, Li H, Zhang L, Foye A, et al. The Genomic and Epigenomic Landscape of Double-Negative Metastatic Prostate Cancer. Cancer Res. 2023 Aug 15;83(16):2763–74.
57. Labrecque MP, Coleman IM, Brown LG, True LD, Kollath L, Lakely B, et al. Molecular profiling stratifies diverse phenotypes of treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer. J Clin Invest. 2019 Jul 30;129(10):4492–505.
58. Priemer DS, Montironi R, Wang L, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Cheng L. Neuroendocrine Tumors of the Prostate: Emerging Insights from Molecular Data and Updates to the 2016 World Health Organization Classification. Endocr Pathol. 2016 Jun;27(2):123–35.
59. Zhang Q, Han Y, Zhang Y, Liu D, Ming J, Huang B, et al. Treatment-Emergent Neuroendocrine Prostate Cancer: A Clinicopathological and Immunohistochemical Analysis of 94 Cases. Front Oncol. 2020;10:571308.
60. Conteduca V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, et al. Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2019 Nov;121:7–18.
61. Wang J, Xu W, Mierxiati A, Huang Y, Wei Y, Lin G, et al. Low-serum prostate-specific antigen level predicts poor outcomes in patients with primary neuroendocrine prostate cancer. The Prostate. 2019 Sep;79(13):1563–71.
62. Yamada Y, Beltran H. Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer. Curr Oncol Rep. 2021 Jan 12;23(2):15.
63. Kukkonen K, Taavitsainen S, Huhtala L, Uusi-Makela J, Granberg KJ, Nykter M, et al. Chromatin and Epigenetic Dysregulation of Prostate Cancer Development, Progression, and Therapeutic Response. Cancers. 2021 Jul 2;13(13):3325.
64. Arina A, Idel C, Hyjek EM, Alegre ML, Wang Y, Bindokas VP, et al. Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 5;113(27):7551–6.
65. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, et al. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. Am J Pathol. 2007 Nov;171(5):1608–18.
66. Bonollo F, Thalmann GN, Kruithof-de Julio M, Karkampouna S. The Role of Cancer-

Associated Fibroblasts in Prostate Cancer Tumorigenesis. Cancers. 2020 Jul 13;12(7):1887.
67. Levesque C, Nelson PS. Cellular Constituents of the Prostate Stroma: Key Contributors to Prostate Cancer Progression and Therapy Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Aug 1;8(8):a030510.
68. Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulsom R, Oukrif D, et al. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. Cancer Res. 2004 Dec 1;64(23):8492–5.
69. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. PloS One. 2009;4(4):e4992.
70. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. Cancer Cell. 2011 Feb 15;19(2):257–72.
71. Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. Stem Cell Res Ther. 2013 Jun 13;4(3):70.
72. Jotzu C, Alt E, Welte G, Li J, Hennessy BT, Devarajan E, et al. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. Cell Oncol Dordr. 2011 Feb;34(1):55–67.
73. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. Cancer Metastasis Rev. 2012 Jun;31(1–2):195–208.
74. Taddei ML, Giannoni E, Comito G, Chiarugi P. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. Cancer Lett. 2013 Nov 28;341(1):80–96.
75. Wu SQ, Su H, Wang YH, Zhao XK. Role of tumor-associated immune cells in prostate cancer: angel or devil? Asian J Androl. 2019;21(5):433–7.
76. Lopez-Bujanda Z, Drake CG. Myeloid-derived cells in prostate cancer progression: phenotype and prospective therapies. J Leukoc Biol. 2017 Aug;102(2):393–406.
77. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. Trends Immunol. 2016 Mar;37(3):208–20.
78. Vuk-Pavlović S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, Zhao X, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. The Prostate. 2010 Mar 1;70(4):443–55.
79. Laurent V, Nieto L, Valet P, Muller C. [Adipose tissue and cancer: a high risk tandem]. Med Sci MS. 2014 Apr;30(4):398–404.
80. Attané C, Muller C. Drilling for Oil: Tumor-Surrounding Adipocytes Fueling Cancer. Trends Cancer. 2020 Jul;6(7):593–604.
81. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, Le Gonidec S, Toulet A, Nieto L, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. Nat Commun. 2016 Jan 12;7:10230.
82. Moreira Â, Pereira SS, Costa M, Morais T, Pinto A, Fernandes R, et al. Adipocyte secreted factors enhance aggressiveness of prostate carcinoma cells. PloS One. 2015;10(4):e0123217.
83. Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, Oliveira MJ, Freitas M, Fraga A, et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. J Exp Clin Cancer Res CR. 2012 Apr 2;31(1):32.
84. Massillo C, Dalton GN, Porretti J, Scalise GD, Farré PL, Piccioni F, et al. CTBP1/CYP19A1/estradiol axis together with adipose tissue impacts over prostate cancer growth associated to metabolic syndrome. Int J Cancer. 2019 Mar 1;144(5):1115–27.
85. Baillargeon J, Rose DP. Obesity, adipokines, and prostate cancer (review). Int J Oncol. 2006 Mar;28(3):737–45.

86. Sacca PA, Creydt VP, Choi H, Mazza ON, Fletcher SJ, Vallone VBF, et al. Human periprostatic adipose tissue: its influence on prostate cancer cells. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2012;30(1):113–22.
87. Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, Lau A, Narula N, Petricoin EF, et al. Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. J Urol. 2009 Oct;182(4):1621–7.
88. Gorrab A, Pagano A, Ayed K, Chebil M, Derouiche A, Kovacic H, et al. Leptin Promotes Prostate Cancer Proliferation and Migration by Stimulating STAT3 Pathway. Nutr Cancer. 2021;73(7):1217–27.
89. Xu CJ, Dong LL, Kang XL, Li ZM, Zhang HY. Leptin promotes proliferation and inhibits apoptosis of prostate cancer cells by regulating ERK1/2 signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020 Aug;24(16):8341–8.
90. Tawadros T, Brown MD, Hart CA, Clarke NW. Ligand-independent activation of EphA2 by arachidonic acid induces metastasis-like behaviour in prostate cancer cells. Br J Cancer. 2012 Nov 6;107(10):1737–44.
91. Fontaine A, Bellanger D, Guibon R, Bruyère F, Brisson L, Fromont G. Lipophagy and prostate cancer: association with disease aggressiveness and proximity to periprostatic adipose tissue. J Pathol. 2021 Oct;255(2):166–76.
92. Figiel S, Bery F, Chantôme A, Fontaine D, Pasqualin C, Maupoil V, et al. A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. Cancers. 2019 Nov 18;11(11):1814.
93. Fontana F, Anselmi M, Limonta P. Adipocytes reprogram prostate cancer stem cell machinery. J Cell Commun Signal. 2023 Mar 20;
94. Lin LC, Gao AC, Lai CH, Hsieh JT, Lin H. Induction of neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer cells by adipocyte differentiation-related protein (ADRP) delivered by exosomes. Cancer Lett. 2017 Apr;391:74–82.
95. Figiel S, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, Guibon R, Besson P, et al. Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African-Caribbean and Caucasian patients. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2018 Mar;91:107–15.
96. Kaneko A, Satoh Y, Tokuda Y, Fujiyama C, Udo K, Uozumi J. Effects of adipocytes on the proliferation and differentiation of prostate cancer cells in a 3-D culture model. Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc. 2010 Apr;17(4):369–76.
97. Ribeiro RJT, Monteiro CPD, Cunha VFPM, Azevedo ASM, Oliveira MJ, Monteiro R, et al. Tumor cell-educated periprostatic adipose tissue acquires an aggressive cancer-promoting secretory profile. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2012;29(1–2):233–40.
98. Robichaud PP, Munganyiki JE, Boilard E, Surette ME. Polyunsaturated fatty acid elongation and desaturation in activated human T-cells: ELOVL5 is the key elongase. J Lipid Res. 2018 Dec;59(12):2383–96.
99. Rose DP, Connolly JM. Effects of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors on the growth of two human prostate cancer cell lines. The Prostate. 1991;18(3):243–54.
100. Meng H, Shen Y, Shen J, Zhou F, Shen S, Das UN. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. Lipids Health Dis. 2013 Oct 29;12:160.
101. Pan J, Zhou S, Xiang R, Zhao Z, Liu S, Ding N, et al. An Ω-3 fatty acid desaturase-expressing gene attenuates prostate cancer proliferation by cell cycle regulation. Oncol Lett. 2017 May;13(5):3717–21.
102. Eser PO, Vanden Heuvel JP, Araujo J, Thompson JT. Marine- and plant-derived ω-3 fatty acids differentially regulate prostate cancer cell proliferation. Mol Clin Oncol. 2013 May;1(3):444–52.

103. Oono K, Takahashi K, Sukehara S, Kurosawa H, Matsumura T, Taniguchi S, et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. Mol Clin Oncol. 2017 Aug;7(2):217–20.
104. Sugiura M, Sato H, Kanesaka M, Imamura Y, Sakamoto S, Ichikawa T, et al. Epigenetic modifications in prostate cancer. Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc. 2021 Feb;28(2):140–9.
105. Pardo JC, Ruiz de Porras V, Gil J, Font A, Puig-Domingo M, Jordà M. Lipid Metabolism and Epigenetics Crosstalk in Prostate Cancer. Nutrients. 2022 Feb 18;14(4):851.
106. Vardi A, Bosviel R, Rabiau N, Adjakly M, Satih S, Dechelotte P, et al. Soy phytoestrogens modify DNA methylation of GSTP1, RASSF1A, EPH2 and BRCA1 promoter in prostate cancer cells. Vivo Athens Greece. 2010;24(4):393–400.
107. Majid S, Kikuno N, Nelles J, Noonan E, Tanaka Y, Kawamoto K, et al. Genistein induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a tumor suppressor genes in prostate cancer cells by epigenetic mechanisms involving active chromatin modification. Cancer Res. 2008 Apr 15;68(8):2736–44.
108. Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer. Essays Biochem. 2019 Dec 20;63(6):797–811.
109. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1148–59.
110. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. J Pathol. 2004 Feb;202(2):233–40.
111. Padar A, Sathyanarayana UG, Suzuki M, Maruyama R, Hsieh JT, Frenkel EP, et al. Inactivation of cyclin D2 gene in prostate cancers by aberrant promoter methylation. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2003 Oct 15;9(13):4730–4.
112. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2002 Feb;8(2):514–9.
113. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li LC, et al. Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6582–8.
114. Shin HJ, Hua JT, Li H. Recent advances in understanding DNA methylation of prostate cancer. Front Oncol. 2023;13:1182727.
115. Florl AR, Steinhoff C, Müller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, et al. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. Br J Cancer. 2004 Aug 31;91(5):985–94.
116. Adjakly M, Ngollo M, Dagdemir A, Judes G, Pajon A, Karsli-Ceppioglu S, et al. Prostate cancer: The main risk and protective factors-Epigenetic modifications. Ann Endocrinol. 2015 Feb;76(1):25–41.
117. Sjöström M, Zhao SG, Levy S, Zhang M, Ning Y, Shrestha R, et al. The 5-Hydroxymethylcytosine Landscape of Prostate Cancer. Cancer Res. 2022 Nov 2;82(21):3888–902.
118. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med. 2003 Nov 20;349(21):2042–54.
119. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, et al. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):8954–67.
120. Bedford MT, van Helden PD. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. Cancer Res. 1987 Oct 15;47(20):5274–6.
121. Storebjerg TM, Strand SH, Høyer S, Lynnerup AS, Borre M, Ørntoft TF, et al.

Dysregulation and prognostic potential of 5-methylcytosine (5mC), 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC), and 5-carboxylcytosine (5caC) levels in prostate cancer. Clin Epigenetics. 2018 Aug 7;10(1):105.
122. Yang B, Sun H, Lin W, Hou W, Li H, Zhang L, et al. Evaluation of global DNA hypomethylation in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasm tissues by immunohistochemistry. Urol Oncol. 2013 Jul;31(5):628–34.
123. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. Oncotarget. 2011 Aug;2(8):627–37.
124. Bhasin JM, Lee BH, Matkin L, Taylor MG, Hu B, Xu Y, et al. Methylome-wide Sequencing Detects DNA Hypermethylation Distinguishing Indolent from Aggressive Prostate Cancer. Cell Rep. 2015 Dec 15;13(10):2135–46.
125. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. Cell. 2015 Nov 5;163(4):1011–25.
126. Zhao SG, Chen WS, Li H, Foye A, Zhang M, Sjöström M, et al. The DNA methylation landscape of advanced prostate cancer. Nat Genet. 2020 Aug;52(8):778–89.
127. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. Nat Med. 2016 Mar;22(3):298–305.
128. Wang Q, Carroll JS, Brown M. Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. Mol Cell. 2005 Sep 2;19(5):631–42.
129. Wissmann M, Yin N, Müller JM, Greschik H, Fodor BD, Jenuwein T, et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. Nat Cell Biol. 2007 Mar;9(3):347–53.
130. Cang S, Feng J, Konno S, Han L, Liu K, Sharma SC, et al. Deficient histone acetylation and excessive deacetylase activity as epigenomic marks of prostate cancer cells. Int J Oncol. 2009 Dec;35(6):1417–22.
131. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, et al. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. The Prostate. 2010 Jan 1;70(1):61–9.
132. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. Br J Cancer. 2008 Feb 12;98(3):604–10.
133. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. The Prostate. 2004 May 1;59(2):177–89.
134. Ippolito L, Comito G, Parri M, Iozzo M, Duatti A, Virgilio F, et al. Lactate Rewires Lipid Metabolism and Sustains a Metabolic-Epigenetic Axis in Prostate Cancer. Cancer Res. 2022 Apr 1;82(7):1267–82.
135. Damodaran S, Damaschke N, Gawdzik J, Yang B, Shi C, Allen GO, et al. Dysregulation of Sirtuin 2 (SIRT2) and histone H3K18 acetylation pathways associates with adverse prostate cancer outcomes. BMC Cancer. 2017 Dec 20;17(1):874.
136. Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, Jindal S, Day TK, Thomas M, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 2010 Oct;19(10):2611–22.
137. Ngollo M, Lebert A, Daures M, Judes G, Rifai K, Dubois L, et al. Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. BMC Cancer. 2017 Apr

12;17(1):261.
138. Ngollo M, Lebert A, Dagdemir A, Judes G, Karsli-Ceppioglu S, Daures M, et al. The association between histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters. BMC Cancer. 2014 Dec 23;14:994.
139. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, et al. Global histone H3K27 methylation levels are different in localized and metastatic prostate cancer. Cancer Invest. 2012 Feb;30(2):92–7.
140. Pellakuru LG, Iwata T, Gurel B, Schultz D, Hicks J, Bethel C, et al. Global levels of H3K27me3 track with differentiation in vivo and are deregulated by MYC in prostate cancer. Am J Pathol. 2012 Aug;181(2):560–9.
141. Deligezer U, Yaman F, Darendeliler E, Dizdar Y, Holdenrieder S, Kovancilar M, et al. Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 2010 Oct 9;411(19–20):1452–6.
142. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature. 2002 Oct 10;419(6907):624–9.
143. van Leenders GJLH, Dukers D, Hessels D, van den Kieboom SWM, Hulsbergen CA, Witjes JA, et al. Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. Eur Urol. 2007 Aug;52(2):455–63.
144. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. Science. 2012 Dec 14;338(6113):1465–9.
145. Kim J, Lee Y, Lu X, Song B, Fong KW, Cao Q, et al. Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. Cell Rep. 2018 Dec 4;25(10):2808-2820.e4.
146. Zhang Y, Zheng D, Zhou T, Song H, Hulsurkar M, Su N, et al. Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. Nat Commun. 2018 Oct 4;9(1):4080.
147. Shan J, Al-Muftah MA, Al-Kowari MK, Abuaqel SWJ, Al-Rumaihi K, Al-Bozom I, et al. Targeting Wnt/EZH2/microRNA-708 signaling pathway inhibits neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Cell Death Discov. 2019;5:139.
148. Myzak MC, Tong P, Dashwood WM, Dashwood RH, Ho E. Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. Exp Biol Med Maywood NJ. 2007 Feb;232(2):227–34.
149. Beaver LM, Löhr CV, Clarke JD, Glasser ST, Watson GW, Wong CP, et al. Broccoli Sprouts Delay Prostate Cancer Formation and Decrease Prostate Cancer Severity with a Concurrent Decrease in HDAC3 Protein Expression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) Mice. Curr Dev Nutr. 2018 Mar;2(3):nzy002.
150. Singh SV, Warin R, Xiao D, Powolny AA, Stan SD, Arlotti JA, et al. Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. Cancer Res. 2009 Mar 1;69(5):2117–25.
151. Liu AG, Juvik JA, Jeffery EH, Berman-Booty LD, Clinton SK, Erdman JW. Enhancement of broccoli indole glucosinolates by methyl jasmonate treatment and effects on prostate carcinogenesis. J Med Food. 2014 Nov;17(11):1177–82.
152. Gujrati H, Ha S, Wang BD. Deregulated microRNAs Involved in Prostate Cancer Aggressiveness and Treatment Resistance Mechanisms. Cancers. 2023 Jun 10;15(12):3140.
153. Liu C, Chen Z, Hu X, Wang L, Li C, Xue J, et al. MicroRNA-185 downregulates androgen receptor expression in the LNCaP prostate carcinoma cell line. Mol Med Rep. 2015

Jun;11(6):4625–32.
154. Gao S, Zhao Z, Wu R, Wu L, Tian X, Zhang Z. MiR-1 inhibits prostate cancer PC3 cells proliferation through the Akt/mTOR signaling pathway by binding to c-Met. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. 2019 Jan;109:1406–10.
155. Zhu C, Hou X, Zhu J, Jiang C, Wei W. Expression of miR-30c and miR-29b in prostate cancer and its diagnostic significance. Oncol Lett. 2018 Sep;16(3):3140–4.
156. Pełka K, Klicka K, Grzywa TM, Gondek A, Marczewska JM, Garbicz F, et al. miR-96-5p, miR-134-5p, miR-181b-5p and miR-200b-3p heterogenous expression in sites of prostate cancer versus benign prostate hyperplasia-archival samples study. Histochem Cell Biol. 2021 Mar;155(3):423–33.
157. Verdoodt B, Neid M, Vogt M, Kuhn V, Liffers ST, Palisaar RJ, et al. MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein Bcl2, is downregulated in prostate cancer. Int J Oncol. 2013 Jul;43(1):307–14.
158. Wang L, Yu J, Xu J, Zheng C, Li X, Du J. The analysis of microRNA-34 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with corresponding pericarcinous tissues. Gene. 2015 Jan 1;554(1):1–8.
159. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol. 2008 May;10(5):593–601.
160. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. J Cell Mol Med. 2009 Jan;13(1):39–53.
161. Arisan ED, Rencuzogullari O, Freitas IL, Radzali S, Keskin B, Kothari A, et al. Upregulated Wnt-11 and miR-21 Expression Trigger Epithelial Mesenchymal Transition in Aggressive Prostate Cancer Cells. Biology. 2020 Mar 9;9(3):52.
162. Zhao W, Ning L, Wang L, Ouyang T, Qi L, Yang R, et al. miR-21 inhibition reverses doxorubicin-resistance and inhibits PC3 human prostate cancer cells proliferation. Andrologia. 2021 Jun;53(5):e14016.
163. Yang Y, Guo JX, Shao ZQ. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. Asian Pac J Trop Med. 2017 Jan;10(1):87–91.
164. Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, Sekhon K, Majid S, Shahryari V, et al. microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer. Cancer Res. 2018 Apr 1;78(7):1833–44.
165. Doldi V, El Bezawy R, Zaffaroni N. MicroRNAs as Epigenetic Determinants of Treatment Response and Potential Therapeutic Targets in Prostate Cancer. Cancers. 2021 May 14;13(10):2380.
166. Akoto T, Bhagirath D, Saini S. MicroRNAs in treatment-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Cancer Drug Resist Alhambra Calif. 2020;3(4):804–18.
167. Bhagirath D, Liston M, Patel N, Akoto T, Lui B, Yang TL, et al. MicroRNA determinants of neuroendocrine differentiation in metastatic castration-resistant prostate cancer. Oncogene. 2020 Dec;39(49):7209–23.
168. Sun Y, Wang BE, Leong KG, Yue P, Li L, Jhunjhunwala S, et al. Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy. Cancer Res. 2012 Jan 15;72(2):527–36.
169. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 2008 May 16;133(4):704–15.
170. Olea-Flores M, Juárez-Cruz JC, Zuñiga-Eulogio MD, Acosta E, García-Rodríguez E, Zacapala-Gomez AE, et al. New Actors Driving the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: The Role of Leptin. Biomolecules. 2020 Dec 15;10(12):1676.

171. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):7003–11.
172. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, et al. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. Nat Med. 2010 Dec;16(12):1414–20.
173. Deep G, Jain AK, Ramteke A, Ting H, Vijendra KC, Gangar SC, et al. SNAI1 is critical for the aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin. Mol Cancer. 2014 Feb 24;13:37.
174. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol. 2000 Feb;2(2):76–83.
175. Poblete CE, Fulla J, Gallardo M, Muñoz V, Castellón EA, Gallegos I, et al. Increased SNAIL expression and low syndecan levels are associated with high Gleason grade in prostate cancer. Int J Oncol. 2014 Mar;44(3):647–54.
176. Odero-Marah VA, Wang R, Chu G, Zayzafoon M, Xu J, Shi C, et al. Receptor activator of NF-kappaB Ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cell Res. 2008 Aug;18(8):858–70.
177. Smith BN, Odero-Marah VA. The role of Snail in prostate cancer. Cell Adhes Migr. 2012;6(5):433–41.
178. Heebøll S, Borre M, Ottosen PD, Dyrskjøt L, Orntoft TF, Tørring N. Snail1 is over-expressed in prostate cancer. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 2009 Mar;117(3):196–204.
179. Ipekci T, Ozden F, Unal B, Saygin C, Uzunaslan D, Ates E. Epithelial-Mesenchymal Transition Markers β-catenin, Snail, and E-Cadherin do not Predict Disease Free Survival in Prostate Adenocarcinoma: a Prospective Study. Pathol Oncol Res POR. 2015 Sep;21(4):1209–16.
180. Ware KE, Somarelli JA, Schaeffer D, Li J, Zhang T, Park S, et al. Snail promotes resistance to enzalutamide through regulation of androgen receptor activity in prostate cancer. Oncotarget. 2016 Aug 2;7(31):50507–21.
181. Beach S, Tang H, Park S, Dhillon AS, Keller ET, Kolch W, et al. Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells. Oncogene. 2008 Apr 3;27(15):2243–8.
182. Wen YC, Lee WJ, Tan P, Yang SF, Hsiao M, Lee LM, et al. By inhibiting snail signaling and miR-23a-3p, osthole suppresses the EMT-mediated metastatic ability in prostate cancer. Oncotarget. 2015 Aug 28;6(25):21120–36.
183. Farfán N, Ocarez N, Castellón EA, Mejía N, de Herreros AG, Contreras HR. The transcriptional factor ZEB1 represses Syndecan 1 expression in prostate cancer. Sci Rep. 2018 Jul 31;8(1):11467.
184. McKeithen D, Graham T, Chung LWK, Odero-Marah V. Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. The Prostate. 2010 Jun 15;70(9):982–92.
185. Wang X, Xu J, Wang H, Wu L, Yuan W, Du J, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reverses epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer SW480 and prostate cancer PC3 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 2;456(1):320–6.
186. Uygur B, Wu WS. SLUG promotes prostate cancer cell migration and invasion via CXCR4/CXCL12 axis. Mol Cancer. 2011 Nov 10;10:139.
187. Wu K, Gore C, Yang L, Fazli L, Gleave M, Pong RC, et al. Slug, a unique androgen-regulated transcription factor, coordinates androgen receptor to facilitate castration resistance

in prostate cancer. Mol Endocrinol Baltim Md. 2012 Sep;26(9):1496–507.
188. Liu YN, Abou-Kheir W, Yin JJ, Fang L, Hynes P, Casey O, et al. Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor β-initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. Mol Cell Biol. 2012 Mar;32(5):941–53.
189. Urbanucci A, Sahu B, Seppälä J, Larjo A, Latonen LM, Waltering KK, et al. Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer. Oncogene. 2012 Apr 26;31(17):2153–63.
190. Gajula RP, Chettiar ST, Williams RD, Thiyagarajan S, Kato Y, Aziz K, et al. The twist box domain is required for Twist1-induced prostate cancer metastasis. Mol Cancer Res MCR. 2013 Nov;11(11):1387–400.
191. Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TCM, Zhou C, Zhang X, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. Cancer Res. 2005 Jun 15;65(12):5153–62.
192. Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. Histopathology. 2007 Apr;50(5):648–58.
193. Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, et al. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cancer Res. 2008 Apr 1;68(7):2479–88.
194. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellon EA, Contreras HR. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. Asian J Androl. 2018;20(3):294–9.
195. Ren D, Wang M, Guo W, Huang S, Wang Z, Zhao X, et al. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. Cell Tissue Res. 2014 Dec;358(3):763–78.
196. Putzke AP, Ventura AP, Bailey AM, Akture C, Opoku-Ansah J, Celiktaş M, et al. Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin regulation by zeb1 and SRC family kinases. Am J Pathol. 2011 Jul;179(1):400–10.
197. Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. Hum Pathol. 2017 Mar;61:26–32.
198. Anose BM, Sanders MM. Androgen Receptor Regulates Transcription of the ZEB1 Transcription Factor. Int J Endocrinol. 2011;2011:903918.
199. Miao L, Yang L, Li R, Rodrigues DN, Crespo M, Hsieh JT, et al. Disrupting Androgen Receptor Signaling Induces Snail-Mediated Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Prostate Cancer. Cancer Res. 2017 Jun 1;77(11):3101–12.
200. Mooney SM, Parsana P, Hernandez JR, Liu X, Verdone JE, Torga G, et al. The presence of androgen receptor elements regulates ZEB1 expression in the absence of androgen receptor. J Cell Biochem. 2015 Jan;116(1):115–23.
201. Li P, Wang J, Chu M, Zhang K, Yang R, Gao WQ. Zeb1 promotes androgen independence of prostate cancer via induction of stem cell-like properties. Exp Biol Med Maywood NJ. 2014 Jul;239(7):813–22.
202. Movsas B, Chapman JD, Greenberg RE, Hanlon AL, Horwitz EM, Pinover WH, et al. Increasing levels of hypoxia in prostate carcinoma correlate significantly with increasing clinical stage and patient age: an Eppendorf pO(2) study. Cancer. 2000 Nov 1;89(9):2018–24.
203. Bizzarro V, Belvedere R, Migliaro V, Romano E, Parente L, Petrella A. Hypoxia regulates ANXA1 expression to support prostate cancer cell invasion and aggressiveness. Cell Adhes Migr. 2017 May 4;11(3):247–60.
204. Tang C, Liu T, Wang K, Wang X, Xu S, He D, et al. Transcriptional regulation of

FoxM1 by HIF-1α mediates hypoxia-induced EMT in prostate cancer. Oncol Rep. 2019 Oct;42(4):1307–18.
205. Yamasaki M, Nomura T, Sato F, Mimata H. Chronic hypoxia induces androgen-independent and invasive behavior in LNCaP human prostate cancer cells. Urol Oncol. 2013 Oct;31(7):1124–31.
206. Iwasaki K, Ninomiya R, Shin T, Nomura T, Kajiwara T, Hijiya N, et al. Chronic hypoxia-induced slug promotes invasive behavior of prostate cancer cells by activating expression of ephrin-B1. Cancer Sci. 2018 Oct;109(10):3159–70.
207. Bery F, Figiel S, Kouba S, Fontaine D, Guéguinou M, Potier-Cartereau M, et al. Hypoxia Promotes Prostate Cancer Aggressiveness by Upregulating EMT-Activator Zeb1 and SK3 Channel Expression. Int J Mol Sci. 2020 Jul 6;21(13):4786.
208. Li W, Dong Y, Zhang B, Kang Y, Yang X, Wang H. PEBP4 silencing inhibits hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. 2016 Jul;81:1–6.
209. Puhr M, Hoefer J, Schäfer G, Erb HHH, Oh SJ, Klocker H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. Am J Pathol. 2012 Dec;181(6):2188–201.
210. Hanrahan K, O'Neill A, Prencipe M, Bugler J, Murphy L, Fabre A, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. Mol Oncol. 2017 Mar;11(3):251–65.
211. Ippolito L, Marini A, Cavallini L, Morandi A, Pietrovito L, Pintus G, et al. Metabolic shift toward oxidative phosphorylation in docetaxel resistant prostate cancer cells. Oncotarget. 2016 Sep 20;7(38):61890–904.
212. Jiménez N, Reig Ò, Montalbo R, Milà-Guasch M, Nadal-Dieste L, Castellano G, et al. Cell Plasticity-Related Phenotypes and Taxanes Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. Front Oncol. 2020;10:594023.
213. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellón EA, Contreras HR. The transcription factor ZEB1 promotes chemoresistance in prostate cancer cell lines. Asian J Androl. 2019;21(5):460–7.
214. Zhang G, Tian X, Li Y, Wang Z, Li X, Zhu C. miR-27b and miR-34a enhance docetaxel sensitivity of prostate cancer cells through inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition by targeting ZEB1. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. 2018 Jan;97:736–44.
215. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Res. 1995 Nov 15;55(22):5195–9.
216. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1;92(16):7416–9.
217. Li LC, Zhao H, Nakajima K, Oh BR, Ribeiro Filho LA, Carroll P, et al. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. J Urol. 2001 Aug;166(2):705–9.
218. Ke XS, Qu Y, Cheng Y, Li WC, Rotter V, Øyan AM, et al. Global profiling of histone and DNA methylation reveals epigenetic-based regulation of gene expression during epithelial to mesenchymal transition in prostate cells. BMC Genomics. 2010 Nov 25;11:669.
219. Shokraii F, Moharrami M, Motamed N, Shahhoseini M, Totonchi M, Ezzatizadeh V, et al. Histone Modification Marks Strongly Regulate CDH1 Promoter in Prostospheres as A Model of Prostate Cancer Stem Like Cells. Cell J. 2019 Jul;21(2):124–34.
220. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, et al. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. Oncogene. 2008 Dec

11;27(58):7274–84.
221. Aghdassi A, Sendler M, Guenther A, Mayerle J, Behn CO, Heidecke CD, et al. Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. Gut. 2012 Mar;61(3):439–48.
222. Roche J, Nasarre P, Gemmill R, Baldys A, Pontis J, Korch C, et al. Global Decrease of Histone H3K27 Acetylation in ZEB1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. Cancers. 2013 Apr 3;5(4):334–56.
223. Byles V, Zhu L, Lovaas JD, Chmilewski LK, Wang J, Faller DV, et al. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. Oncogene. 2012 Oct 25;31(43):4619–29.
224. Sekhon K, Bucay N, Majid S, Dahiya R, Saini S. MicroRNAs and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. Oncotarget. 2016 Oct 11;7(41):67597–611.
225. Majid S, Dar AA, Saini S, Shahryari V, Arora S, Zaman MS, et al. miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2013 Jan 1;19(1):73–84.
226. Altuna-Coy A, Ruiz-Plazas X, Sánchez-Martin S, Ascaso-Til H, Prados-Saavedra M, Alves-Santiago M, et al. The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk. BMC Med. 2022 Aug 18;20(1):255.
227. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. Am J Epidemiol. 1986 Dec;124(6):903–15.
228. Bartness TJ, Liu Y, Shrestha YB, Ryu V. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. Front Neuroendocrinol. 2014 Oct;35(4):473–93.
229. Chalmers SB, Monteith GR. ORAI channels and cancer. Cell Calcium. 2018 Sep;74:160–7.
230. Perrouin Verbe MA, Bruyere F, Rozet F, Vandier C, Fromont G. Expression of store-operated channel components in prostate cancer: the prognostic paradox. Hum Pathol. 2016 Mar;49:77–82.
231. Campedel L, Kossaï M, Blanc-Durand P, Rouprêt M, Seisen T, Compérat E, et al. [Neuroendocrine prostate cancer: Natural history, molecular features, therapeutic management and future directions]. Bull Cancer (Paris). 2017 Sep;104(9):789–99.
232. Chen J, Shi M, Chuen Choi SY, Wang Y, Lin D, Zeng H, et al. Genomic alterations in neuroendocrine prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. BJUI Compass. 2023 May;4(3):256–65.
233. Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW, et al. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. Science. 2017 Jan 6;355(6320):78–83.
234. Lin X, Lécuyer L, Liu X, Triba MN, Deschasaux-Tanguy M, Demidem A, et al. Plasma Metabolomics for Discovery of Early Metabolic Markers of Prostate Cancer Based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. Cancers. 2021 Jun 23;13(13):3140.
235. Huang YS, Huang WC, Li CW, Chuang LT. Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages. Mol Cell Biochem. 2011 Dec;358(1–2):85–94.
236. Zhang T, Guo Z, Huo X, Gong Y, Li C, Huang J, et al. Dysregulated lipid metabolism blunts the sensitivity of cancer cells to EZH2 inhibitor. EBioMedicine. 2022 Mar;77:103872.
237. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. 2002 Oct;56(8):365–79.
238. Bilodeau JF, Gevariya N, Larose J, Robitaille K, Roy J, Oger C, et al. Long chain

omega-3 fatty acids and their oxidized metabolites are associated with reduced prostate tumor growth. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2021 Jan;164:102215.
239. Gevariya N, Besançon M, Robitaille K, Picard V, Diabaté L, Alesawi A, et al. Omega-3 fatty acids decrease prostate cancer progression associated with an anti-tumor immune response in eugonadal and castrated mice. The Prostate. 2019 Jan;79(1):9–20.
240. Gevariya N, Lachance G, Robitaille K, Joly Beauparlant C, Beaudoin L, Fournier É, et al. Omega-3 Eicosapentaenoic Acid Reduces Prostate Tumor Vascularity. Mol Cancer Res MCR. 2021 Mar;19(3):516–27.
241. Liang P, Henning SM, Guan J, Grogan T, Elashoff D, Olefsky JM, et al. Role of Host GPR120 in Mediating Dietary Omega-3 Fatty Acid Inhibition of Prostate Cancer. J Natl Cancer Inst. 2019 Jan 1;111(1):52–9.
242. Liang P, Henning SM, Schokrpur S, Wu L, Doan N, Said J, et al. Effect of Dietary Omega-3 Fatty Acids on Tumor-Associated Macrophages and Prostate Cancer Progression. The Prostate. 2016 Oct;76(14):1293–302.
243. Czumaj A, Śledziński T. Biological Role of Unsaturated Fatty Acid Desaturases in Health and Disease. Nutrients. 2020 Jan 29;12(2):356.
244. Aronson WJ, Kobayashi N, Barnard RJ, Henning S, Huang M, Jardack PM, et al. Phase II prospective randomized trial of a low-fat diet with fish oil supplementation in men undergoing radical prostatectomy. Cancer Prev Res Phila Pa. 2011 Dec;4(12):2062–71.
245. Demark-Wahnefried W, Polascik TJ, George SL, Switzer BR, Madden JF, Ruffin MT, et al. Flaxseed supplementation (not dietary fat restriction) reduces prostate cancer proliferation rates in men presurgery. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 2008 Dec;17(12):3577–87.
246. Guertin MH, Robitaille K, Pelletier JF, Duchesne T, Julien P, Savard J, et al. Effects of concentrated long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation before radical prostatectomy on prostate cancer proliferation, inflammation, and quality of life: study protocol for a phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. BMC Cancer. 2018 Jan 10;18(1):64.
247. Moussa H, Robitaille K, Pelletier JF, Tourigny R, Fradet Y, Lacombe L, et al. Effects of Concentrated Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Quality of Life after Radical Prostatectomy: A Phase II Randomized Placebo-Controlled Trial (RCT-EPA). Nutrients. 2023 Mar 11;15(6):1369.
248. Cruz ALS, Barreto E de A, Fazolini NPB, Viola JPB, Bozza PT. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. Cell Death Dis. 2020 Feb 6;11(2):105.
249. Corbet C, Bastien E, Santiago de Jesus JP, Dierge E, Martherus R, Vander Linden C, et al. TGFβ2-induced formation of lipid droplets supports acidosis-driven EMT and the metastatic spreading of cancer cells. Nat Commun. 2020 Jan 23;11(1):454.
250. Fontaine A, Bellanger D, Guibon R, Bruyère F, Brisson L, Fromont G. Lipophagy and prostate cancer: association with disease aggressiveness and proximity to periprostatic adipose tissue. J Pathol. 2021 Oct;255(2):166–76.
251. Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song B, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. Cell Metab. 2014 Mar 4;19(3):393–406.
252. Low JY, Brennen WN, Meeker AK, Ikonen E, Simons BW, Laiho M. Stromal CAVIN1 Controls Prostate Cancer Microenvironment and Metastasis by Modulating Lipid Distribution and Inflammatory Signaling. Mol Cancer Res MCR. 2020 Sep;18(9):1414–26.
253. Hayden A, Johnson PWM, Packham G, Crabb SJ. S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. Breast Cancer Res Treat. 2011 May;127(1):109–19.

254. Kaini RR, Sillerud LO, Zhaorigetu S, Hu CAA. Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells. The Prostate. 2012 Sep 15;72(13):1412–22.
255. Donato DP, Johnson MT, Yang XJ, Zynger DL. Expression of carbonic anhydrase IX in genitourinary and adrenal tumours. Histopathology. 2011 Dec;59(6):1229–39.
256. Jędroszka D, Orzechowska M, Hamouz R, Górniak K, Bednarek AK. Markers of epithelial-to-mesenchymal transition reflect tumor biology according to patient age and Gleason score in prostate cancer. PloS One. 2017;12(12):e0188842.
257. Mazaki-Tovi M, Bolin SR, Schenck PA. Adipokines secretion in feline primary adipose tissue culture in response to dietary fatty acids. BMC Vet Res. 2019 Sep 6;15(1):324.
258. Frieling JS, Li T, Tauro M, Lynch CC. Prostate cancer-derived MMP-3 controls intrinsic cell growth and extrinsic angiogenesis. Neoplasia N Y N. 2020 Oct;22(10):511–21.
259. Zeng J, Zhang J, Sun Y, Wang J, Ren C, Banerjee S, et al. Targeting EZH2 for cancer therapy: From current progress to novel strategies. Eur J Med Chem. 2022 Aug 5;238:114419.

## Annexe 1 : Analyses du RNA-seq

Gènes dont l'expression a été le plus modifiée entre le groupe contrôle et le groupe EPA, pour les échantillons analysés par RNA-seq, la différence est exprimée en log2 fold change. Ces analyses ont été réalisées avec RStudio.

La figure 19 montre les 10 gènes dont l'expression a été le plus modifiée entre les deux groupes, en prenant pour seuil de log2(fold change) : < -1 et > 1. En bleu, ce sont les gènes dont l'expression a diminué dans le groupe EPA par rapport au groupe contrôle. En rouge, ceux dont l'expression a augmenté.
Les points plus fortement colorés sont ceux dont la modification est notable, et le nom des gènes concernés a alors été précisé. En bleu : KlK7 (Kallikrein-related peptidase 7), Fgfbp1 (Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1), Spon2 (Spondine 2), Arhgap32 (Rho GTPase Activating Protein 32), Lmo7 (LIM Domain 7), Kr15 (Keratin 15). En rouge : deux immunoglobulines (Igkv3-4, Ighv1-26), Mup3 (major urinary protein 3 fixant les phéromones), Klrb1b (Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily BMember 1B)

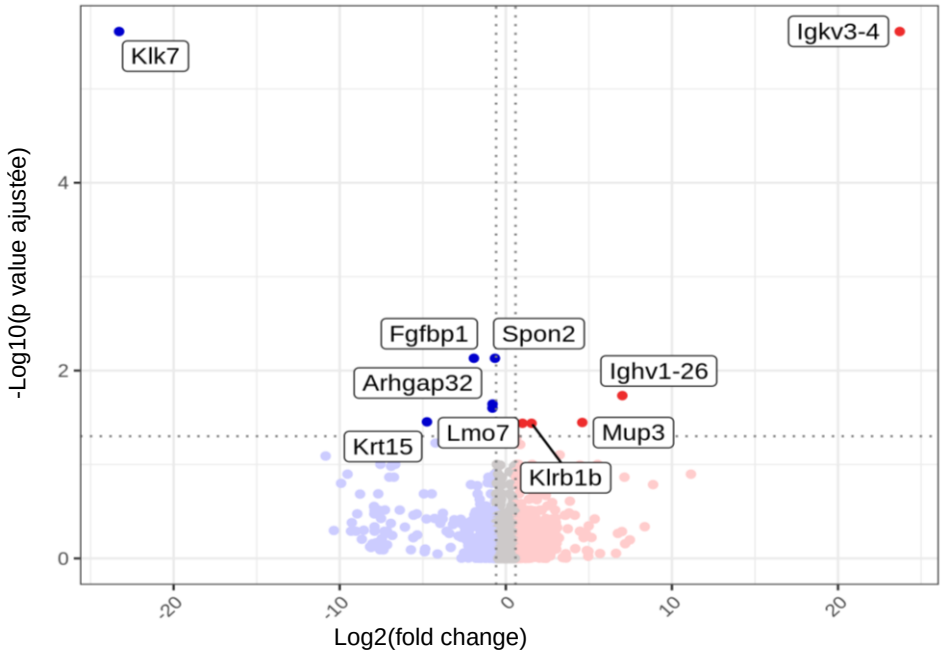



Figure 27 : Volcano plot selon la modulation de l'expression par l'EPA des différents gènes identifiés par RNA-seq

Nous avons ensuite recherché les 10 gènes dont l'expression était le plus diminuée dans le groupe EPA, en log2(fold change). Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Liste des 10 gènes dont l'expression était le plus diminuée par l'EPA

| Gene | Log2(FC) | Counts | Gene ID | p aj | Nom |
|---|---|---|---|---|---|
| Klk7 | -23,3 | 47,1 | ENSMUSG00000030713 | **$2{,}45.10^{-6}$** | kallikrein related-peptidase 7 |
| Krt6a | -10,8 | 274 | ENSMUSG00000058354 | 0,081 | keratin 6A |
| Calm4 | -10,4 | 210 | ENSMUSG00000033765 | 0,504 | calmodulin 4 |
| Cstdc5 | -9,92 | 326 | ENSMUSG00000071561 | 0,159 | cystatin domain containing 5 |
| Krt5 | -9,53 | 368 | ENSMUSG00000061527 | 0,127 | keratin 5 |
| Rptn | -9,32 | 45,6 | ENSMUSG00000041984 | 0,513 | repetin |
| Dsg1a | -9,27 | 52 | ENSMUSG00000069441 | 0,416 | desmoglein 1α |
| Krt1 | -9,03 | 285 | ENSMUSG00000046834 | 0,513 | keratin 1 |
| Stfa3 | -8,94 | 92,8 | ENSMUSG00000054905 | 0,335 | stefin A3 |
| Serpina3j | -8,77 | 26,8 | ENSMUSG00000079013 | 0,207 | serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (α-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3J |

*Abréviations : FC : fold change. Counts représente la moyenne normalisée des counts des 6 échantillons. p aj = p-value ajusté.*

Parmi les 10 gènes les plus diminués, nous avons noté la présence de trois kératines basales (Krt6a, Krt5 et Krt1). Nous avons donc fait une analyse ciblée sur les kératines qui présentaient un log2 (fold change) <-2 ou >2 (voir tableau 13). Nous avons donc identifié 13 kératines diminuées par le régime EPA. Par ailleurs aucune kératine n'a présenté d'augmentation d'expression.

Tableau 13 : Liste des kératines dont l'expression était la plus modifiée par l'EPA

| Gene | Log2(FC) | Counts | Gene ID | p aj | Nom |
|---|---|---|---|---|---|
| Krt6a | -10,8 | 274 | ENSMUSG00000058354 | 0,081 | keratin 6A |
| Krt5 | -9,53 | 368 | ENSMUSG00000061527 | 0,127 | keratin 5 |
| Krt1 | -9,03 | 285 | ENSMUSG00000046834 | 0,513 | keratin 1 |
| Krt6b | -8,31 | 282 | ENSMUSG00000023041 | ND | keratin 6B |
| Krt16 | -7,67 | 185 | ENSMUSG00000053797 | 0,306 | keratin 16 |
| Krt17 | -6,39 | 103 | ENSMUSG00000035557 | 0,306 | keratin 17 |
| Krtdap | -6,07 | 107 | ENSMUSG00000074199 | 0,464 | keratinocyte differentiation associated protein |
| Krt79 | -5,33 | 99,9 | ENSMUSG00000061397 | 0,562 | keratin 79 |
| Kprp | -4,85 | 20,2 | ENSMUSG00000059832 | 0,794 | keratinocyte expressed, proline-rich |
| Krt15 | -4,75 | 21,6 | ENSMUSG00000054146 | **0,035** | keratin 15 |
| Krt78 | -2,6 | 6,91 | ENSMUSG00000050463 | ND | keratin 78 |
| Krt23 | -2,2 | 7,52 | ENSMUSG00000006777 | ND | keratin 23 |
| Krt10 | -2,06 | 303 | ENSMUSG00000019761 | 0,398 | keratin 10 |

*Abréviations : FC : fold change. Counts représente la moyenne normalisée des counts des 6 échantillons. p aj = p-value ajusté. ND = non disponible.*

De façon similaire, nous avons également recherché les 10 gènes dont l'expression était le plus augmentée dans le groupe EPA, en log2(fold change). Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Liste des 10 gènes dont l'expression était le plus augmentée par l'EPA

| **Gene** | **Log2(FC)** | **Counts** | **Gene ID** | **p aj** | |
|---|---|---|---|---|---|
| Igkv3-4 | 23,7 | 644 | ENSMUSG00000096715 | **$2{,}45.10^{-6}$** | immunoglobulin kappa variable 3-4 |
| Igkv3-1 | 11,9 | 526 | ENSMUSG00000095682 | ND | immunoglobulin kappa variable 3-1 |
| Ighv1-72 | 11,6 | 269 | ENSMUSG00000096074 | ND | immunoglobulin heavy variable 1-72 |
| Ighv8-12 | 11,1 | 267 | ENSMUSG00000076731 | 0,127 | immunoglobulin heavy variable V8-12 |
| Igkv12-41 | 9,31 | 230 | ENSMUSG00000095007 | ND | immunoglobulin kappa chain variable 12-41 |
| Igkv6-23 | 8,87 | 25,1 | ENSMUSG00000095630 | 0,164 | immunoglobulin kappa variable 6-23 |
| Ighv1-18 | 8,36 | 63,5 | ENSMUSG00000076695 | 0,459 | immunoglobulin heavy variable V1-18 |
| Ighv1-82 | 7,85 | 295 | ENSMUSG00000095127 | ND | immunoglobulin heavy variable 1-82 |
| Chil3 | 7,73 | 4910 | ENSMUSG00000040809 | ND | chitinase-like 3 |
| Igkv4-72 | 7,47 | 21,2 | ENSMUSG00000076545 | 0,634 | immunoglobulin kappa chain variable 4-72 |

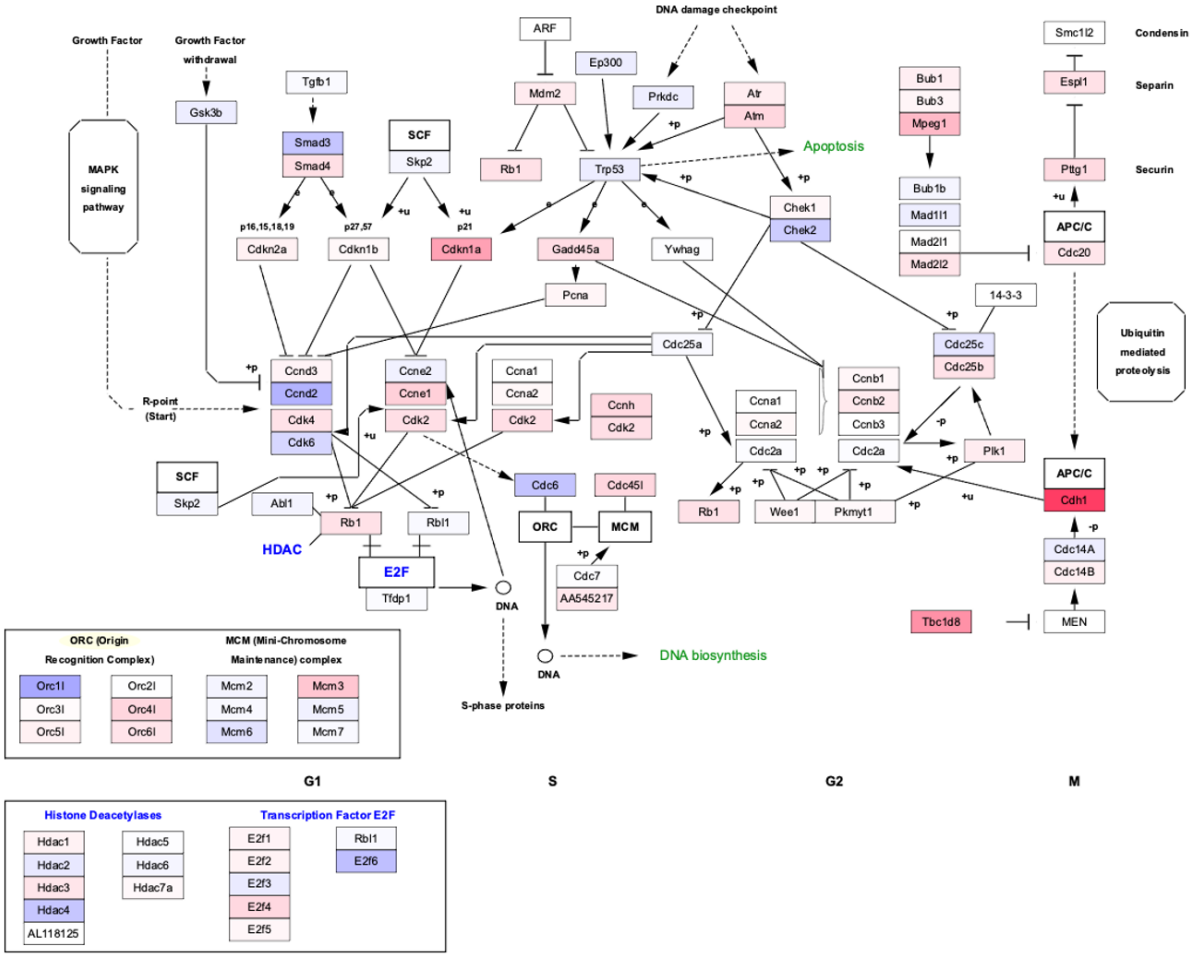
*Abréviations : FC : fold change. Counts représente la moyenne normalisée des counts des 6 échantillons. p aj = p-value ajusté. ND = non disponible.*

## Annexe 2 : Analyses complémentaires du RNA-seq par Cytoscape

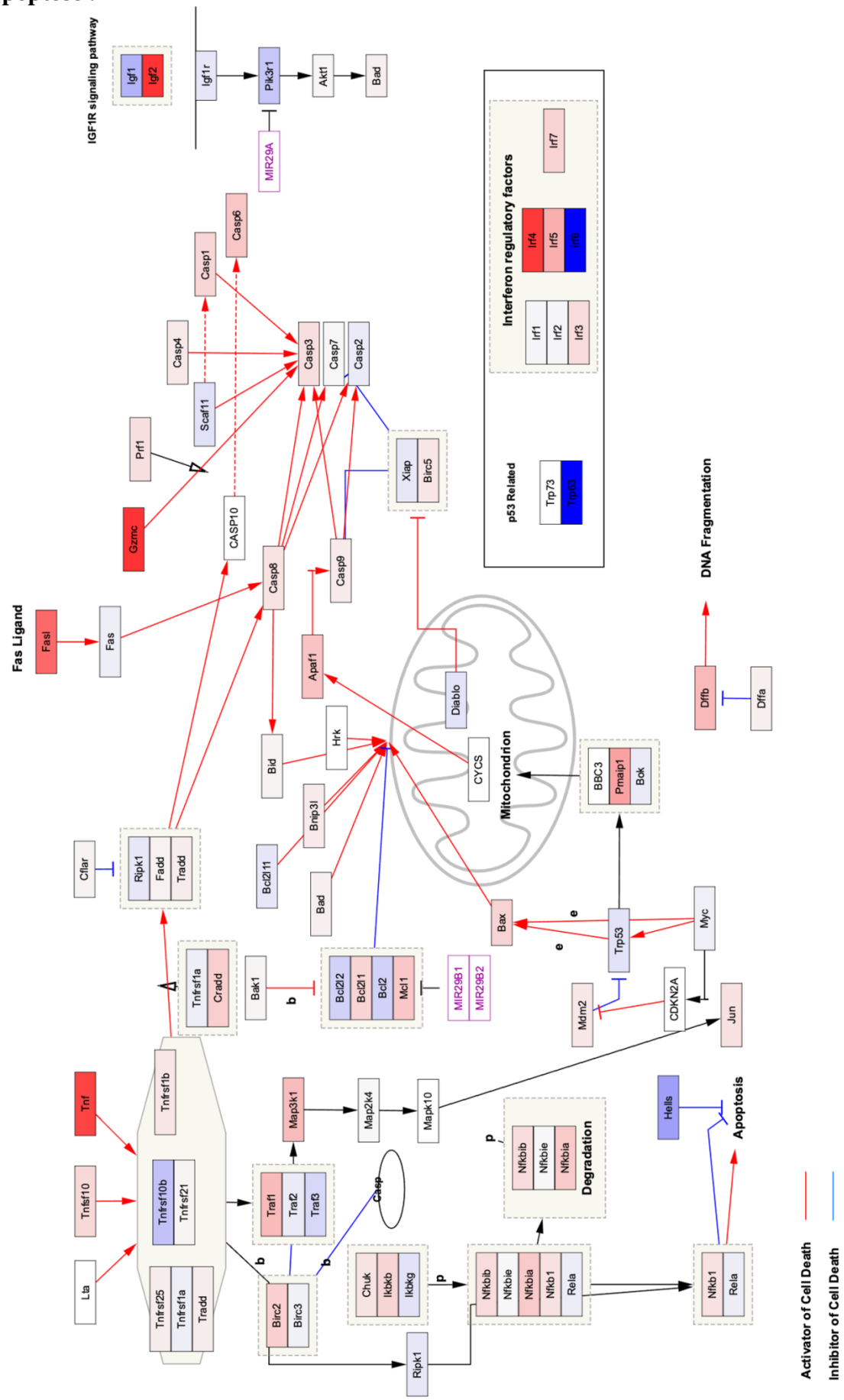
Analyse de différentes voies de signalisation cellulaire réalisée à l'aide de Cytoscape, pour les gènes de la souris (*mus musculus*). Sauf mention contraire, nous avons utilisé les wikipathways pré-existants.

Chaque gène est plus ou moins fortement coloré en fonction de la différence d'expression du gène considéré entre le groupe EPA et le groupe contrôle, cette différence est exprimée en log2 fold change. Quand le log2 fold change est >1, le gène est coloré en rouge et cela signifie que le gène est davantage exprimé dans le groupe EPA, quand le log2 fold change est < -1, le gène est coloré en bleu et cela signifie que le gène est moins exprimé dans le groupe EPA.

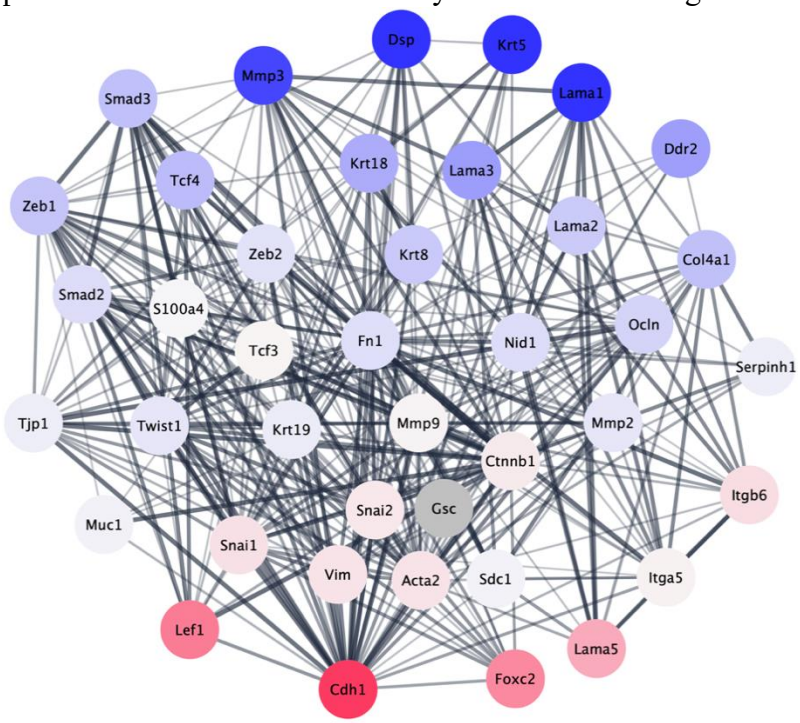
**Cycle cellulaire :**



**Apoptose :**


IGF1R signaling pathway
Igf1
Igf2
Igf1r
Pik3r1
Akt1
Bad
MIR29A
Interferon regulatory factors
Irf7
Irf4
Irf5
Irf6
Irf1
Irf2
Irf3
p53 Related
Trp73
Trp63
Casp6
Casp1
Casp4
Scaf11
Casp3
Casp7
Casp2
Prf1
Gzmc
Xiap
Birc5
CASP10
Casp8
Casp9
Fas Ligand
Fasl
Fas
Apaf1
Diablo
DNA Fragmentation
Dffb
Dffa
Bid
Hrk
CYCS
Mitochondrion
BBC3
Pmaip1
Bok
Bnip3l
Bcl2l11
Bad
Cflar
Ripk1
Fadd
Tradd
Bax
Trp53
Myc
Tnfrsf1a
Cradd
Bak1
Bcl2l2
Bcl2l1
Bcl2
Mcl1
MIR29B1
MIR29B2
Mdm2
CDKN2A
Jun
Tnf
Tnfsf10
Lta
Tnfrsf1b
Tnfrsf10b
Tnfrsf21
Tnfrsf25
Tnfrsf1a
Tradd
Map3k1
Map2k4
Mapk10
Traf1
Traf2
Traf3
Casp
Birc2
Birc3
Chuk
Ikbkb
Ikbkg
Ripk1
Nfkbib
Nfkbie
Nfkbia
Nfkb1
Rela
Degradation
Hells
Apoptosis
Activator of Cell Death
Inhibitor of Cell Death

**TEM :** En l'absence de pathway pré-établi, pour la TEM nous avons défini une liste des 40 gènes les plus susceptibles d'interagir avec Zeb1 et donc pouvant influencer la TEM. Nous présentons ici le résultat de l'analyse de ce réseau de gènes.



# Mathilde CANCEL

Influences de la pression thérapeutique et du micro-environnement adipeux dans l'agressivité du cancer de prostate

Résumé en français :
Le cancer de prostate (CaP) est une maladie hétérogène en termes d'agressivité. Nous nous sommes intéressés au rôle du microenvironnement adipeux (tissu adipeux périprostatique ou TAPP) sur l'agressivité du CaP localisé. Au stade métastatique, nous avons recherché des marqueurs pronostiques des CaP neuroendocrines (CPNE). Sur une cohorte de 30 CPNE, l'expression du « thyroid transcription factor 1 » (TTF1) était corrélée à la perte d'expression de gènes régulés par le récepteur aux androgènes et à des marqueurs d'agressivité du CaP. En analyse multivariée pour la survie globale, seul TTF1 était pronostique. Nous avons ensuite étudié à l'influence du TAPP sur l'agressivité du CaP. Parmi 59 CaP pT3 analysés, l'expression de Ki67 et Zeb1 était augmentée en extra-prostatique (au contact avec le TAPP) par rapport aux zones intra-prostatiques. Sur un modèle de co-cultures in vitro, entre lignées cellulaires de CaP et adipocytes isolés de TAPP de patients avec un CaP, nous avons observé une augmentation de Ki67 et Zeb1 dans les cellules cancéreuses, mais seulement pour les TAPP des CaP les plus agressifs. Après analyse de la composition en acides gras du TAPP, le taux de prolifération des PC3 était corrélé au taux d'acide eicosadiénoïque, et inversement corrélé au taux d'acide eicosapentaénoïque (EPA). Sur un modèle de xénogreffes de CaP, une alimentation enrichie en EPA ralentissait la croissance tumorale. Nous avons ensuite réalisé des co-cultures avec du tissu adipeux (TA) murin, qui ont montré une diminution de la prolifération des PC3 pour les TA enrichis en EPA. Nous avons également observé une forte diminution de l'anhydrase carbonique 9 et de Zeb1 sous conditions hypoxiques après co-culture avec les TA enrichis en EPA. En conclusion, au stade métastatique, TTF1 serait pronostique dans les CNPE. Au stade localisé, nos résultats suggèrent un effet pro ou anti-tumoral du TAPP dépendant de sa composition lipidique, et notamment de sa teneur en EPA.

Mots clés : cancer de prostate, transdifférenciation neuroendocrine, tissu adipeux, EPA

Summary:
Prostate cancer (PCa) aggressiveness is highly heterogeneous. We focused on the role of adipose microenvironment (from the periprostatic adipose tissue, PPAT) in localized PCa aggressiveness. In the metastatic setting, we searched for prognostic factors in neuroendocrine prostate cancer (NEPC).
In 30 NEPC samples, « thyroid transcription factor 1 » (TTF1) staining correlated with loss of expression of androgen receptor regulated genes and with markers of PCa aggressiveness. In multivariate analysis, only TTF1 expression was significantly associated with shorter overall survival. Then we studied the role of PPAT on tumor aggressiveness. With 59 pT3 PCa, Ki67 and Zeb1 were more expressed in the extra-prostatic contingent (in close contact with PPAT) compared to their intra-prostatic foci. With co-cultures between PCa cell lines and the lipidic fraction of PPAT (collected from PCa patients), Ki67 and Zeb1 expressions were increased in cancer cells, yet only with PPAT from the more aggressive PCa. We also assessed that PC3 proliferation rate correlated with low eicosapentaenoic acid (EPA), and high eicosadienoic acid content. On a murine PCa xenograft model, we observed a slower tumoral growth when mice were fed with a diet enriched in EPA. Then, in vitro, co-cultures with murine adipose tissue (AT) led to decrease PC3 cell proliferation when AT was EPA enriched. We also observed an important decrease of anhydrase carbonic 9 and Zeb1 expressions under hypoxia when cells were co-cultured with EPA enriched AT. In conclusion, in the metastatic setting, we identified a prognostic role of TTF1 in NEPC, on overall survival. In the localized setting, our results suggest that PPAT may have pro- or anti-tumoral effects on PCa depending on its fatty acid composition, particularly the EPA content.

Keywords: prostate cancer, neuroendocrine transdifferenciation, adipose tissue, EPA