

Année 2019/2020

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Alix FONTAINE

Née le 11/01/1990 à Calais (62)

LIPOPHAGIE ET CANCER DE LA PROSTATE.

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2020 devant un jury composé de :

Président du Jury :

- Professeur Claude LINASSIER, Oncologie Médicale, Faculté de Médecine – Tours.

Membres du Jury :

- Professeur Gaëlle FROMONT, Anatomie et Cytologie Pathologique, Faculté de Médecine – Tours
- Professeur DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague, Anatomie et Cytologie Pathologique, Faculté de Médecine – Tours
- Professeur Franck BRUYERE, Urologie, Faculté de Médecine – Tours
- Docteur Lucie BRISSON, Unité Inserm U1069 (N2C) – Tours

Directeur de thèse : Professeur Gaëlle FROMONT, Anatomie et Cytologie Pathologique, Faculté de Médecine – Tours

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOUREC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr André GOUAZE (†) - 1972-1994
Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON
Pr Gilles BODY
Pr Jacques CHANDENIER
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Philippe COLOMBAT
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Pascal DUMONT
Pr. Dominique GOGA
Pr Gérard LORETTE
Pr Dominique PERROTIN
Pr Roland QUENTIN

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – P. COSNAY – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – E. LEMARIE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis.....	Cardiologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BAKHOS David	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora.....	Pharmacologie clinique
BERHOUEZ Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne.....	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BOURIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand.....	Neurologie
DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe.....	Anatomie
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Réanimation
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FAVARD Luc.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice.....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine.....	Médecine intensive - réanimation
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologique
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier	Urologie
HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier.....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis.....	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
LABARTHE François.....	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénérologie
MAILLOT François	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique

MARUANI Annabel	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain.....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry.....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck.....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe.....	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab.....	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre.....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc.....	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane.....	Anatomie
VOURC'H Patrick.....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé.....	Immunologie
ZEMMOURA Ilyes	Neurochirurgie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien
 Soins palliatifs || POTIER Alain | Médecine Générale |
| ROBERT Jean..... | Médecine Générale |

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine..... Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AUDEMARD-VERGER Alexandra.....	Médecine interne
BARBIER Louise	Chirurgie digestive
BINET Aurélien.....	Chirurgie infantile
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès.....	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DENIS Frédéric	Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane.....	Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure	Hépatologie – gastroentérologie
FAVRAIS Géraldine.....	Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologique
GATAULT Philippe	Néphrologie
GOUILLEUX Valérie.....	Immunologie
GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie

LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno	Pédiatrie
LEGRAS Antoine.....	Chirurgie thoracique
LEMAIGNEN Adrien	Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologique
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....	Médecine légale
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte	Thérapeutique
TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
NICOGLOU Antonine	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BARBEAU Ludivine	Médecine générale
RUIZ Christophe.....	Médecine Générale
SAMKO Boris	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE Claire	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....	Praticien Hospitalier

Pour l'Ecole d'Orthoptie

MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier
----------------------	-----------------------

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice.....	Praticien Hospitalier
-----------------------	-----------------------

REMERCIEMENTS :

À ma directrice de thèse, Madame le Professeur Gaëlle Fromont-Hankard,

Vous m'avez fait l'honneur de me proposer et de diriger ce travail de thèse. Soyez assurée de ma plus profonde gratitude et de mes plus sincères remerciements. Je vous remercie de la qualité de votre enseignement, de votre rigueur scientifique et des moyens de formation mis à ma disposition. Pour avoir cru en moi, soyez assurée de mon plus profond respect et de ma très grande reconnaissance.

À mon Président de jury de thèse, Monsieur le Professeur Claude Linassier,

Je suis honorée par l'intérêt que vous portez à ce travail et je suis heureuse que vous ayez accepté avec enthousiasme de juger mon travail.

À Madame le Docteur Lucie Brisson,

J'ai été honorée de pouvoir travailler à vos côtés. Ce fut un réel plaisir. Vos connaissances et compétences sur le sujet ainsi que votre rigueur scientifique sont des sources d'inspiration. Je vous suis également très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail.

À Monsieur le Professeur Franck Bruyère,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. La collaboration entre chirurgiens, pathologistes et scientifiques est à la base de ce projet. Je vous remercie, vous et l'ensemble de l'équipe d'urologie, d'y avoir participé. Soyez assuré de mon respect et de ma reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Gonzague du Bouexic de Pinieux,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect. Je vous suis reconnaissante de nous avoir enseigné la pathologie avec bienveillance. Apprendre à vos côtés fut un réel plaisir.

À Monsieur le Professeur Serge Guyétant,

Je vous suis reconnaissante de nous avoir enseigné la pathologie avec indulgence et patience. Je vous remercie d'avoir coordonné notre enseignement de DES avec rigueur. Votre implication dans notre formation est exemplaire. Je vous suis reconnaissante d'être à notre écoute et toujours bienveillant. Veuillez recevoir ici, le témoignage de mon plus profond respect.

Aux médecins anatomo-pathologistes du CHU de Tours, du CHRO d'Orléans et du CH de Bourges,

Je vous suis reconnaissante de m'avoir enseignée avec patience et bienveillance cette spécialité passionnante. Vous avez su partager vos connaissances et m'avez prodigué au quotidien de nombreux conseils, chacun(e) à votre manière. Vous m'avez guidée vers la bonne direction. Vous avez été mes boussoles, mes sextants et mes compas dans cet océan de connaissances à parcourir. Je vous remercie pour cela.

À Roseline et Dorine,

Merci pour vos travaux, votre implication et votre motivation dans ce travail de thèse. Ce fut un réel plaisir de collaborer avec vous.

Aux équipes techniques et secrétariats des services d'anatomie pathologique de Bretonneau et Trousseau,

MERCI d'avoir été là, avec vos sourires, vos mots, vos gestes, vos encouragements. Mais aussi votre bienveillance et patience à me réexpliquer les demandes de techniques, les manip' DIAMIC, la tumorothèque, la taille des cassettes, les ... BREF. Vous êtes exemplaires, de véritables guides ayant contribué à la réussite de mon internat. Le quotidien fut plus ensoleillé grâce à vous. Merci du fond du cœur.

Aux services de neurologie du CH de Blois et d'hématologie-oncologie du CH de Bourges,

Merci de m'avoir accueillie. Ces semestres resteront de bons souvenirs de mon internat.

À tous mes co-internes : Damien, Thibault, Claire, Matthias, Adrien, Myriam, Lila, William, JB, Simon, Aymeric, Mélanie et Soum,

Vous avez été des compagnons d'internat formidables. Merci pour votre bonne humeur quotidienne, les arrangements de planning, le soutien moral, les sorties, les cas partagés et toutes ces petites choses qui, misent bout à bout, ont fait de mon internat une aventure extraordinaire.

À mes compagnons et amis de l'externat,

Zazou, Farah, Stéphanie, Céline, Alexandra, Elian, Anton, Amélie, Sanaa, Stephen, Thib', Max' et toute la communauté Mauricienne de Châtelet avec l'Amiral Vicky, Riz', Yecha et Frédérique. Durant cet externat à Lille et ces 7 années de cours, de ronéos, de soirées, de stages, de gardes, de stress, de révisions, de BU, vous avez été là. Merci pour vos rires, votre soutien et vos conseils.

À mes amis de l'internat,

Toute l'équipe de Bourges (la ville, je précise) ! Et très particulièrement à Mathieu & Charlotte, Damien & Mélanie, Mélo & Gaby, Martha & Nico et Elodie : merci !!! Je vous remercie d'avoir toléré chaque jour mes idioties et mes folies ! Sans vous je ne serai pas la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir aidé, fait grandir et atteindre le sommet des bonheurs simples : un verre, un jeu, un repas, un moment ensemble. Tout simplement.

À ma Marraine et Tonton Philippe que j'aime si fort,

Marraine et Tonton, merci pour tout. Et encore tout ce n'est pas assez. Je vous suis reconnaissante de m'avoir rassurée et encouragée, de m'avoir accueillie durant de longues périodes de révision. Je vous remercie d'avoir été là, tout au long de ce périple. Vous avez soufflé dans mes voiles pour me faire avancer malgré la houle et les bancs de sable.

À mes cousins de Belgique et de Limoges,

Je vous remercie pour vos conseils, votre soutien, et malgré la distance qui nous sépare, je vous porte précieusement dans mon cœur.

À ma belle et grande Fratrie « SALMACADI »,

Mes moteurs, mes piliers, mes racines. Je vous aime et vous remercie d'avoir subi mes humeurs aussi changeantes que le ciel du Nord. Nord que j'ai quitté, à regret, pour pouvoir constater qu'un temps ensoleillé et sans vent pendant plus d'une semaine ça existe ! Mais en réalité, mes plus beaux soleils, c'est vous : Samuel, Margaux, Cassandre, et Diane. Je vous aime !

À ma Maman,

J'espère que ce travail te rendra fière. Tu m'as tenue la main pour mon premier jour d'école, et voici enfin le dernier. Cela aura duré 27 ans, où tu étais là, à m'aider à faire mes devoirs, à m'apprendre à lire et à écrire, puis à bien prononcer les mots en anglais, en allemand. Tu m'as relevée au plus bas, tu m'as soutenue et tu m'as appris à me battre et surtout à battre de mes propres ailes. Tu nous offres les moments les plus précieux en famille. Merci pour ton Amour. Merci pour Tout. Je t'aime.

Au passé,

À Pom, à Papy et Tonton Marc.

Au futur,

À Anna-Chloé, merci pour ton soutien inconditionnel tout au long de ce travail. Place désormais à nos beaux projets !

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et
de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à
corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je
rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes
promesses. Que je sois
couvert d'opprobre et
méprisé de mes confrères
si j'y manque.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS :	12
1. INTRODUCTION	15
1.1. Le cancer de la prostate	15
1.1.1. Généralités.....	15
1.1.2. Prise en charge	17
1.2. Tissu adipeux périprostatique et cancer de prostate.....	23
1.2.1. Le TAPP, une source d'hormones.....	24
1.2.2. Le TAPP, une source de facteurs de croissance.....	24
1.2.3. Le TAPP, une source de lipides	24
1.3. Les lipides, l'énergie des cellules du CaP	25
1.3.1. Les sources de lipides.....	25
1.3.2. La lipolyse	28
2. OBJECTIFS	32
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
3.1. Patients et tissus	33
3.1.1. Prélèvements fixés.....	33
3.1.2. Prélèvements congelés	34
3.1.3. Caractéristiques des CaP correspondant aux tissus adipeux périprostatiques (TAPP) utilisés en co-culture.....	35
3.2. TMA et immunohistochimie	36
3.2.1. Technique	36
3.2.2. Marquage immunohistochimique.....	37
3.3. Rouge à l'huile :	39
3.4. Co-culture d'adipocytes et de cellules carcinomateuses de prostate.....	40
3.4.1. Isolement d'adipocytes à partir de tissu adipeux périprostatique et co-culture .	40
3.4.2. Lignées carcinomateuses prostatiques	40
3.4.3. Etude du flux autophagique, lipophagique et de la prolifération	41
3.5. Analyses statistiques :	43
4. RÉSULTATS	44
4.1. Expression tumorale des marqueurs de l'autophagie et des GL	44

4.1.1.	Expression intraprostatique des marqueurs de l'autophagie et des GL dans la cohorte des CaP pT2/pT3 (N=314).....	44
4.1.2.	Corrélation entre eux des marqueurs de l'autophagie et des GL des CaP des cohortes pT2/pT3 (N=314) et pT3 (N=123).....	44
4.2.	Corrélation des marqueurs de l'autophagie et des GL avec les marqueurs d'agressivité des CaP et l'expression du RA.....	45
4.2.1.	Corrélation des marqueurs de l'autophagie et des GL avec les marqueurs d'agressivité des CaP	45
4.2.2.	Evaluation des GL sur coupes de CaP congelés et corrélation avec les marqueurs d'agressivité	47
4.3.	Corrélation des marqueurs de l'autophagie et des GL avec l'expression du récepteur aux androgènes (RA)	49
4.4.	Comparaison de l'expression intra et extraprostatique des marqueurs de l'autophagie et des GL des CaP de la cohorte pT3.....	50
4.5.	Co-cultures	52
4.5.1.	Corrélations entre eux des marqueurs de l'autophagie et des GL <i>in vitro</i> en présence d'adipocytes	52
4.5.2.	Influence de la présence d'adipocytes du TAPP sur l'autophagie dans des lignées de CaP.....	52
4.5.3.	Influence de la présence d'adipocytes du TAPP sur la lipophagie et l'agressivité des lignées de CaP	54
5.	DISCUSSION	56
6.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	60
	BIBLIOGRAPHIE	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

Ac : Anticorps	MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
ACAT : Acyl-coA Cholesterol Acyltransférase	TEP-scan : Tomographie par Emission de Positons
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	PBS : Phosphate buffered saline
ACLY : ATP Citrate Lyase	PI3K/AKT : Phosphoinositide 3-kinase/ Ak strain transforming
AG : Acides Gras	PINHG : Néoplasie intra-épithéliale prostatique de haut grade
Atg15 : Autophagy-related protein 15	PIRADS : Prostate Imaging Reporting and Data System
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase	PLIN : Périlipine
AUP1 : Ancient ubiquitous protein 1	PPAR γ : récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
BRCA1 : Breast Cancer 1	PPT1 : Palmitoyl-protein thioesterase 1
CaP : Cancer de la Prostate	PSA : Prostatic Specific Antigen
CE : Esters de Cholestérol	pTNM : Stade pathologique
cTNM : stade clinique	RA : Récepteur aux androgènes
DAB : 3,3'-Diaminobenzidine	RE : Réticulum endoplasmique
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène
DAG : Diacylglycérol	RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
DAGT : Diacylglycerol Acyltransferase	SCD1 : Stearoyl-CoA désaturase 1
DQ-BSA : Dye Quenched-Bovine Serum Albumin	SDS : Sodium dodecyl sulfate
EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique	SQSTM1 : Sequestosome 1
EGTA : Egtazic Acid	SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
FASN : Fatty Acid Synthase	TA : Tissu Adipeux
FDG : Fluorodéoxyglucose	TAPP : Tissu adipeux périprostatique
GL : Gouttelettes Lipidiques	TG : Triglycérides
HES : Hématoxyline-Eosine-Safran	TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
HRP : Horseradish peroxidase	TGF beta : Transforming Growth Factor beta
HSL : Lipase hormono-sensible	TMA : Tissu Microarray
HT : Huntingtin	TR : Toucher Rectal
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique	TTPBS : Tween 20 + Tris-buffered saline
ISUP : International Society of Urological Pathology	UBE2G2 : Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 G2
Ki67 : Index de prolifération	Zeb1 : Zinc finger E-box-binding homeobox 1
LAL : Lipases lysosomales acides	
LC3: Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3	
LDL : Low Density Lipoprotein	
MAG : Monoacylglycérol	
MAGL : Monoacylglycérol lipase	

LIPOPHAGIE ET CANCER DE LA PROSTATE

Résumé

Introduction : La progression du cancer de prostate (CaP) est marquée par l'infiltration du tissu adipeux périprostatique (TAPP), constitué d'adipocytes, par les cellules tumorales. La lipophagie, autophagie spécifique de lipides, pourrait permettre d'approvisionner ces cellules en énergie et favoriser leur progression. L'objectif est d'identifier des marqueurs de lipophagie dans le CaP, de les corrélérer aux marqueurs d'agressivité et d'évaluer l'influence des adipocytes du TAPP sur la lipophagie.

Matériel-Méthodes : Nous avons analysé par immunohistochimie sur un total de 438 CaP l'expression de marqueurs de l'autophagie (p62, LC3), des gouttelettes lipidiques (GL)(PLIN), du récepteur aux androgènes (RA), de prolifération (Ki67) et de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zeb1). Les GL ont également été évaluées par l'huile rouge sur coupes congelées. Des co-cultures d'adipocytes et de lignées de CaP ont recherché l'influence du TAPP sur la lipophagie.

Résultats : Il existe une corrélation entre marqueurs des GL et de l'autophagie dans le CaP. Ces marqueurs sont associés aux marqueurs d'agressivité du CaP (ISUP, pTNM, prolifération, TEM) et à l'expression du RA. Dans les cancers pT3, ces marqueurs sont plus exprimés dans les zones extraprostatiques. Il existe *in vitro* une diminution de l'activité de l'autophagie et une augmentation de la lipophagie et des GL dans les cellules de CaP au contact d'adipocytes.

Conclusion : Il existe une lipophagie fonctionnelle dans le CaP, en lien avec l'agressivité de la maladie. Nous retrouvons une influence du TAPP sur l'activité de la lipophagie et de l'autophagie, pouvant refléter l'adaptation et la survie des cellules tumorales.

Mots-clefs : Cancer, Prostate, Lipophagie, Autophagie, Tissu adipeux périprostatique, Métabolisme, Lipides, Gouttelettes lipidiques, Microenvironnement tumoral, LC3, p62.

LIPOPHAGY AND PROSTATE CANCER

Abstract

Introduction: Infiltration of the periprostatic adipose tissue (PPAT) by tumor cells is the first step of prostate cancer (PCa) progression. Lipophagy, a lipid selective autophagy, could provide energy to cancer cells and promote PCa progression. The aim of the present study is to identify markers of lipophagy in PCa tissues, to correlate them with markers of aggressiveness, and to evaluate the influence of PPAT adipocytes on lipophagy.

Material-Methods: We analyzed by immunohistochemistry on TMAs 438 PCa samples for the expression of markers of autophagy (p62, LC3), lipid droplets (LD) (PLIN), androgen receptor (AR), proliferation (Ki67) and epithelial to mesenchymal transition (EMT) (Zeb1). LDs were also evaluated by oil red staining on frozen sections. Co-cultures of adipocytes and PCa cell lines investigated the influence of PPAT on lipophagy.

Results: We observed a correlation between markers of LD and autophagy in PCa. These markers are significantly associated with markers of PCa aggressiveness (ISUP score, pTNM, proliferation, EMT) and AR expression. In pT3 cancers, the expression of markers of LD and autophagy is increased in extraprostatic areas. *In vitro*, we observed a decrease in autophagy activity together with increase in lipophagy and LD in PCa cells in contact with adipocytes.

Conclusion: These results suggest a functional lipophagy in PCa, linked to disease aggressiveness. Co-culture with adipocytes influences the activity of lipophagy and autophagy in cancer cells, suggesting a key role of PPAT on the adaptation and survival of PCa cells.

Keywords : Cancer, Prostate, Lipophagy, Autophagy, Periprostatic adipose tissue, Metabolism, Lipids, Lipid droplets, Tumor microenvironment, LC3, p62.

1. INTRODUCTION

1.1. Le cancer de la prostate

1.1.1. Généralités

1.1.1.1. Anatomie de la prostate

La prostate est une glande de l'appareil uro-génital masculin. Elle est localisée dans le pelvis, sous la vessie, en arrière de la symphyse pubienne et en avant du rectum. Classiquement décrite en forme de châtaigne, avec une base supérieure et un apex inférieur, elle pèse approximativement chez l'homme jeune 15 à 20 grammes et mesure 4 x 3 x 2 cm. C'est une glande au carrefour des voies uro-génitales qui entoure l'urètre prostatique et les canaux éjaculateurs. Elle est schématiquement divisée en 5 zones : la zone périphérique, la zone centrale, la zone de transition, la zone péri-urétrale et la zone fibromusculaire antérieure. Chaque zone est composée de tissu fibromusculaire lisse plus ou moins abondant, associé ou non à des canaux et des acini en quantité variable.

1.1.1.2. Épidémiologie et facteurs de risque

Le cancer de la prostate (CaP) est le cancer le plus fréquent chez l'homme dans les pays industrialisés et se situe au 3^{ème} rang des décès par cancer chez l'homme (1).

○ Les facteurs de risque individuels

Les facteurs de risque de survenu d'un CaP sont l'âge (augmentation constante du risque), l'origine ethnique (augmentation du risque dans les ethnies originaires d'Afrique subsaharienne) et les antécédents familiaux de CaP et du sein. En effet, il existe deux types de prédisposition génétique au CaP : l'hérédité monogénique, rare (5 % des cas, incluant le gène BRCA1 par exemple), et l'hérédité polygénique, prédominante (95 % des cas).

○ Les facteurs de risque environnementaux

L'obésité, surtout abdominale, est associée à la survenue d'un CaP avancé avec un niveau de preuve probable. Concernant l'association entre les facteurs alimentaires et le risque de développement d'un CaP, notamment agressif, les niveaux de preuve restent faibles (2).

1.1.1.3. Histoire naturelle du cancer de prostate

Dans le CaP, on distingue schématiquement quatre phases évolutives (figure 1) :

- Le développement de lésions précancéreuses représentées par la néoplasie intra-épithéliale prostatique de haut grade (PINHG). Il s'agit d'une prolifération de cellules épithéliales glandulaires présentant des critères de malignité, mais confinée dans les acini ou les petits canaux prostatiques.
- Le stade de tumeur localisée à la prostate avec le caractère infiltrant des glandes tumorales et la disparition de la couche des cellules basales.
- Le stade de tumeur localement avancée avec un dépassement de la capsule puis à une infiltration du tissu adipeux périprostatique (TAPP).
- Le stade métastatique au cours duquel les cellules tumorales colonisent préférentiellement les ganglions lymphatiques pelviens et le tissu osseux, ces deux localisations étant riches en tissu adipeux (TA).

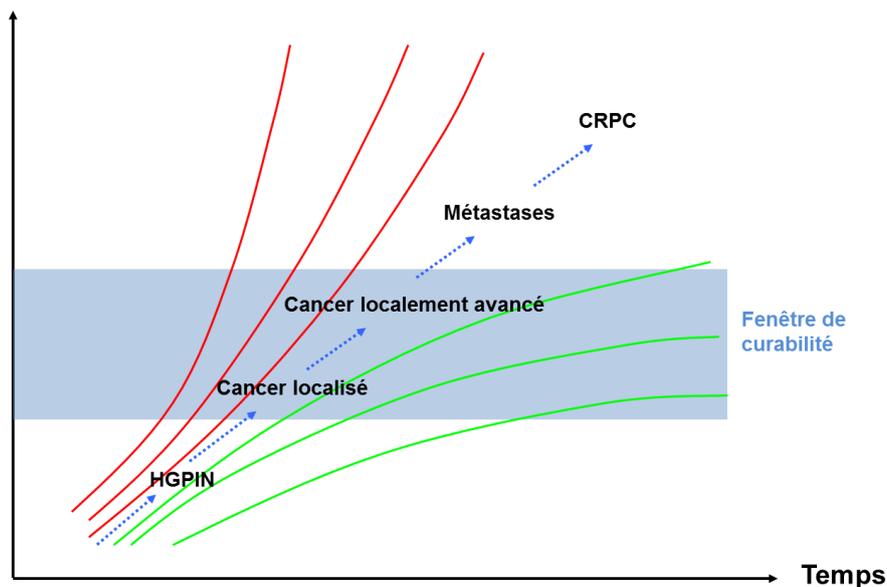


Figure 1 : Le CaP présente un potentiel d'agressivité très hétérogène. Certaines tumeurs évoluent de façon indolente alors que d'autres ont un risque de progression rapide.

1.1.2. Prise en charge

1.1.2.1. Diagnostic

○ Dosage sérique du PSA

Le dosage sanguin du Prostatic Specific Antigen (PSA) est actuellement le test de référence pour le diagnostic précoce du CaP. Le PSA est une protéine principalement sécrétée par les cellules de la prostate. C'est une enzyme de la famille des endopeptidases de type sérine et son rôle physiologique serait de fluidifier le liquide séminal afin de faciliter la mobilité des spermatozoïdes. Les cellules tumorales du CaP sécrètent une plus grande quantité de PSA que les cellules normales de prostate. Une élévation du taux sérique du PSA fait suspecter un CaP mais l'élévation du PSA n'est pas spécifique, pouvant également être observée dans l'adénome et les lésions inflammatoires de la prostate. La valeur seuil du PSA pour le diagnostic du cancer la plus souvent utilisée est 4 ng/ml. Cette valeur seuil permet d'obtenir une sensibilité de 93 % et une spécificité de 24 %. La densité de PSA (PSA/volume échographique de la prostate) améliore la valeur diagnostique du PSA dans la tranche de 2,5 à 10 ng/ml et peut aider à poser l'indication de biopsies prostatiques. Le temps de doublement du PSA est également considéré comme informatif, une augmentation de 0,75 ng/ml par an fait discuter la réalisation de biopsies même si le taux reste en dessous de 4ng/ml (2).

○ Toucher Rectal (TR)

Le toucher rectal (TR) permet de palper la partie postérieure de la prostate bombant dans le rectum. Il est recommandé préalablement à la prescription du dosage du PSA total. Un TR suspect est une indication à la réalisation de biopsies prostatiques, quelle que soit la valeur du PSA (2).

○ Imagerie IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) avant la première série de biopsie permet d'augmenter le taux de détection des cancers cliniquement significatifs. Néanmoins, en cas d'IRM normale devant une suspicion de cancer, les biopsies systématiques restent indiquées. En cas d'IRM positive, définie par une lésion de score « Prostate Imaging Reporting and Data System » (PIRADS) ≥ 3 , des biopsies ciblées associées à des biopsies systématiques sont recommandées (2). Le score PIRADS permet d'évaluer grâce à une échelle de suspicion allant de 1 à 5 (1 normal, 2 probablement normal, 3 équivoques ou douteux, 4 suspect et 5 très suspect de CaP) des zones prostatiques apparaissant suspecte de CaP à l'IRM.

○ Biopsies prostatiques et histopathologie

Les biopsies doivent être multiples et bilatérales. Elles sont réalisées par voie transrectale, guidées par une échographie endorectale, en utilisant une aiguille fine (18G) permettant de récupérer des carottes biopsiques. Dix à douze biopsies sont classiquement réalisées et permettent une cartographie précise de la glande prostatique. Les prélèvements sont ensuite adressés dans des pots séparés en vue de l'analyse anatomopathologique. Le compte rendu anatomopathologique est standardisé avec un certain nombre d'items indispensables guidant la décision thérapeutique. Les cancers prostatiques sont dans 90% des cas des adénocarcinomes acinaires, développés à partir des cellules épithéliales des acini prostatiques. Ils sont le plus souvent multifocaux et sont principalement localisés dans la zone périphérique (70%) (2).

1.1.2.2. Facteurs pronostiques

○ PSA

Le taux de PSA au diagnostic est un facteur prédictif de la survenue d'une progression tumorale et de l'évolution post-thérapeutique. La cinétique du PSA durant l'année précédant le diagnostic est également un facteur pronostic : une ascension supérieure à 2 ng/ml/an a été corrélée à une mortalité spécifique accrue (3).

○ Stade clinique

La stade clinique (cT) traduit l'évolution clinique initiale de la tumeur par le TR ainsi que son extension locale.

○ Facteurs histopronostiques

• *Evaluation du volume tumoral et du stade*

La quantification tumorale, évaluée par le nombre et le pourcentage de biopsies positives, ainsi que par la longueur linéaire de cancer sur les biopsies, est un facteur prédictif du stade pathologique (pT) sur les pièces de prostatectomie et de l'évolution post-thérapeutique (4). La mise en évidence sur les biopsies d'une infiltration tumorale du tissu adipeux périprostatique permet d'affirmer le stade d'extension pT3.

• *Score ISUP*

Les scores de l'International Society of Urological Pathology (ISUP) permettent d'apprécier le degré de différenciation du CaP, constituant une révision de révision du score de Gleason établi en 1963, qui comportait 5 grades architecturaux allant de 1 (très bien différencié) à 5 (indifférencié). Pour rendre compte de l'hétérogénéité des cancers de la prostate, le score de Gleason était obtenu par l'addition des deux grades principaux. Sur

biopsie le score est obtenu en additionnant le grade le plus représenté et le grade secondaire le plus élevé. Cette somme définissait 9 scores allant de 2 à 10. L'ISUP a modifié certaines définitions des grades pour obtenir une corrélation optimale avec les données pronostiques actuelles et pour améliorer la reproductibilité entre pathologistes (5). Il est recommandé de ne plus utiliser de grade 1 et 2. Le grade 4 a été redéfini, et il est désormais recommandé de préciser le pourcentage de haut grade (4 ou 5), non seulement sur les prostatectomies, mais également sur les biopsies (5). Les groupes ISUP sont exposés dans le tableau 1. Le score ISUP est un puissant élément pronostique des adénocarcinomes prostatiques. Il est corrélé au stade pT.

Score ISUP 2014	Correspondance avec le score de Gleason
Groupe 1	Score de Gleason 6 (3 + 3)
Groupe 2	Score de Gleason 7 (3 majoritaire)
Groupe 3	Score de Gleason 7 (4 majoritaire)
Groupe 4	Score de Gleason 8 (4 + 4 ; 3 + 5 ; ou 5 + 3)
Groupe 5	Score de Gleason 9 ou 10

Tableau 1 : groupes ISUP et correspondance avec le score de Gleason.

- *Infiltration des structures adjacentes*

Le CaP peut infiltrer les structures canalaire à proximité, ce qui correspond à l'aspect de carcinome intraductal, associé à un mauvais pronostic. L'infiltration des filets nerveux par le CaP est fortement associée à la présence d'une extension extraprostatique. Les embolies vasculaires tumoraux constituent également un facteur de mauvais pronostic (2).

1.1.2.3. Prise en charge thérapeutique

○ Classification du risque par d'Amico et arbre décisionnel thérapeutique

● *Classification de D'Amico*

Il s'agit d'une classification de groupes en fonction du risque de progression après traitement. Les groupes selon D'Amico sont largement utilisés en pratique pour les décisions thérapeutiques (2). Il existe trois groupes d'Amico :

- Faible risque : PSA \leq 10 ng/ml, et score ISUP 1, et stade clinique T1c ou T2a.
- Risque intermédiaire : PSA entre 10 et 20 ng/ml, ou score ISUP 2 ou 3, ou stade clinique T2b.
- Risque élevé : PSA $>$ 20 ng/ml, ou score ISUP \geq 4, ou stade clinique T2c.

● *Prise en charge thérapeutique d'un CaP de faible risque selon D'Amico*

Les cancers à faible risque évolutif relèvent habituellement de la surveillance active ou d'un traitement curatif (prostatectomie totale, radiothérapie externe ou curiethérapie interstitielle) (2).

● *Prise en charge thérapeutique d'un CaP de risque intermédiaire selon D'Amico*

Le groupe de CaP intermédiaire est un groupe hétérogène et peut-être subdivisé en un groupe favorable et un groupe moins favorable. Les CaP de risque intermédiaire défavorable relèvent plutôt d'un traitement curatif (prostatectomie totale ou radiothérapie seule ou associée à un blocage androgénique court). Les CaP de risque intermédiaire favorable peuvent bénéficier d'une curiethérapie, moins invasive. La surveillance simple est proposée si le patient a une survie courte et aucune éligibilité aux autres thérapies (2).

● *Prise en charge thérapeutique d'un CaP à haut risque selon D'Amico*

L'hormono-radiothérapie est le traitement à proposer chez ces patients. L'hormonothérapie longue isolée est proposée en dernier recours chez des patients non éligibles à la radiothérapie. La prostatectomie peut être également proposée, dans le cadre d'un traitement multimodal (2).

● *Prise en charge thérapeutique d'un CaP au stade métastatique*

Le stade métastatique M se caractérise par une dissémination de la tumeur à distance. Les os et les ganglions sont les sites les plus fréquents. La prise en charge du CaP métastatique repose sur plusieurs facteurs et s'inscrit dans une prise en charge multidisciplinaire. Elle s'appuie initialement sur une déprivation hormonale à laquelle s'associe, lors de la phase de

résistance à la castration, une hormonothérapie de seconde génération (acétate d'abiratéronne ou enzalutamide), ou une chimiothérapie par Taxanes (2).

○ **Facteurs histopronostiques sur pièce de prostatectomie**

• *Stade pTNM*

Le système pTNM repose sur l'extension tumorale locale, ganglionnaire et métastatique. Il faut différencier le stade clinique (cTNM) du stade anatomopathologique (pTNM). Ce dernier étant plus précis mais ne pouvant être déterminé que sur la pièce de prostatectomie. Les différents stades sont exposés dans le tableau suivant.

Stades anatomopathologiques pT de la tumeur primitive	pT0 : absence de tumeur identifiée après prostatectomie totale
	pT2 : tumeur limitée à la prostate
	pT3 : extension au-delà de la prostate : - pT3a : extension extraprostatique uni- ou bilatérale et/ou invasion du col vésical - pT3b : extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale
	pT4 : tumeur atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle élévateur de l'anus ou la paroi pelvienne)

Tableau 2 : les stades anatomopathologiques du cancer de la prostate (TNM 2016).

• *Score ISUP*

Sur pièce de prostatectomie, le score ISUP est obtenu en additionnant les deux grades les plus représentés. Néanmoins, s'il existe un contingent de grade 5, celui-ci doit entrer dans la constitution du score dès qu'il représente >5%. S'il est <5%, il doit être mentionné en tant que troisième contingent. Le cancer de prostate est souvent multifocal. Lorsque plusieurs foyers sont visibles, il est recommandé d'établir le groupe ISUP de chaque foyer et de considérer le foyer tumoral potentiellement le plus agressif comme étant le « foyer index ». Il n'y a pas de consensus pour définir le foyer index, il peut s'agir de celui ayant le groupe ISUP le plus élevé, celui de plus grande taille ou encore celui avec le stade pathologique pTNM le plus avancé (6).

• *Quantification tumorale*

Le volume tumoral est un facteur prédictif de récurrence, corrélé avec la mesure du grand axe de la tumeur principale (6).

- *Marges chirurgicales*

L'évaluation des marges sur pièce opératoire est un critère histopronostique important. Le taux de marges positives varie suivant les études de 11% à 38% (7). Lors de l'arrivée de la pièce de prostatectomie dans le service d'anatomopathologie, la pièce est badigeonnée à l'encre de Chine permettant ainsi d'évaluer le statut des marges chirurgicales. Le risque de récurrence biologique (augmentation du taux de PSA) après une prostatectomie avec marges positives est multiplié par deux par rapport à une chirurgie à marges négatives (7). Le statut des marges est un facteur prédictif indépendant de progression même en cas d'extension extraprostatique ou de haut grade (Gleason \geq 7). La longueur totale de tumeur au contact des limites chirurgicales est un critère prédictif important d'une récurrence après prostatectomie (7).

- *L'invasion ganglionnaire*

L'envahissement ganglionnaire est le facteur anatomopathologique de plus mauvais pronostic. La survie spécifique des cancers de la prostate N+ est de 55% à 10 ans et est corrélé au nombre de ganglions envahis (8).

1.2. Tissu adipeux périprostatique et cancer de prostate

Le TAPP, infiltré par les cellules tumorales au stade de cancer localement avancé, est potentiellement impliqué dans le développement et la progression du CaP, en relarguant des molécules dans la circulation sanguine ou par contact direct avec les cellules tumorales. Il a été montré que les cellules cancéreuses modifient les caractéristiques des adipocytes en les dédifférenciant afin de maintenir un environnement favorable à leur développement. On parle ainsi d'« adipocytes associés au cancer ». Le TAPP peut influencer sur l'agressivité des cellules cancéreuses par plusieurs mécanismes (figure 2).

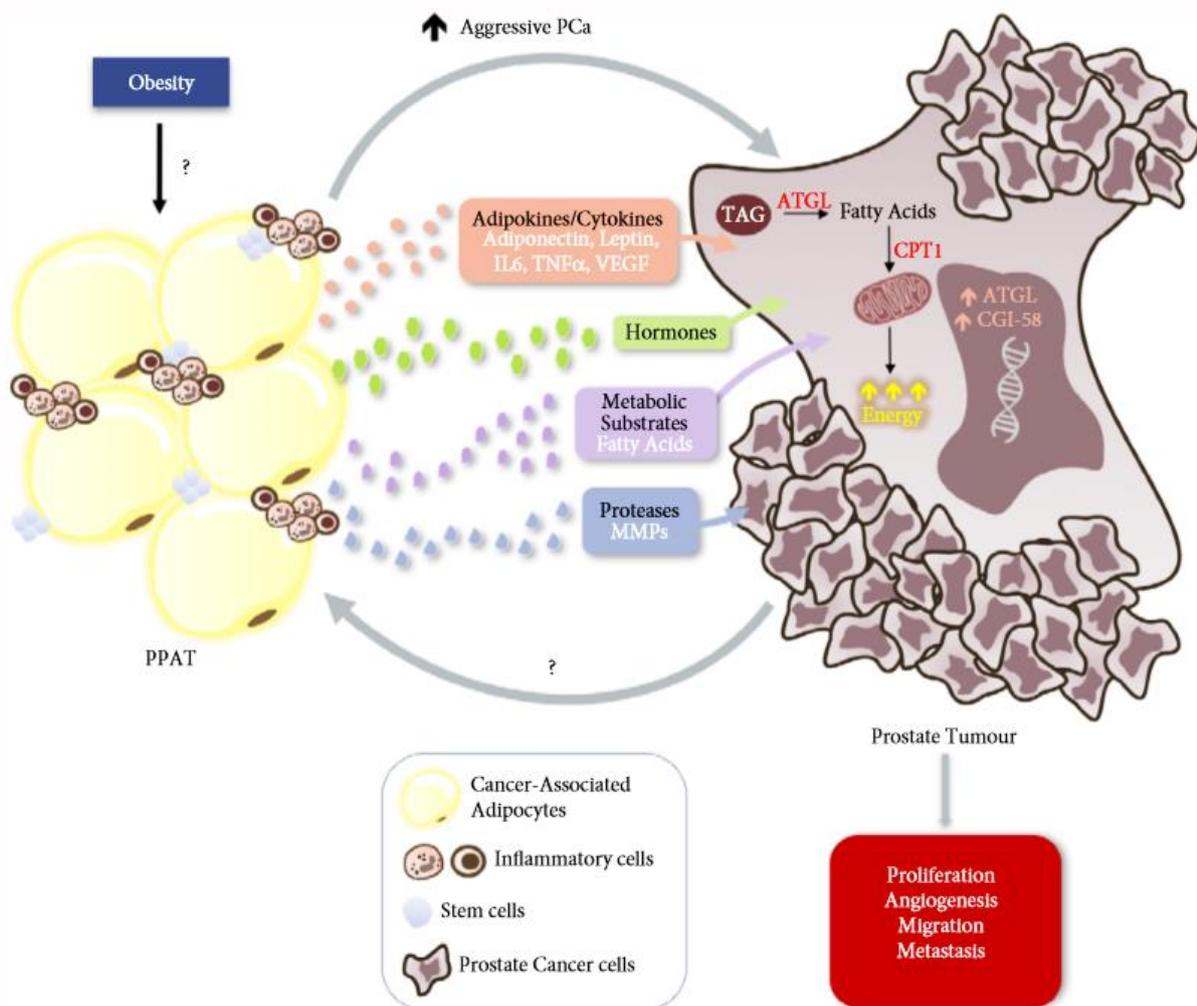


Figure 2 : Le tissu adipeux périprostatique favorise l'agressivité du cancer de la prostate. L'intégration réciproque entre les adipocytes et les cellules tumorales permet de dédifférencier les adipocytes, ainsi appelées « adipocytes associés au cancer ». Ces adipocytes sécrètent plusieurs adipokines, cytokines, acides gras, hormones, enzymes et facteurs de croissance qui peuvent stimuler la croissance des cellules cancéreuses (d'après Nassar et al., BJU Int. 2018).

1.2.1. Le TAPP, une source d'hormones

Les lipides sont les précurseurs des hormones stéroïdiennes. Le TAPP est ainsi un générateur de précurseurs androgéniques et pourrait être une source extragonadique potentielle d'androgènes nécessaires à la croissance et à la dissémination du CaP (9). Il renferme des aromatasés qui convertissent les androgènes en œstrogènes qui interviendraient également dans le développement du CaP (10).

1.2.2. Le TAPP, une source de facteurs de croissance

Les adipocytes sont une source de facteurs solubles incluant les adipokines, les chimiokines et les facteurs de croissance comme le TGF beta. Il a été montré que les adipocytes du TAPP augmentaient la migration des cellules cancéreuses prostatiques par relargage d'adipokines (11).

1.2.3. Le TAPP, une source de lipides

Le TAPP est composé d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides, et constitue une source d'approvisionnement en acides gras (AG) des cellules du CaP (12). Dans des modèles d'infiltration du tissu adipeux par les cellules du CaP, les cellules tumorales étaient capables d'induire une libération d'AG par les adipocytes. Ces derniers étaient ensuite absorbés et stockés par les cellules tumorales (13).

Il a été montré que la composition en AG du TAPP était associée aux paramètres d'agressivité du CaP. Ainsi, les TAPP des cancers agressifs étaient caractérisés par un fort taux d'AG saturés et un faible taux d'AG polyinsaturés oméga 3 et oméga 6 par rapport aux cancers indolents. De plus, *in vitro*, les TAPP des cancers agressifs induisaient davantage de migration cellulaire que ceux des cancers indolents (14).

1.3. Les lipides, l'énergie des cellules du CaP

Les cancers de la prostate fixent très peu le fluorodéoxyglucose (FDG) sur les TEP-scan (15). Cela s'explique par leur faible consommation en glucose. En effet, l'énergie nécessaire à la survie et la prolifération des CaP provient presque exclusivement de la β -oxydation des AG (16). Les cellules tumorales doivent donc être alimentées en lipides de façon importante et continue. Les cellules du CaP peuvent absorber les lipides du microenvironnement tumoral, dont le TAPP (apport exogène). Elles peuvent également synthétiser des lipides à partir de dérivés carbonés (synthèse *de novo*). Enfin, les cellules peuvent stocker des AG sous la forme de gouttelettes lipidiques (GL) et en disposer à tout moment grâce aux mécanismes de la lipolyse.

1.3.1. Les sources de lipides

1.3.1.1. Apport exogène de lipides

L'approvisionnement des AG par les cellules du CaP peut se faire de façon passive (diffusion membranaire ne nécessitant pas d'énergie) ou active via des protéines membranaires consommatrices d'énergie. L'inhibition non spécifique de récepteurs membranaires des cellules du CaP diminue de 25% l'absorption d'acide palmitique suggérant un transport actif des lipides du microenvironnement tumoral par les cellules cancéreuses. Le CD36 et le récepteur au LDL sont des protéines impliquées dans la translocation d'AG (17). Le TAPP joue un rôle majeur dans l'approvisionnement lipidique du CaP comme précédemment décrit.

1.3.1.2. Lipogenèse *de novo*

La lipogénèse *de novo* permet la synthèse d'AG saturés (acide palmitique) à partir du glucose, incluant une série de réactions enzymatiques. Ces AG peuvent être stockés sous forme de triglycérides comme réserve d'énergie. A l'état physiologique, ce processus a lieu essentiellement dans le foie et les adipocytes, mais peut être exacerbé dans les cellules cancéreuses (18).

Les premières étapes sont constituées par la conversion du citrate en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY) et la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'Acétyl-CoA carboxylase (ACC). L'inhibition de ces deux enzymes, dont l'expression est sous l'influence des androgènes, diminue la croissance du CaP (19,20).

L'étape suivante consiste en la synthèse d'acide palmitique à partir de malonyl-CoA sous l'influence d'une enzyme, l'acide gras synthase ou « fatty acid synthase » (FASN). La surexpression de FASN dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de CaP provoque une

prolifération des cellules du CaP et cela de façon dépendante de la présence du récepteur aux androgènes (RA) (21). Les androgènes induisent l'expression de la FASN via la voie des Sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) ou du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosome (PPAR γ).

La FASN permet la production d'AG saturés, mais pas d'AG insaturés. La Stearoyl-CoA désaturase 1 (SCD1) a pour fonction de désaturer les AG, permettant de diversifier les catégories de lipides et leurs fonctions. Comme pour la FASN, l'expression de SCD1 est régulée par SREBP. L'extinction transcriptionnelle de SCD1 permet de bloquer la croissance de la tumeur et d'accroître la survie des animaux ayant reçu une xénogreffe de CaP (22).

1.3.1.3. Synthèse de cholestérol

Le cholestérol, qui constitue environ un tiers du contenu lipidique de la membrane plasmique, est apporté par l'alimentation ou synthétisé par l'organisme via la voie du mévalonate à partir de l'acétyl-CoA. Dans les tissus et le plasma, le cholestérol se trouve sous forme libre (non estérifiée) ou sous forme estérifiée. La forme estérifiée (CE) est la forme de stockage du cholestérol, synthétisée par l'acyl-coA cholesterol acyltransférase (ACAT). L'inhibition de l'ACAT supprime de manière significative la prolifération, la migration, l'invasion et la croissance de certaines tumeurs *in vitro* et *in vivo* (23). Il a été montré dans les cellules tumorales prostatiques, notamment de haut grade, que l'activation de la voie PI3K/AKT résultant de la perte de PTEN induit une accumulation de CE (23). De plus, le CE constitue le substrat initial préférentiel mobilisé pour la synthèse de stéroïdes (24).

1.3.1.4. Gouttelettes lipidiques : le stock de lipides du CaP

Les lipides sont stockés dans les cellules sous la forme de lipides neutres, inertes et non cytotoxiques tels que les esters de cholestérol et les triglycérides dans des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (25). Les GL sont entourées d'une monocouche de phospholipides et présentent à leur surface différentes protéines dont les périlipines (PLIN), qui stabilisent les GL et régulent la lipolyse dans le tissu adipeux.

Les triglycérides qui composent les GL sont synthétisés à partir de diacylglycérol (DAG) et de monoacylglycérol (MAG), successivement le résultat d'un branchement d'AG sur un squelette glycérol. La synthèse de TAG à partir de DAG est assurée par l'acyl-CoA diacylglycérol acyltransferase (DAGT). L'isoforme 1 de la DAGT est surexprimée dans les cellules du CaP. Son inhibition diminue la densité des GL et affecte la migration et la croissance des cellules du CaP.

Les GL sont formées à partir du réticulum endoplasmique (RE) mais les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués restent incompris. Les GL ne sont pas qu'un stock d'énergie pour les cellules cancéreuses. Elles interviennent dans l'inflammation et l'échappement immunitaire du cancer, dans la prolifération et la mort cellulaire, dans les mécanismes d'angiogénèse, d'hypoxie et enfin dans l'invasivité tumorale (17). Dans les CaP de haut grade et les métastases de CaP, il existe une accumulation aberrante de GL. La baisse du stock d'esters de cholestérol dans les CaP réduit de manière significative la prolifération du CaP, altère sa capacité d'invasion et supprime la croissance tumorale (23).

1.3.2. La lipolyse

Pendant longtemps, il a été considéré que la mobilisation des lipides des GL ne passait que par la lipolyse médiée par les lipases neutres cytosoliques (26). Il a été plus récemment montré que la mobilisation d'AG à partir des GL pouvait passer également par le mécanisme de l'autophagie, ce processus ayant été dénommé « lipophagie » (27) (figure 3). Les AG libérés sont soit intégrés dans les structures cellulaires, soit utilisés comme substrat énergétique, soit impliqués dans des voies de signalisation favorisant la progression tumorale.

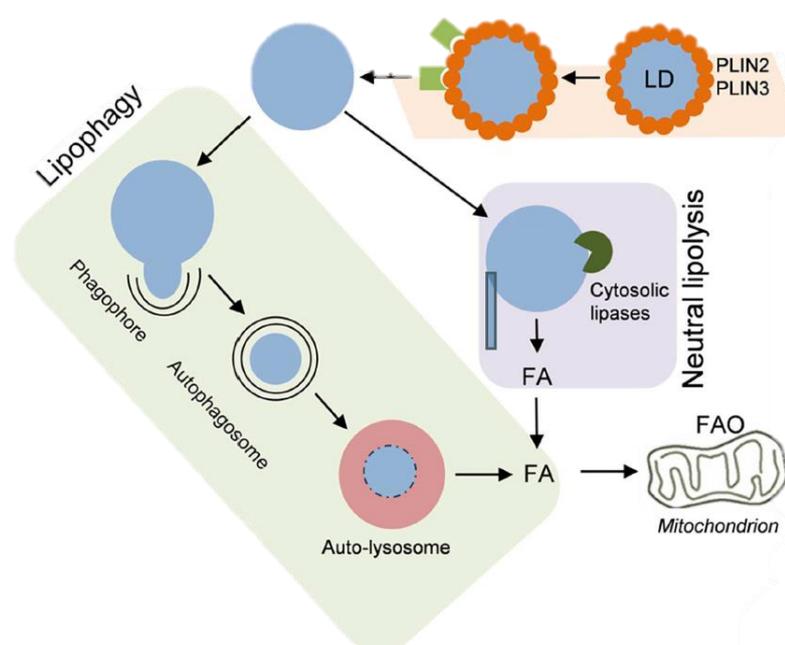


Figure 3 : représentation schématique de la lipolyse conduisant à la formation d'AG (FA =Fatty Acid) pouvant être ensuite oxydés dans les mitochondries (FAO = Fatty Acid Oxydation). La dégradation des protéines PLIN à la surface des GL (LD = Lipid Droplet) les expose soit à l'action des lipases neutres cytosoliques, soit à la lipophagie : formation d'un autophagosome, puis d'un autophagolysosome, et enfin dégradation par les lipases acides (d'après Maan et *al*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018).

1.3.2.1. La lipolyse « classique »

o Mécanismes

Les triglycérides des GL sont successivement hydrolysés par trois lipases différentes : l'Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), la Lipase Hormono-Sensible (HSL) et la Monoacylglycérol Lipase (MAGL), permettant ainsi la libération d'AG libres dans le cytoplasme. Les PLIN agissent comme des gardiens des GL et leur dégradation est nécessaire pour déclencher la lipolyse (28). L'inhibition de la lipolyse est une fonction directe de ces protéines de surface (29). La dégradation des PLIN est corrélée à l'activité lipolytique et toutes deux sont induites en période de carence nutritionnelle (30).

○ Lipolyse et cancer :

Une dérégulation de ces enzymes a été montrée dans de nombreux types de cancers. Le rôle de l'ATGL est débattu, avec selon les études et les modèles, tantôt un effet protumoral, tantôt un effet antitumoral. Par contre, le rôle oncogénique de MAGL a été bien établi, y compris dans le CaP (31).

1.3.2.2. La lipolyse via la lipophagie

○ Mécanisme :

La lipophagie est une autophagie spécifique des lipides et partage les mêmes mécanismes de base que l'autophagie. L'autophagie est un processus catabolique impliqué dans la dégradation du matériel cellulaire par la voie lysosomale. C'est un processus d'autodigestion essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire, qui se produit à l'état normal et est également activé en réponse à différents stress. L'autophagie peut être un frein à la formation de tumeurs, mais cependant les cellules cancéreuses peuvent la détourner à leur profit pour favoriser leur développement et/ou résister à certains traitements (32). Le processus est schématiquement le suivant : le matériel cellulaire à « digérer » est tagué par un « signal cible de l'autophagie », le plus souvent par ubiquitination. La protéine p62 (ou sequestosome 1) reconnaît ce signal cible et intègre les éléments à dégrader dans le processus de l'autophagie en se fixant sur LC3 (ou microtubule-associated protein 1 light chain 3). LC3 participe à la formation de la membrane expansive entourant le matériel à dégrader, ce qui aboutit à la création de l'autophagosome qui fusionnera par la suite avec les lysosomes qui dégraderont les éléments (33) (Figure 4).

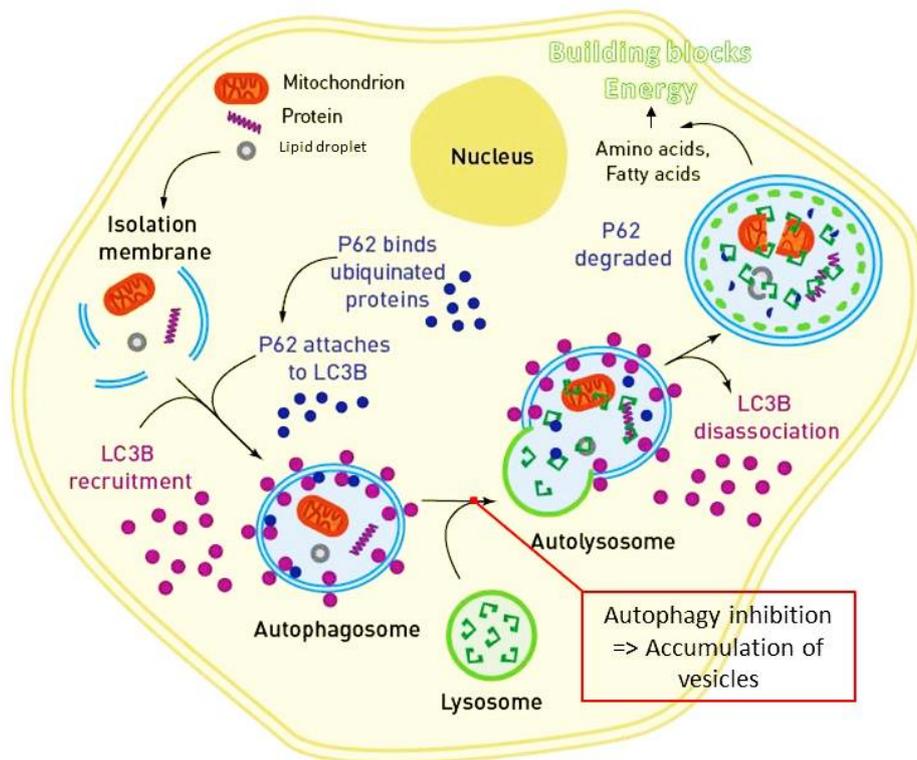


Figure 4 : Étapes de l'autophagie et place des protéines p62 et LC3. p62 interagit avec LC3 pour connecter la protéine à dégrader à la machinerie autophagique : formation d'un autophagosome qui va fusionner avec un lysosome pour former un auto(phago)lysosome.

La lipophagie a tout d'abord été mise en évidence dans les hépatocytes puis dans de nombreux autres types de cellules en condition de carence nutritive ou de lipotoxicité (27). Dans le processus de lipophagie, les GL sont entièrement ou partiellement encapsulées dans un autophagosome qui fusionnera avec des lysosomes. Les enzymes lysosomales digéreront les triglycérides et le CE afin de libérer du cholestérol et des AG libres. La dégradation des PLIN est également nécessaire pour déclencher la lipophagie (28). Dans la lipophagie, ce sont les lipases lysosomales Aut5/Cvt17/Atg15 qui entrent en action et libèrent une grande quantité d'AG libres. Alors que la polyUb-lysine est un tag connu pour initier la dégradation protéique dans l'autophagie, le mécanisme de reconnaissance des GL pour induire le processus de la lipophagie reste inconnu. Des protéines d'ubiquitination UBE2G2 et AUP1 ont été observées associées à des GL et pourraient être impliquées (34). D'autres protéines pourraient être spécifiques à la lipophagie. Une de ces « protéines-étiquette » permettant la reconnaissance de GL par la lipophagie est l'Huntingtin (HT). Ainsi, les cellules dépourvues d'HT ont une accumulation de GL (35).

○ Lipophagie et cancer

Tout comme l'autophagie, la lipophagie est susceptible d'avoir un double rôle pro et antitumoral. La dégradation des lipides des GL par la lipophagie fournit l'énergie et les composants nécessaires à la biosynthèse des membranes et à la synthèse d'autres molécules indispensables à la survie et au développement de la tumeur. La présence de lipides favorise la croissance des tumeurs *in vitro* et *in vivo* des cellules cancéreuses ovariennes (36).

Certaines études montrent a contrario un effet antitumoral de la lipophagie. La persistance d'une dégradation des GL par autophagie atténue le potentiel métastatique des cancers du rein et augmente la survie des patients (37). Il a été montré que l'expression des lipases lysosomales acides (LAL) augmente le métabolisme lipidique et réduit la métastagénèse des cancers du poumon et du foie (38,39). De plus, la lipophagie médie l'apoptose induite par le stress du RE à travers les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (40). Enfin, il a été montré que l'activation de la lipophagie pouvait augmenter la sensibilité des traitements anticancéreux, notamment dans les cancers du rein et les tumeurs gynécologiques (41).

Dans le CaP, seules des données *in vitro* sont disponibles. Dans les cellules de la lignée androgène-dépendante LNCaP, la déprivation androgénique induit l'autophagie et la lipophagie (avec une dégradation des GL), ce qui favorise la survie des cellules cancéreuses (42). A l'inverse, dans les cellules de la lignée de CaP PC3 (n'exprimant pas le RA), les activateurs de la lipophagie provoquent une libération et une accumulation d'AG libres, augmentant la production de ROS et conduisant à la sénescence des cellules (43).

Il apparaît donc probable que le rôle pro ou antitumoral de la lipophagie dans le cancer et particulièrement dans le CaP, puisse varier en fonction du type de tumeur, du stade de développement et de la quantité d'AG libres produits.

Il est donc nécessaire de développer d'autres types d'études, incluant notamment l'analyse de marqueurs de la lipophagie dans les tumeurs humaines.

2. OBJECTIFS

1 - Evaluer l'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL dans le tissu tumoral prostatique et rechercher une association entre eux.

2 - Corréler l'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL avec les marqueurs d'agressivité du CaP.

3 - Rechercher une expression différentielle des marqueurs de l'autophagie et des GL dans les cellules carcinomateuses de prostate en fonction de leur proximité avec le TAPP.

4 - Vérifier l'existence *in vitro* d'une influence du TAPP sur les marqueurs de l'autophagie et des GL sur des lignées de cellules de CaP.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Patients et tissus

3.1.1. Prélèvements fixés

Nous avons étudié en immunohistochimie l'expression de marqueurs de l'autophagie (p62, LC3), des GL (PLIN), l'index de prolifération (Ki67) et un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zeb1) sur du tissu prostatique fixé au cours des différentes phases de progression du CaP. Ces tissus sont issus de prélèvements fixés en formol et inclus en paraffine.

Deux cohortes de patients ont été étudiées (tableau 1) :

- Une cohorte d'adénocarcinomes prostatiques composée de 314 prélèvements issus de pièces de prostatectomies radicales réalisées entre 2005 et 2013. Parmi les tumeurs pT3 de cette cohorte, seul le contingent intraprostatique a été analysé.
- Une cohorte d'adénocarcinomes prostatiques composée de 123 prélèvements obtenus à partir de pièces de prostatectomies radicales classées pT3 et réalisées au CHU de Tours entre 2011 et 2018. Pour chaque patient, deux localisations tumorales ont été analysées :
 - Contingent tumoral intraprostatique : foyer de carcinome localisé en intra prostatique.
 - Contingent tumoral extraprostatique : foyer de carcinome prostatique en dépassement capsulaire au contact du TAPP.

A l'aide de la base de données anatomopathologiques du logiciel DIAMIC (Infologic-santé) et après consultation du dossier clinique des patients, nous avons recueilli les données suivantes :

- l'âge du patient
- le score ISUP (ex-Gleason)
- le taux de PSA préopératoire

		Cohorte 1 (n=314)	Cohorte 2 (n=123)
Âge (années) : médiane (extrêmes)		63 (46-75)	67 (51-76)
PSA pré-op (ng/ml) : médiane (extrêmes)		8,95 (1,5-35)	10,2 (4,2-71)
Score ISUP	1	78	0
	2	92	38
	3	125	52
	4	19	15
	5	0	18
pTNM	pT2	200	0
	pT3	114	123

Tableau 1 : Caractéristiques des patients et des CaP des prélèvements fixés.

3.1.2. Prélèvements congelés

Pour quantifier les GL, nous avons réalisé un marquage à l'huile rouge sur des tissus tumoraux. Cette technique nécessite des coupes de tissus congelés. Pour cela nous avons utilisé 28 échantillons de tissu congelés de CaP issus de pièces de prostatectomies radicales provenant de la tumorothèque du CHU de Tours (tableau 2).

		Nombre de sujets (n)
Score ISUP	1	2
	2	11
	3	10
	4	0
	5	5
pTNM	pT2	13
	pT3	15

Tableau 2 : Caractéristiques des CaP analysés sur coupes congelées.

3.1.3. Caractéristiques des CaP correspondant aux tissus adipeux périprostatiques (TAPP) utilisés en co-culture

Afin d'évaluer l'influence des adipocytes périprostatiques sur des lignées carcinomateuses de prostate, nous avons obtenu 11 prélèvements à l'état frais de TAPP de CaP (tableau 3). Ces prélèvements étaient recueillis au décours de prostatectomies radicales pour CaP.

		Nombre de sujets (n)
Score ISUP	1	0
	2	4
	3	5
	4	1
	5	1
pTNM	pT2	5
	pT3	6

Tableau 3 : Caractéristiques des CaP pour lesquels le TAPP a été utilisé en co-culture.

3.2. TMA et immunohistochimie

3.2.1. Technique

La technique du TMA permet d'analyser sur une seule lame un grand nombre d'échantillon de tissus inclus en paraffine avec un même marqueur. Le bloc de TMA se construit à partir de blocs-patients, sur lesquels une zone d'intérêt est sélectionnée puis carottée en cylindre biopsique. Le cylindre sera ensuite inclus dans un bloc de paraffine vierge « receveur ». Le bloc receveur contient ainsi une série de cylindres prélevés sur différents patients, selon un plan précis. Nous avons utilisé un appareil dédié, semi-automatique, le *Tissue Arrayer MTA Booster, Version 1.01, Alphélys*. Il est constitué de deux aiguilles à biopsie, dont le positionnement est motorisé et contrôlé par informatique. La première aiguille sert à forer le trou dans le bloc receveur et la seconde à placer le cylindre biopsique de l'échantillon sélectionné (figure 1).

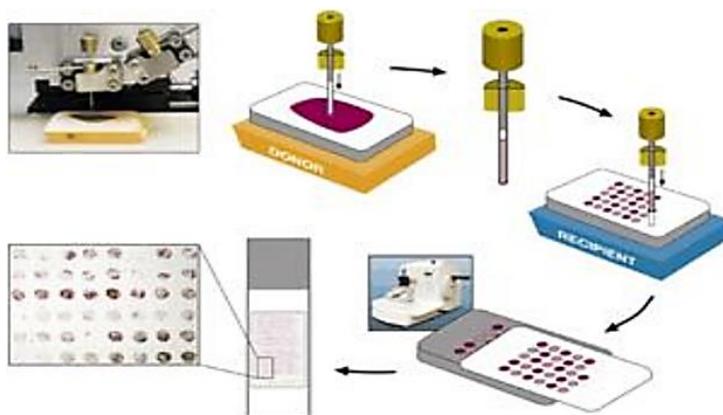


Figure 1 : Réalisation d'un bloc de TMA

Les blocs de TMA ont été construits à partir des prélèvements de tissus prostatiques sélectionnés issus des différents groupes. Les zones d'intérêt ont été repérées par lecture des lames originelles, colorées en HES (hématoxyline-éosine-safran). Pour chaque cas, 3 prélèvements des zones sélectionnées ont été réalisés sur les blocs-patients et transférés vers le bloc-receveur. Cela permet de tenir compte de l'hétérogénéité tumorale et de pallier à d'éventuels problèmes techniques (ciblages difficiles des petits foyers, perte de matériel à la coupe...). Une fois terminés, les blocs de TMA ont été placés dans une étuve à 37°C pendant une nuit, puis compressés à plat sous une charge de 3 kg pendant une matinée. Des coupes sériées de 3 microns ont ensuite été effectuées à partir de ces blocs. Un contrôle morphologique par Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) est réalisé. Les autres lames sont utilisées pour l'étude immunohistochimique.

3.2.2. Marquage immunohistochimique

Les techniques d'immunohistochimie permettent de mettre en évidence et de localiser un antigène (Ag) dans les cellules grâce à un anticorps (Ac) dirigé contre ce dernier. Un Ac primaire est mis en contact avec les tissus à analyser. Cet Ac est reconnu par un Ac secondaire, lui-même lié, directement ou indirectement, à une molécule de biotine. Le système de détection composé de streptavidine et de peroxydase est ensuite appliqué sur la lame. La streptavidine est avide de la biotine, ce qui va permettre la liaison entre l'Ac primaire et secondaire. La DAB, substrat chromogène de l'enzyme peroxydase produit une réaction colorée sur le site de l'Ag cible reconnu par l'Ac primaire (figure 2).

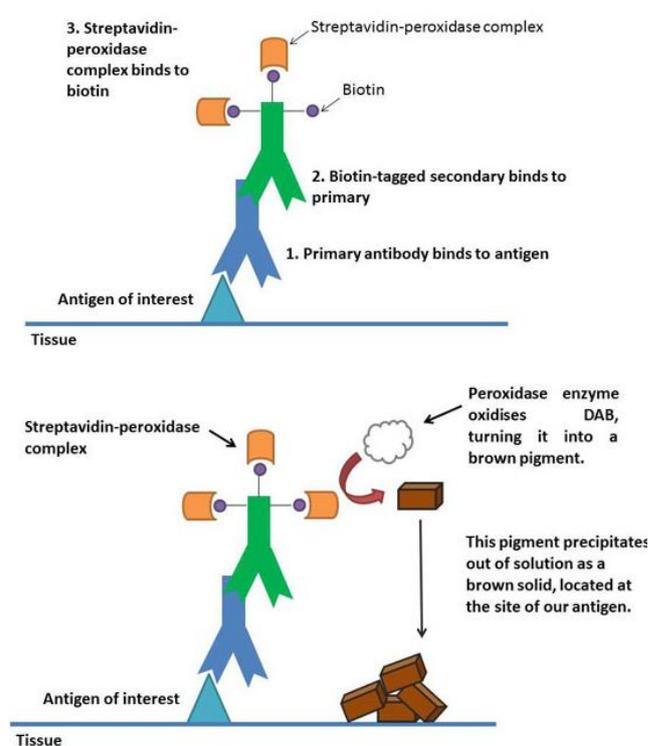


Figure 2 : Système de révélation par le complexe streptavidine-peroxydase.

Des coupes de 3 microns ont été réalisées sur les blocs de TMA. Elles ont été étalées sur lames blanches (*Superfrost plus*) puis séchées dans une étuve à 56°C pendant 15 minutes. Les étapes de déparaffinage, démasquage antigéniques, dépôt de l'anticorps sur lame, incubation à 37°, rinçage et révélation ont été réalisées manuellement. Le kit utilisé était le *kit de révélation Dako REAL Detection System, Peroxydase/DAB+ Rabbit/mouse*.

3.2.2.1. Anticorps utilisés

Les caractéristiques des anticorps utilisés sont exposés dans le tableau 4.

	Fournisseur	Dilution	Caractéristiques	Conditions d'incubation
LC3	Novus	1/2000	Ac polyclonal de lapin	60 min, RT, PH6
RA	Cell Marque	1 : 1	Ac monoclonal de lapin (SP107)	32 min, 37°, Benchmark
Ki67	Roche	1 : 1	Ac monoclonal de lapin (30-9)	16 min, 37°, Benchmark
p62	Abnova	1/100	Ac monoclonal de souris, clone 2C11	60 min, RT, PH6
Zeb1	Abnova	1/1000	Ac monoclonal de souris, clone 4C4	60 min, RT
PLIN	Abcam	1/500	Ac polyclonal de chèvre	60min, RT, PH9

Tableau 4 : liste des anticorps testés.

3.2.2.2. Interprétation :

La lecture des immunomarquages a été réalisée par un lecteur expérimenté sur microscope optique, en tenant compte du spot le plus marqué pour chaque tissu.

L'évaluation des marquages était variable selon l'anticorps utilisé :

- quantitative, rapporté en pourcentage des cellules tumorales : Zeb1, Ki67, RA. Concernant le RA, le pourcentage de cellules positives a été multiplié par l'intensité de marquage (1 ou 2), pour déterminer le RA score.

- ou semi-quantitative : LC3, p62, PLIN. Trois scores étaient attribués :

- « 0 » : absence de marquage
- « + » : marquage modéré et multifocal
- « ++ » : marquage fort et diffus

3.3. Rouge à l'huile :

Le rouge à l'huile est une coloration permettant de mettre en évidence les lipides neutres au sein des GL. Cette technique se réalise sur coupes de tissus congelés. Pour mettre en évidence les GL dans les cellules carcinomateuses de prostate, nous nous sommes basés sur le protocole de l'équipe de Mehlem et *al.* publié dans le Nature Protocol (44). Les prélèvements issus de pièce de prostatectomie étaient cryopréservés à l'état frais après vérification de la présence de cancer par une analyse extemporané au bleu de toluidine ou bleu de méthylène. Le prélèvement était placé dans un cryotube au congélateur à -80°C. Nous avons réalisé des coupes de 10 µm au cryomicrotome (SME, Thermo Fisher Scientific TM), et les avons étalées sur des lames adhésives Superfrost Plus (Thermo Scientific TM). Les coupes étaient ensuite séchées à l'air ambiant durant 10 min, puis colorées à l'Hématoxyline Gill 1 (Thermo Fisher Scientific TM) durant 1 minute et 30 secondes et rincées dans une solution bleuissante (eau ammoniacale 0,15%) puis à l'eau distillée. Une solution de rouge soudan (Fluka Chemica TM) 0,3% était déposée sur les lames durant 7 minutes à l'obscurité puis les lames étaient rincées à l'eau courante durant 30 minutes. Les lamelles étaient montées à l'aide d'Aquatex® (Merck). La lecture des lames colorées à l'huile rouge a été réalisée par un lecteur expérimenté sur microscope optique.

L'évaluation a été effectuée de façon semi-quantitative avec trois scores d'intensité de marquage :

- « 0 » : Absence de GL ou très rares GL focalement
- « + » : Rares GL très focales
- « ++ » : Présence multifocale de GL
- « +++ » : Marquage intense et quasi diffus

3.4. Co-culture d'adipocytes et de cellules carcinomateuses de prostate

3.4.1. Isolement d'adipocytes à partir de tissu adipeux périprostatique et co-culture

Les tissus adipeux proviennent de patients porteurs de CaP. Ils sont soit utilisés à l'état frais ou stockés à -80°C (à sec ou dans du milieu de culture contenant 5% de DMSO). Les adipocytes sont isolés suite à la dissociation du tissu adipeux par la collagénase B (Sigma-Aldrich). Le tissu adipeux, après avoir été coupé en morceaux de 2-3 mm, est incubé avec 2-3 ml de collagénase à 1mg/ml par gramme de tissu pendant 20 à 40 minutes jusqu'à visualisation d'une couche d'adipocytes à la surface. La collagénase est ensuite inactivée à l'aide de 2mM d'EGTA. La solution obtenue est filtrée sur un tamis cellulaire de 100 μm (Corning) afin de séparer les cellules des tissus non digérés. Après 10 minutes dans une étuve à 37°C , les adipocytes se trouvent à la surface du tube. Les adipocytes isolés ont été identifiés par marquage à l'huile rouge et au DAPI et leur viabilité vérifiée avec un test MTT. Les cellules PC3 et 22RV1 ont été mises en présence d'adipocytes (15 μl par cm^2) pendant 48h avec et sans 20 μM de chloroquine (sigma).

3.4.2. Lignées carcinomateuses prostatiques

Deux lignées carcinomateuses ont été utilisées :

- La lignée PC-3 (ATCC® CRL-1435™). Il s'agit d'une lignée de cellules prostatiques carcinomateuses provenant d'un site métastatique osseux d'un homme caucasien de 62 ans et ayant une faible activité phosphatase et 5 α -réductase. Elles n'expriment pas le RA et sont hormonorésistantes.

-La lignée 22RV1 (ATCC® CRL-2505™). Il s'agit d'une lignée cellulaire de carcinome de prostate humain dérivée d'une xénogreffe qui a été réimplantée en série chez la souris, après une régression suivie d'une rechute induite par la castration de la xénogreffe parentale CWR22 androgéno-dépendante. La lignée cellulaire exprime le RA et l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Elles sont hormonosensibles.

Les cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 contenant 2mM de L-Glutamine (Lonza BA-702F) supplémenté par 10% de sérum de vœux fœtal (Lonza) et 3 % de Pénicilline/Streptomycine et incubées dans une étuve humide, à 37°C et en présence de 5% de CO_2 .

3.4.3. Etude du flux autophagique, lipophagique et de la prolifération

3.4.3.1. Western blot

Après lavage au PBS, les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 1% de Triton, 0.1% de SDS, 0.05% de désoxycholate de sodium, 1mM d'EDTA, 50 mM de Tris pH 7.4, 150 mM de NaCl supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Après centrifugation (10 000 x G pendant 10 min à 4 ° C) pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant a été recueilli. Les protéines totales ont été quantifiées par un dosage colorimétrique avec le kit Pierce™ BCA selon le protocole du fabricant. Les protéines diluées dans du tampon Laemmli ont été déposées sur des gradients Mini-Protean TGX 4-20% (Biorad, France) et transférées sur membrane PVDF en utilisant le kit de transfert Trans-Blot Turbo RTA et le système de transfert Trans-Blot® Turbo (Biorad, France). Les membranes ont été saturées pendant 1 h à température ambiante avec 5% de lait écrémé puis incubées la nuit avec les anticorps primaires LC3 / MAP1LC3B (NB600-1384, Novusbio) et p62 / SQSTM1 (H00008878-M01, Novusbio). Après lavage au TTBS les membranes ont été incubées pendant une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires conjugués à la HRP anti-souris (Santa Cruz, France) et anti-lapin (Jackson Immunoresearch Interchim, France). Les dépôts ont été normalisés à l'aide de l'anticorps anti- β -actine-HRP (Santa Cruz, France). La chimioluminescence a été détectée avec le kit Thermofisher SuperSignal West Pico Plus. La révélation a été effectuée en utilisant l'imageur LAS-4000 de GE FUJIFILM et l'analyse en utilisant ImageJ. Le flux autophagique est calculé par la soustraction de la quantité de protéine LC3 avec et sans chloroquine. La chloroquine empêche la formation des autophagolysosomes en inhibant la Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1) des lysosomes (figure 3). Le flux autophagique et la quantité de protéine p62 sont normalisés au contrôle sans co-culture.

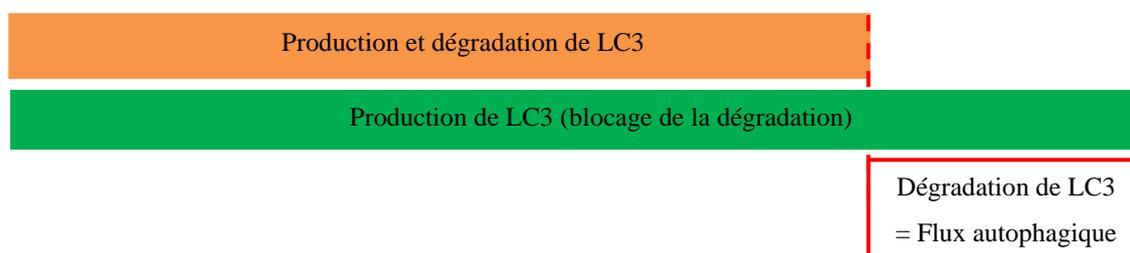


Figure 3 : le flux autophagique représente la différence de quantité de protéines LC3 avec et sans chloroquine, un inhibiteur de l'autophagie.

3.4.3.2. Microscopie

L'huile rouge a été utilisée pour colorer les lipides neutres dans les cellules cancéreuses prostatiques. Les cellules cultivées sur des lamelles de verre ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (PFA 4%) pendant 15 minutes. Après 3 lavages avec du PBS et 3 lavages avec de l'eau distillée, les cellules ont été colorées avec une solution d'huile rouge (stock 0,5% dans de l'isopropanol puis diluée 6/10 dans de l'eau et filtrée) pendant 15 minutes. Les puits ont été lavés 5 fois avec de l'eau pour éliminer l'excès de solution. Les lamelles ont été montées avec le milieu de montage Vectashield Vibrance avec Dapi (Eurobio) pour colorer les noyaux. Les lames ont été visualisées avec un microscope d'épifluorescence Nikon TI-S (France). L'intensité du marquage des GL a été analysée avec ImageJ et normalisée par le nombre de noyaux par image et au contrôle sans co-culture. Le flux de GL (lipophagie) correspond à la quantité de GL accumulées en présence de chloroquine (soustraction intensité de GL avec et sans chloroquine).

La DQ-BSA (invitrogen) a été ajoutée au milieu de culture 1 h avant la fin de l'expérience de co-culture à 10 mg / ml. Après fixation dans du PFA 4% pendant 15 minutes, les préparations ont été montées avec du milieu de montage Prolong™ antifade avec Dapi (invitrogen). Les lames ont été visualisées avec un microscope d'épifluorescence Nikon TI-S (France). L'intensité du marquage de la DQ-BSA, analysée avec ImageJ et normalisée au nombre de noyaux correspond à l'activité de dégradation intracellulaire par l'autophagie.

Après 48h de co-culture entre adipocytes matures de patients et lignées carcinomateuses prostatiques, le milieu de culture et les adipocytes matures ont été retirés du puit à l'aide d'une pipette Pasteur en verre reliée à un système d'aspiration branché sur le vide du laboratoire. Le puit a été lavé 3 fois dans du PBS, puis les cellules carcinomateuses adhérentes à la lamelle en verre fixées à l'aide de PFA 4%. Après 20 minutes de fixation au PFA 4%, le puit a été lavé 3 fois dans du PBS. 150 µL d'une solution d'anticorps anti-MIB1 ou Ki67 dilués à 1 :1000 dans une solution de TritonX100 3% et Donkey Serum 10% a été déposé et incubé 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, une solution de révélation a été déposée et incubée 30 minutes à température ambiante. Les lamelles ont été rincées puis montées sur des lames en verre à l'aide d'un milieu de montage adapté. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope.

3.5. Analyses statistiques :

Les comparaisons entre groupes ont été effectuées à l'aide de tests du Chi^2 pour les variables catégorielles et par les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et de test de rang de Wilcoxon pour les variables continues. Les variables continues ont été corrélées à l'aide du test de corrélation non paramétrique de Spearman et les sens de corrélation obtenus à l'aide de régression simple. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. La significativité des tests était retenue pour des valeurs de $p < 0.05$.

4. RÉSULTATS

4.1. Expression tumorale des marqueurs de l'autophagie et des GL

4.1.1. Expression intraprostatique des marqueurs de l'autophagie et des GL dans la cohorte des CaP pT2/pT3 (N=314)

L'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL en localisation intraprostatique des CaP de la cohorte pT2/pT3 est exposée dans le tableau suivant :

	p62	LC3	PLIN
-	183 (58%)	203 (69%)	120 (49%)
+	104 (33%)	83 (28%)	101 (42%)
++	27 (9%)	8 (3%)	22 (9%)
TOTAL	314	294	243

Tableau 1 : évaluation de l'intensité de l'immunomarquage des anticorps dirigés contre des marqueurs de l'autophagie (LC3, p62) et des GL (PLIN) dans le contingent intraprostatique de cancers de prostate pT2/pT3 (N=314)

4.1.2. Corrélation entre eux des marqueurs de l'autophagie et des GL des CaP des cohortes pT2/pT3 (N=314) et pT3 (N=123)

Les corrélations entre les marqueurs de l'autophagie et des GL des cohortes pT2/pT3 (N=314) et T3 (N=123) sont exposées dans le tableau suivant :

	CaP cohorte pT2-T3	CaP cohorte pT3
p62/LC3	0,0001 (↑)	0,0001 (↑)
p62/PLIN	0,0001 (↑)	0,0385 (↑)
LC3/PLIN	0,0001 (↑)	0,0001 (↑)

Tableau 2 : Valeur de p (test du Khi 2) et sens des corrélations des marqueurs de l'autophagie (p62, LC3) et des GL (PLIN).

Il existe une corrélation positive entre les deux marqueurs de l'autophagie p62 et LC3 dans les cohortes CaP pT2/pT3 et CaP pT3. Nous constatons de plus dans les 2 cohortes une corrélation positive entre l'expression de la PLIN et celle des marqueurs de l'autophagie. Il semble donc exister un lien entre les protéines impliquées dans l'autophagie et celles des GL.

4.2. Corrélation des marqueurs de l'autophagie et des GL avec les marqueurs d'agressivité des CaP et l'expression du RA

4.2.1. Corrélation des marqueurs de l'autophagie et des GL avec les marqueurs d'agressivité des CaP

Les corrélations des marqueurs de l'autophagie et des GL avec les marqueurs d'agressivité dans les cohortes de CaP pT2/pT3 et dans la cohorte p T3 sont exposées dans les tableaux suivants :

	p62	LC3	PLIN
TNM	0,08	<0,0001 (↑)	0,13
ISUP	0,0002 (↑)	0,0139 (↑)	0,8
Ki67	<0,0001 (↑)	0,0015 (↑)	0,2
Zeb1	0,0003 (↑)	0,0086 (↑)	0,3

Tableau 3 : Cohorte pT2/pT3 (N=314) : valeurs de p (test du Khi2) et sens de la corrélation entre marqueurs de l'autophagie (p62, LC3), des GL (PLIN) et de l'agressivité des CaP (stade TNM, score ISUP, indice de prolifération (Ki67), marqueur de la TEM (Zeb1)).

	p62	LC3	PLIN
Ki67	NS	0,0061 (↑)	NS
Zeb1	NS	0,0014 (↑)	0,0118 (↑)

Tableau 4 : Cohorte pT3 (N=123) : valeurs de p (test du Khi 2) et sens de la corrélation des marqueurs de l'autophagie (p62, LC3), des GL (PLIN) et marqueurs d'agressivité des CaP (indice de prolifération (Ki67), marqueur de la TEM (Zeb1)).

Pour étudier le lien entre agressivité du CaP et autophagie/lipophagie, nous avons corrélé l'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL aux marqueurs de l'agressivité des CaP dans les deux cohortes (tableaux 3 et 4). Dans la cohorte pT2/pT3, l'expression de LC3 est positivement corrélée au stade pTNM, au score ISUP (figure 1A et 1B), à l'index de prolifération Ki67 et à l'expression de Zeb1. L'expression de p62 est également corrélée positivement au score ISUP (p=0,0002) (figure 1C et 1D), au Ki67 (figure 2A et 2B) et à Zeb1 (figure 2C et 2D). Dans la cohorte pT3, l'expression de LC3 est positivement corrélée à l'index de prolifération Ki67 et à l'expression de Zeb1. La PLIN n'est pas significativement corrélée aux marqueurs d'agressivité, sauf à l'expression de Zeb1 dans la cohorte pT3.

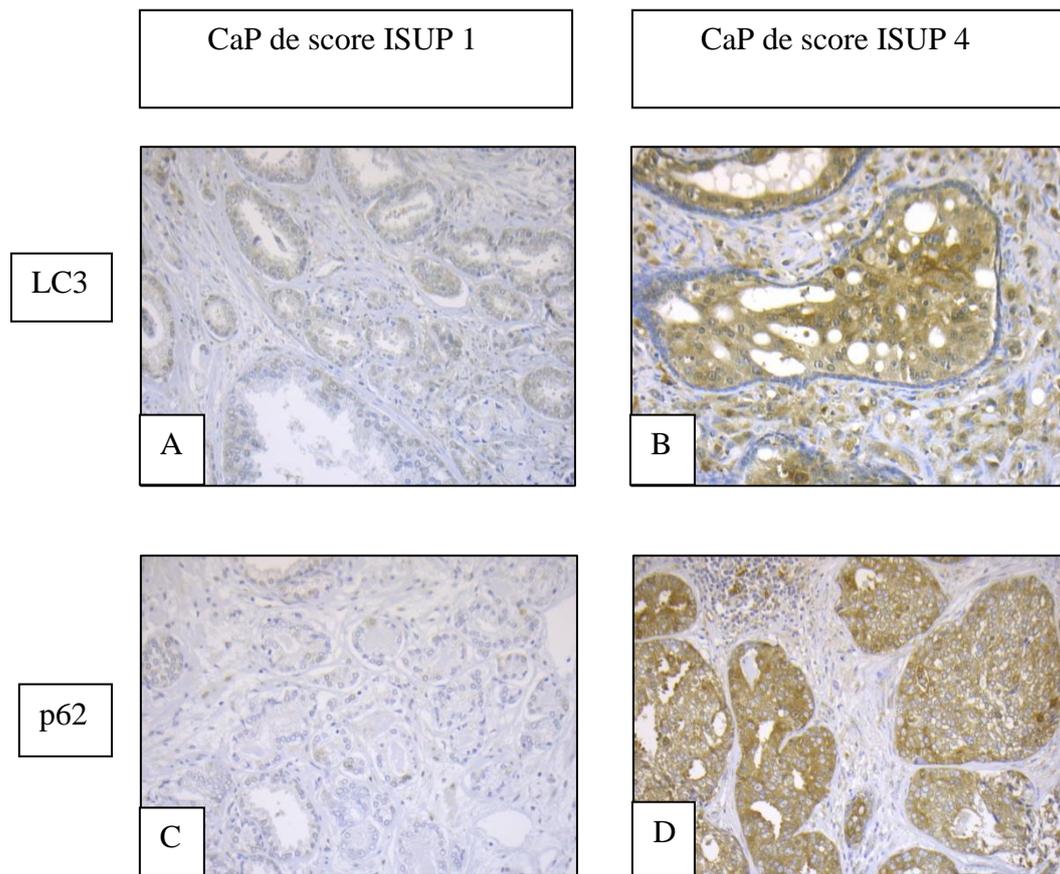


Figure 1 : immunomarquage faible des protéines de l'autophagie LC3 et p62 dans des CaP de score ISUP bas (A et C, x20) et immunomarquage fort dans les CaP de score ISUP élevé (B, x40 et D, x20)

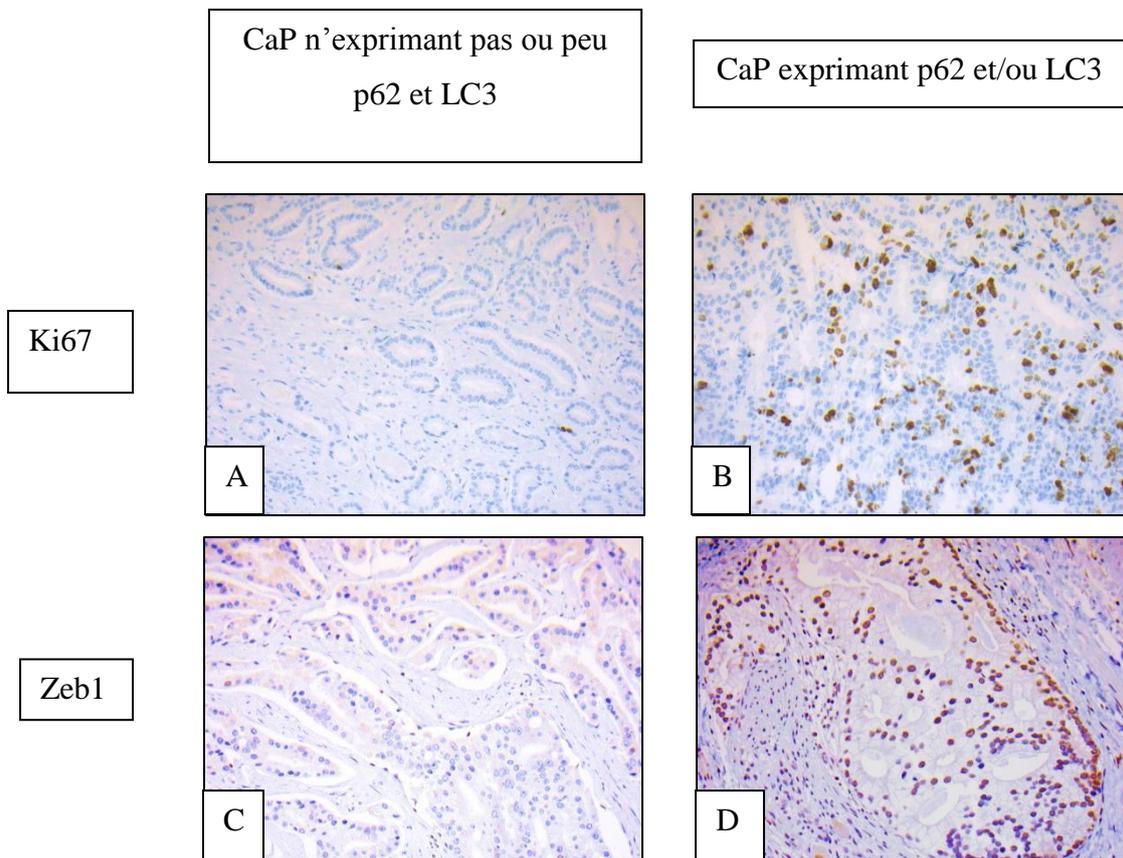


Figure 2 : Une expression absente ou faible de p62 et de LC3 est associée à un indice de prolifération Ki67 faible (A, X20) et à une absence de marquage de Zeb1 (C, x40) ; Dans les CaP exprimant LC3 et/ou p62, le taux de prolifération est plus élevé (B, x20) et Zeb1 est fréquemment exprimé (D, x40).

4.2.2. Evaluation des GL sur coupes de CaP congelés et corrélation avec les marqueurs d'agressivité

La coloration par le rouge à l'huile met en évidence les lipides neutres des GL. Nous ne retrouvons aucune coloration dans les glandes prostatiques normales (figure 3A et 3B). A contrario, on retrouve une quantité variable de GL au sein des cytoplasmes des cellules carcinomateuses prostatiques allant d'un marquage faible (figure 3B), modéré (figure 3C, 3D) à fort (figures 3E, 3F).

Nous retrouvons une corrélation positive entre la quantité de GL et le score ISUP ($p=0,0374$) (tableau 5, figure 3).

	Quantité de GL
TNM	0,3
ISUP	0,0374 (↑)

Tableau 5 : valeur de p (test du Khi 2) et sens de la corrélation entre quantité de GL mise en évidence par une coloration à l'huile rouge, le stade TNM et le score ISUP de cancers de prostate (N=28).

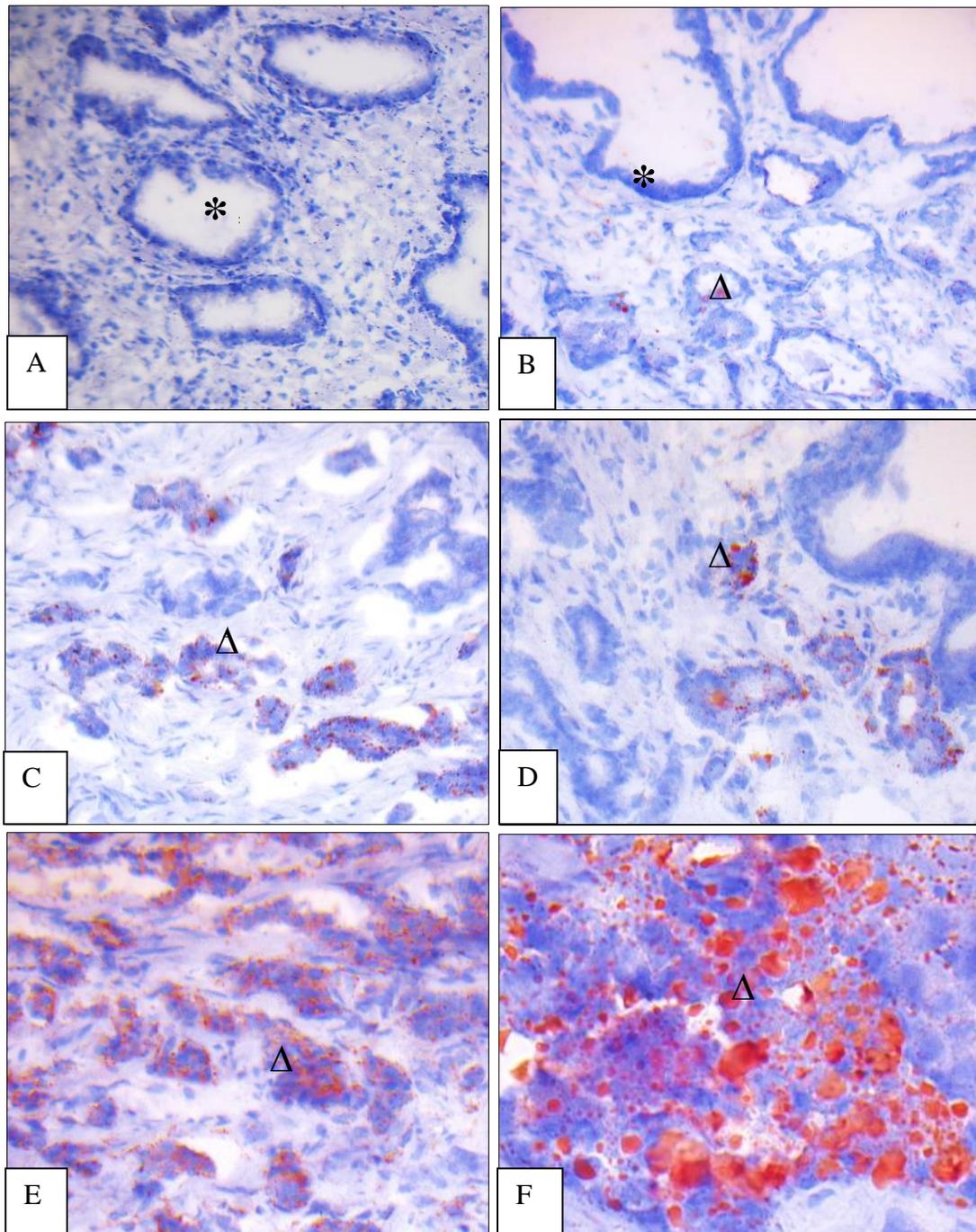


Figure 3 : coloration à l'huile rouge **A :** Absence de marquage des glandes prostatiques normales (*) (x20) ; **B :** marquage faible des glandes prostatiques carcinomateuses (Δ) dans un CaP de score ISUP1, et absence de marquage des glandes prostatiques normales (*) (x20) ; **C et D:** glandes carcinomateuses (Δ) avec une quantité modérée de GL dans des CaP de score ISUP3 (x20) ; **E et F:** glandes carcinomateuses (Δ) avec de nombreuses GL dans des CaP de score ISUP 5 (E, x20 et F, x40).

4.3. Corrélation des marqueurs de l'autophagie et des GL avec l'expression du récepteur aux androgènes (RA)

Il existe une corrélation positive entre l'expression du RA et l'expression de p62 et de la PLIN (tableau 6, figure 4). Il existe une association entre le RA, l'autophagie et les GL dans les cancers de prostate.

	P62	LC3	PLIN
RA Score	0,0021 (↑)	0,4	<0,0001 (↑)

Tableau 6 : valeurs de p (Khi 2) et sens de la corrélation entre marqueurs de l'autophagie (p62, LC3), des GL (PLIN) et l'expression du RA (RA score) des CaP de la cohorte T2/T3 (n=314).

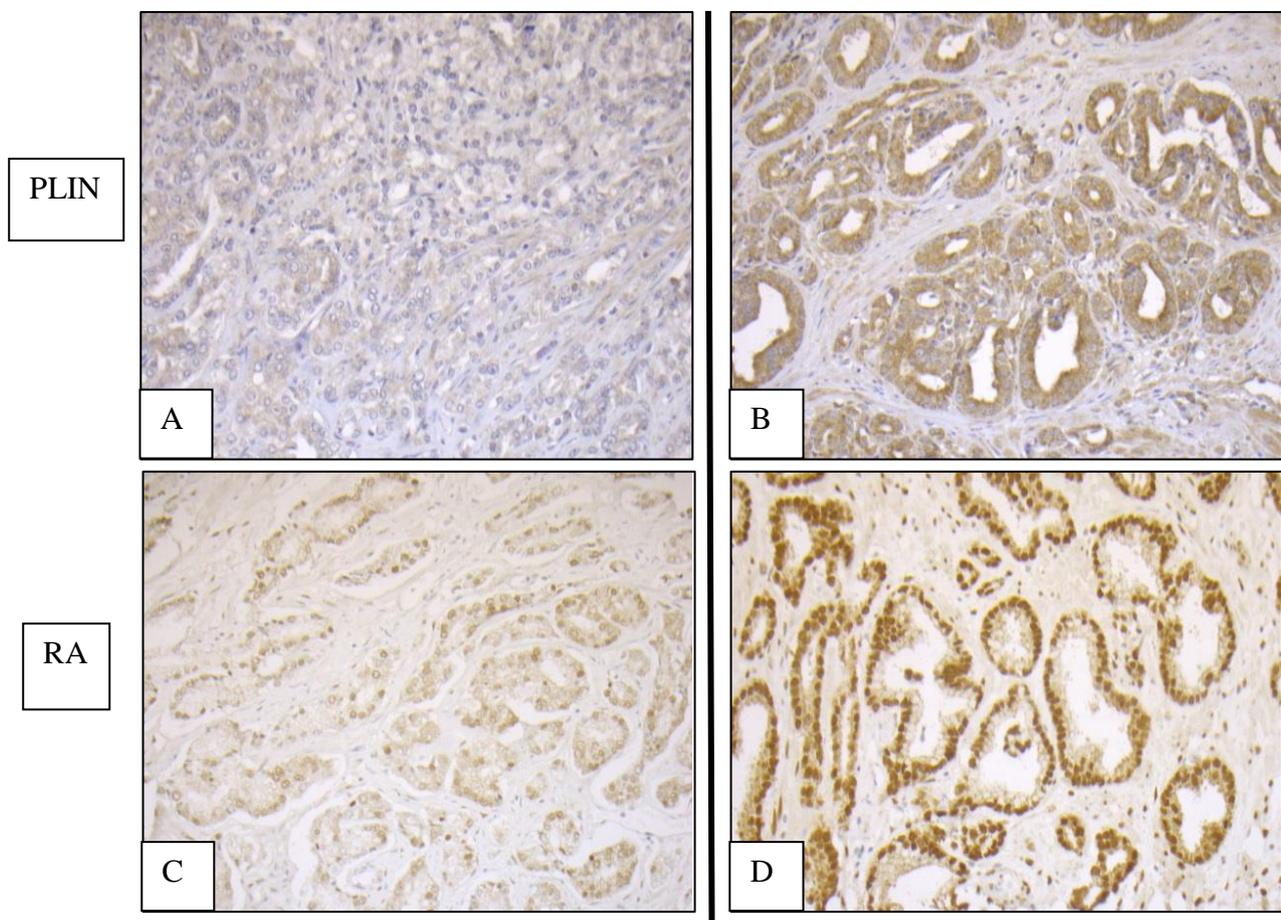


Figure 4 : Une expression absente ou faible de PLIN (A, x20) est associée à une faible expression du RA (C, x40), alors que dans les CaP exprimant fortement PLIN (B, x20) l'expression du RA est intense (D, x40)

4.4. Comparaison de l'expression intra et extraprostatique des marqueurs de l'autophagie et des GL des CaP de la cohorte pT3

Nous avons évalué et comparé l'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL dans le contingent intraprostatique et extraprostatique de cancers de prostate au stade pT3 (figure 5 et tableau 7). Nous constatons une expression plus élevée de p62 (figure 5A et 5B), LC3 (figure 5C et 5D) et PLIN (figure 5E et 5F) dans le contingent extraprostatique des cancers de prostate par rapport au contingent intraprostatique chez les mêmes patients.

Intensité	P62			LC3			PLIN		
	-	+	++	-	+	++	-	+	++
Intraprostatique	19	56	36	11	55	41	76	31	1
Extraprostatique	1	30	53	2	31	47	32	39	5
Valeur de P (χ^2)	<0,0001			0,0081			0,0003		

Tableau 7 : Immunomarquage des protéines de l'autophagie (LC3, p62) et des GL (PLIN) dans les contingents intraprostatiques et extraprostatiques des cancers pT3 (N=123)

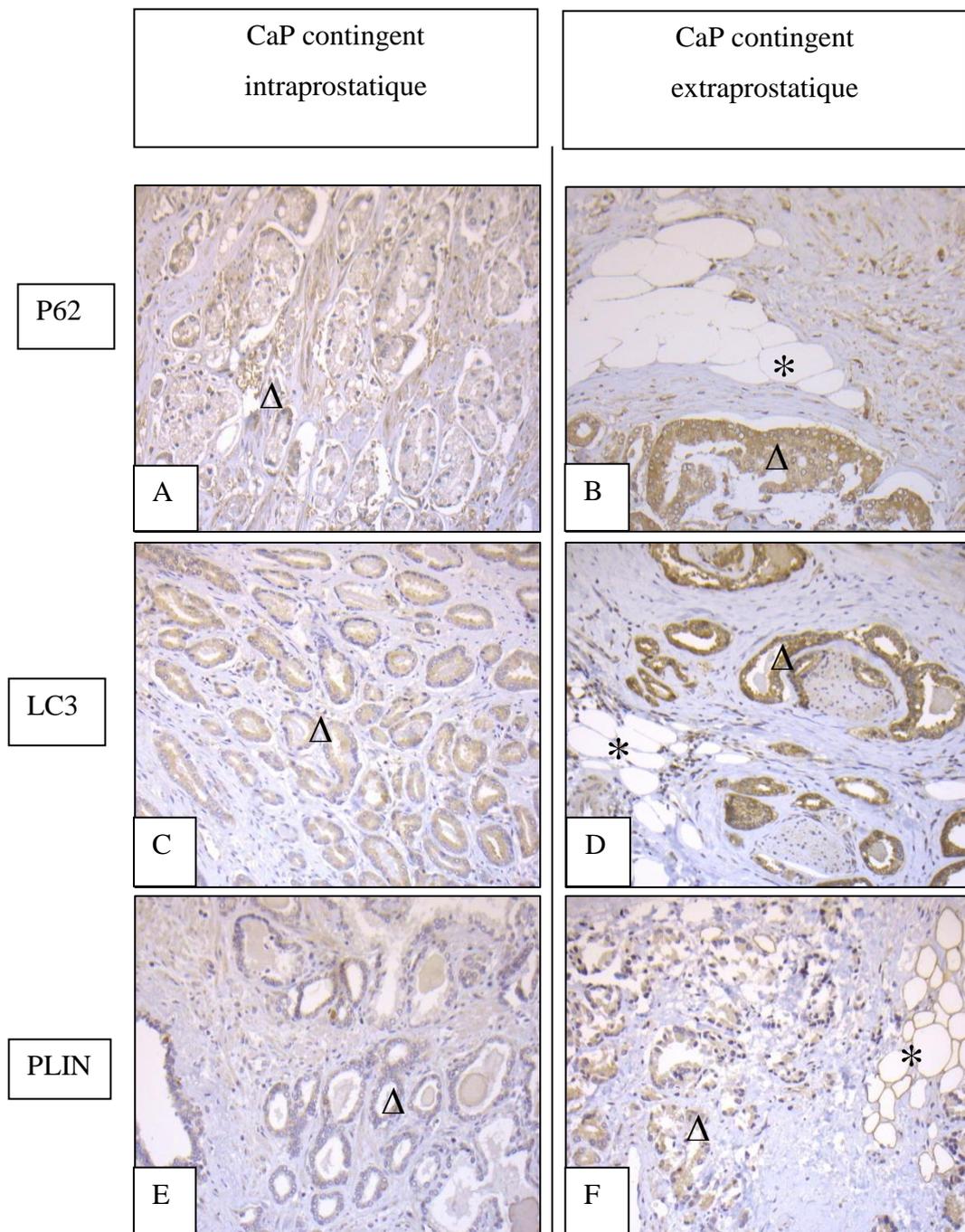


Figure 5 : Immunomarquage des protéines de l'autophagie p62 et LC3 et de la protéine des GL PLIN dans les contingents intra et extraprostatiques de CaP (x20). Dans les contingents extraprostatiques, les glandes tumorales (Δ) sont au contact des adipocytes du TAPP (*).

4.5. Co-cultures

4.5.1. Corrélations entre eux des marqueurs de l'autophagie et des GL *in vitro* en présence d'adipocytes

4.5.1.1. Lignée PC3

Nous retrouvons une corrélation positive entre les marqueurs de l'autophagie p62 et LC3 ($p=0,02$) et une tendance à la corrélation positive entre le marqueur de l'autophagie p62 et la quantité de GL ($p=0,07$).

4.5.1.2. Lignée 22RV1

Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'expression de p62 avec la quantité de LC3 et de GL (respectivement $p=0,5$ et $p=0,4$).

4.5.2. Influence de la présence d'adipocytes du TAPP sur l'autophagie dans des lignées de CaP

4.5.2.1. Lignée PC3

L'autophagie est mesurée *in vitro* par l'analyse du flux de LC3 en association avec la quantité de la protéine p62. Le flux de LC3 traduit la consommation de LC3 par le processus de l'autophagie (différence avec et sans inhibiteur de l'activité des lysosomes) et permet d'estimer l'activité de l'autophagie. Le flux de LC3 est associé avec la quantité de p62 qui s'accumule lorsque l'autophagie est bloquée. Dans les cellules PC3, on constate une tendance à l'augmentation de la quantité de LC3 en présence d'adipocytes du TAPP ($p=0,09$). En revanche, le flux de LC3 (différence avec et sans chloroquine) est moins important dans les cellules du CaP en présence d'adipocytes ($p=0,04$) (figure 6, tableau 8). Il existe donc une diminution de l'activité de l'autophagie en présence d'adipocytes. Il existe une tendance à l'accumulation de p62 qui n'est pas significative ($p=0,09$).

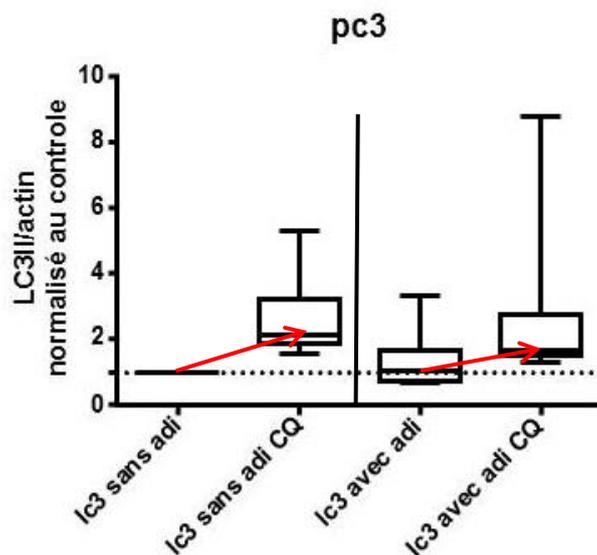


Figure 6 : Distribution de la quantité de LC3 dans la lignée de CaP PC3 en co-culture ou non avec des adipocytes issus du TAPP de patients porteurs de CaP. Le flux de LC3 (flèche) est mesuré à l'aide de la chloroquine (CQ), un inhibiteur de l'autophagie. Il évalue l'activité de l'autophagie.

4.5.2.2. Lignée 22RV1

Dans la lignée hormonosensible de CaP 22RV1, on retrouve également une tendance à l'augmentation de la quantité de LC3 en présence d'adipocytes du TAPP ($p=0,09$) et une baisse du flux de LC3 et donc une baisse de l'activité de l'autophagie ($p=0,005$) (figure 7, tableau 8).

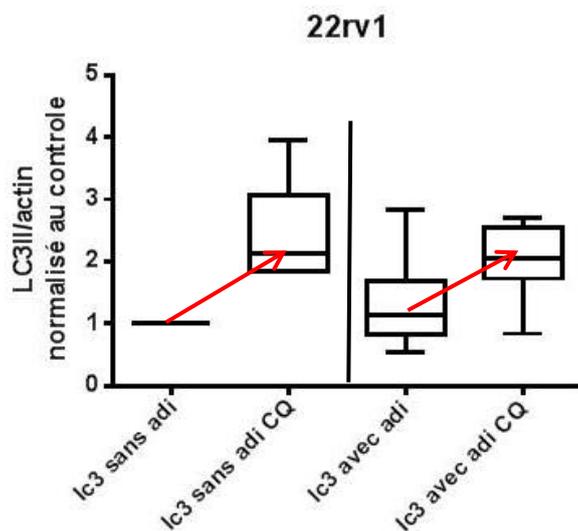


Figure 7 : Distribution de la quantité de LC3 dans la lignée de CaP 22RV1 en co-culture ou non avec des adipocytes issus du TAPP de patients porteurs de CaP. Le flux de LC3 (flèche) est mesuré à l'aide de la chloroquine (CQ), un inhibiteur de l'autophagie et permet d'évaluer l'activité de l'autophagie. En présence d'adipocytes, il existe une hausse de la quantité de LC3 associée à une baisse du flux de LC3 donc de l'autophagie.

4.5.3. Influence de la présence d'adipocytes du TAPP sur la lipophagie et l'agressivité des lignées de CaP

4.5.3.1. Lignée PC3

De la même manière que le flux autophagique, il est possible de calculer le flux de lipophagie par la différence du nombre de GL avec et sans inhibiteur de l'activité des lysosomes, la chloroquine. Ce flux de GL traduit la quantité de GL dégradées par la lipophagie en un temps donné. En présence d'adipocytes du TAPP, la quantité de GL est significativement plus élevée qu'en absence d'adipocytes ($p=0.003$), signe d'une accumulation d'AG dans les cellules cancéreuses. Le flux de GL est significativement plus élevé, ce qui traduit une augmentation de l'activité de la lipophagie dans les cellules du CaP ($p=0,01$) (figure 8, tableau 8). Il existe une tendance à l'augmentation de la prolifération cellulaire ($p=0,09$) en présence d'adipocytes du TAPP.

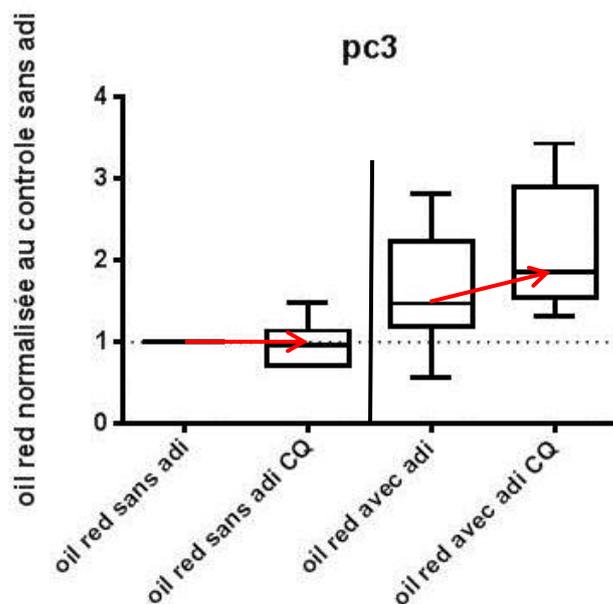


Figure 8 : Quantité de GL dans des lignées de PC3 en présence ou non d'adipocytes issus du TAPP de patients porteurs de CaP. Le flux de GL (flèche) est mesuré à l'aide de la chloroquine (CQ), un inhibiteur de l'autophagie. Il permet d'évaluer l'activité de la lipophagie. On observe une augmentation de la lipophagie dans les cellules des lignées PC3 en présence d'adipocytes.

4.5.3.2. Lignée 22RV1

En présence d'adipocytes du TAPP, il existe une tendance à l'augmentation de la quantité de GL par rapport à la condition contrôle (p=0.09). Cependant, il n'est pas mis en évidence de différence d'activité de la lipophagie avec ou sans adipocytes (p=0.26) (figure 9). Il existe une augmentation de la prolifération cellulaire du CaP (p= 0,001) en présence d'adipocytes du TAPP (tableau 8).

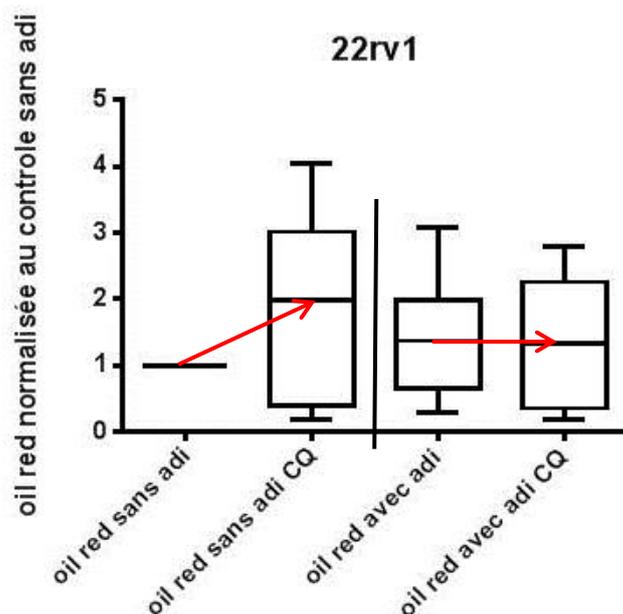


Figure 9 : Quantité de GL avec et sans adipocytes, et flux de GL (flèche) évalué à l'aide de la chloroquine (CQ), un inhibiteur de l'autophagie. La valeur du flux de GL correspond à l'activité de la lipophagie et est représentée par la flèche.

	PC3 avec adipocytes	22RV1 avec adipocytes
Prolifération	↑ (p=0,09)	↑ (p=0,001)
Quantité de p62	NS (p=0,2)	NS (p=0,5)
Quantité de LC3	↑(p=0,09)	↑(p=0,09)
Quantité de GL	↑(p=0,01)	↑(p=0,09)
Flux de LC3/autophagie	↓ (p= 0,04)	↓ (p=0,005)
Flux de GL/lipophagie	↑(p=0,01)	NS (p=0,26)

Tableau 8 : tableau récapitulatif de l'influence de la présence d'adipocytes sur des marqueurs d'autophagie et de la lipophagie, ainsi que sur les flux.

5. DISCUSSION

LC3 et p62 sont les marqueurs les plus utilisés pour évaluer l'autophagie dans les tissus. Nous avons mis en évidence dans les tissus cancéreux prostatiques que ces marqueurs, bien qu'exprimés de façon variable, étaient corrélés non seulement entre eux, mais également avec le marqueur des GL PLIN. Nous avons également retrouvé ce type de corrélations dans les cellules de la lignée de CaP PC3, l'expression de p62 étant corrélée à celle de LC3 et à la quantité de GL. Une telle association entre les deux marqueurs LC3 et p62 a déjà été montrée par immunohistochimie sur TMA dans le cancer du poumon (45). La corrélation de ces marqueurs avec l'expression de la PLIN (*in vivo*) ou la quantification des GL par l'huile rouge (*in vitro*) suggère l'existence d'une lipophagie fonctionnelle dans les cellules cancéreuses prostatiques. Ce lien semble spécifique de la lipophagie et ces données appuient des résultats *in vitro* qui démontraient l'existence d'une lipophagie dans le CaP (42).

Néanmoins, ce lien ne préjuge pas de la variation de l'activité autophagique/lipophagique dans ces cellules. La lipophagie comme l'autophagie sont des processus dynamiques difficilement évaluables à un temps donné dans les cellules et les tissus sur les seuls critères d'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL. L'expression à un temps donné de p62, LC3 ou PLIN ne traduit que la différence entre la production et l'utilisation de ces protéines, qui sont dégradées au cours du processus. En effet, une expression augmentée peut correspondre soit une augmentation de production, soit une utilisation moindre. Concernant p62, il est courant d'observer *in vitro* qu'une accumulation de p62 est associée à une diminution de sa dégradation par l'autophagie (46). Seules des études fonctionnelles *in vitro* sont donc susceptibles d'évaluer l'activité c'est à dire le flux autophagique (flux de LC3) et lipophagique (flux de GL).

En ce qui concerne les marqueurs utilisés, p62, outre sa fonction dans l'autophagie, a des domaines qui interagissent avec plusieurs molécules dont mTORC1, la voie PI3K/AKT/mTORC1 étant une des voies de signalisation s'activant au cours de l'histoire naturelle du CaP. Ainsi, cette fonction supplémentaire de p62 doit être prise en compte dans l'interprétation de nos résultats. Ces données pourront être complétées par l'utilisation d'une autre protéine cargo de l'autophagie telle que l'optineurine. LC3 est un marqueur connu de l'autophagie et nous avons utilisé un anticorps dirigé contre l'isoforme B de LC3 alors qu'il en existe 3 isoformes (A, B et C). Il est possible que les 3 isoformes de LC3 soient impliquées dans l'autophagie. La majorité des études réalisées sur l'autophagie utilisent l'anticorps anti-LC3B. En outre, dans le tissu prostatique, l'expression de LC3C est bien moindre que celle de LC3A et B.

Nous avons observé que l'expression des marqueurs d'autophagie LC3 et p62 était plus importante dans les tumeurs de haut grade (score ISUP élevé), et que LC3 était plus exprimé (en intraprostatique) dans les cancers pT3 par rapport aux cancers pT2. L'association entre l'expression de p62 par les cellules cancéreuses et des marqueurs d'agressivité et de progression du CaP (score de Gleason élevé et stade pT3) a déjà été rapportée (47). Nous avons également retrouvé une association entre l'expression de p62 et LC3 avec d'une part le taux de prolifération des cellules cancéreuses, et d'autre part l'expression du facteur de transcription clé de la TEM Zeb 1. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente montrant *in vitro* qu'une forte expression de p62 entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire, et induit une TEM avec une augmentation de la migration (48). Une forte expression des marqueurs autophagiques p62 et LC3, qu'elle soit liée à une augmentation de production ou à une baisse de consommation (altération du processus autophagique) est donc bien associée à des marqueurs d'agressivité et de progression dans le CaP. Le rôle de p62 dans ces processus oncogéniques est sans doute plus complexe qu'une « simple » dérégulation de l'autophagie, eu égard à son implication dans de nombreuses voies de signalisation (33).

Les GL sont évaluées sur coupes tissulaires soit par la coloration de l'huile rouge soit par l'expression du marqueur protéique PLIN. Nous avons observé une quantité plus importante de GL dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal de prostate, phénomène également rapporté dans d'autres type de cancers (poumon, colorectal) et évoquant un mécanisme en lien avec la tumorigénèse (49). De plus, nous avons constaté une association entre la quantité de GL présente dans les cellules cancéreuses et un score ISUP élevé. Ce type d'association entre la quantité de GL et des marqueurs d'agressivité tumorale a déjà été décrite dans le cancer du sein et du larynx, où la quantité de GL est également associée à la chimiorésistance (28). Nous constatons de plus dans les CaP pT3 que l'expression de PLIN est corrélée à celle de Zeb1, ce qui suggère un rôle des GL dans le mécanisme de TEM. Le rôle des GL dans le processus de TEM et la progression métastatique ont récemment été montrés dans plusieurs modèles de cancers (50). Le lien entre GL et agressivité des cancers peut s'expliquer par une mobilisation des GL et donc une lipophagie plus active. Or, la lipophagie est un mécanisme pouvant contribuer ou entraver le développement des cancers. Par exemple, dans le cancer du sein et le cancer du rein à cellules claires, l'activation de la lipophagie est en lien avec une diminution de l'agressivité du cancer par diminution de la lipotoxicité et des ROS (28). A contrario, dans le CaP, l'étude de Kaini et *al.* menée *in vitro*, démontrait une activation de la lipophagie lors d'une privation androgénique expliquant les mécanismes d'adaptation et de résistance des CaP aux hormonothérapies (42).

En complément du lien retrouvé entre les GL et les marqueurs d'agressivité du CaP, nous constatons également une association forte entre l'expression de p62 et de PLIN et celle du RA dans les cellules cancéreuses. Il a précédemment été montré que l'activation du RA par les androgènes dans les cellules de la lignée androgéno-dépendante LNCaP induisait une accumulation de GL, vraisemblablement en augmentant la lipogénèse *de novo* (51). Plus récemment, il a été rapporté que l'utilisation d'un inhibiteur transcriptionnel du RA diminuait l'accumulation de GL dans les lignées cellulaires de CaP via une inhibition de la lipogénèse *de novo* (52). Prises ensembles, ces données confirment l'implication du RA dans le métabolisme lipidique des cellules cancéreuses prostatiques.

Au sein de CaP de stade pT3, nous avons mis en évidence une expression plus importante des marqueurs de l'autophagie et des GL dans les zones tumorales extraprostatiques, à proximité du TAPP, par rapport aux zones tumorales intraprostatiques, situées à distance du TAPP. Ceci suggère un rôle du TAPP dans l'accumulation des GL et dans le métabolisme lipidique. L'implication du TAPP dans l'agressivité du CaP est fortement suggérée par de nombreuses études, via une production d'hormones, de médiateurs inflammatoires, ou un transfert de lipides (12). Ainsi, notre équipe a précédemment démontré que certains profils lipidiques du TAPP, dépendants de la composition en AG, sont associés à des CaP plus agressifs et à une augmentation de la migration des cellules cancéreuses *in vitro* (14). Des expériences de co-cultures ont déjà souligné le rôle du tissu adipeux péri-tumoral dans le développement des cancers. Dans le cancer du sein, les cellules souches dérivées d'adipocytes humains activent des mécanismes de chimiorésistance dans les cellules tumorales (53). Dans le cancer de l'ovaire, il a été montré que les adipocytes de l'omentum, un tissu adipeux intra-abdominal, sont capables en co-culture de transférer directement des lipides dans les cellules tumorales, ce phénomène induisant une augmentation de la lipolyse et de la croissance tumorale (36). Dans la présente étude, l'adjonction d'adipocytes provenant du TAPP à des cultures de lignées tumorales prostatiques augmente la quantité de GL dans les cellules cancéreuses PC3, ce qui renforce les résultats que nous avons observés *in vivo* chez l'homme. Il reste néanmoins à déterminer s'il s'agit d'un transfert direct de lipides à partir des adipocytes ou d'une augmentation de la lipogénèse *de novo*.

Nous avons précédemment souligné que seules les études *in vitro* sont capables de déterminer l'activité réelle de l'autophagie par le flux de LC3, et de la lipophagie par le flux des GL. Nous avons constaté que la co-culture avec les adipocytes du TAPP induisait une diminution de l'autophagie dans les 2 lignées PC3 et 22RV1, avec néanmoins une discrète augmentation non significative de la quantité de LC3. A l'inverse, la co-culture avec les

adipocytes du TAPP induisait une augmentation de la lipophagie dans les cellules de la lignée PC3. Ces résultats couplés de l'autophagie et de la lipophagie sont tout à fait novateurs, n'ayant jamais été décrits non seulement dans le CaP mais également dans d'autres types de cancers. Ils suggèrent que l'activation des processus d'autophagie générale et de lipophagie puissent avoir des implications différentes voire inverses dans le métabolisme des cellules cancéreuses prostatiques. Les résultats différents obtenus avec les cellules PC3 et les 22RV1 pourraient s'expliquer par une différence d'expression du RA et de la sensibilité aux hormones.

La lipophagie est un mécanisme métabolique découvert récemment, pouvant constituer un moyen à disposition du CaP pour lui permettre de s'adapter à un microenvironnement riche en lipides. Le TAPP influence manifestement l'activité de la lipophagie et permet l'adaptation et la survie des cellules du CaP à leur microenvironnement. Ces données pourraient expliquer les sites métastatiques préférentiels du CaP par un « tropisme » lipidique : l'os à proximité de la moelle osseuse riche en adipocytes et les ganglions inguinaux le plus souvent en involution adipeuse.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au total, nos résultats suggèrent l'existence d'une lipophagie fonctionnelle dans les tissus prostatiques tumoraux chez l'homme. L'expression des marqueurs de l'autophagie et des GL est associée à des critères d'agressivité du CaP (score ISUP et stade pTNM), à une prolifération cellulaire élevée, ainsi qu'au processus de TEM. Il existe de plus une expression différentielle de ces marqueurs au sein de mêmes tumeurs, avec une augmentation de leur expression dans les cellules cancéreuses situées à proximité ou au contact du TAPP. Le rôle des adipocytes du TAPP sur le métabolisme lipidique est confirmé en co-cultures, induisant une augmentation de la quantité de GL, une augmentation de la lipophagie et à l'inverse une diminution de l'autophagie en général.

Les mécanismes par lesquels les adipocytes induisent l'accumulation des GL (lipogénèse *de novo*, transfert de lipides) et l'activation de la lipophagie restent à être déterminés, notamment l'identification des protéines cargo spécifiques des GL. Une meilleure compréhension pourrait aboutir à la découverte de mécanismes spécifiques au CaP, permettant d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides.
2. Rozet F, Hennequin C, Beauval J-B, Beuzeboc P, Cormier L, Fromont-Hankard G, et al. French ccAFU guidelines - Update 2018-2020: Prostate cancer. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol*. 2018;28 Suppl 1:R81- 132.
3. D'Amico AV, Chen M-H, Roehl KA, Catalona WJ. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med*. 2004;351(2):125- 35.
4. Brimo F, Vollmer RT, Corcos J, Kotar K, Bégin LR, Humphrey PA, et al. Prognostic value of various morphometric measurements of tumour extent in prostate needle core tissue. *Histopathology*. 2008;53(2):177- 83.
5. 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;40(2):244- 52.
6. Grignon DJ. Prostate cancer reporting and staging: needle biopsy and radical prostatectomy specimens. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2018;31(S1):S96-109.
7. Yossepowitch O, Briganti A, Eastham JA, Epstein J, Graefen M, Montironi R, et al. Positive surgical margins after radical prostatectomy: a systematic review and contemporary update. *Eur Urol*. 2014;65(2):303- 13.
8. Carlsson SV, Tafe LJ, Chade DC, Sjoberg DD, Passoni N, Shariat SF, et al. Pathological features of lymph node metastasis for predicting biochemical recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*. 2013;189(4):1314- 8.
9. Shibata Y, Arai S, Koike H, Matsui H, Ito K, Honma S, et al. 938 Androgen production in periprostatic adipose tissue in prostate cancer patients. *Eur Urol Suppl*. 2012;11(1):e938- e938a.
10. Di Zazzo E, Galasso G, Giovannelli P, Di Donato M, Di Santi A, Cernera G, et al. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors. *Oncotarget*. 2016;7(1):193- 208.
11. 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;7:10230.
12. Nassar ZD, Aref AT, Miladinovic D, Mah CY, Raj GV, Hoy AJ, et al. Peri-prostatic adipose tissue: the metabolic microenvironment of prostate cancer. *BJU Int*. 2018;121 Suppl 3:9- 21.
13. Laurent V, Toulet A, Attané C, Milhas D, Dauvillier S, Zaidi F, et al. Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. *Mol Cancer Res*. 2019;17(3):821- 35.
14. 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;91:107- 15.

15. Liu Y, Zuckier LS, Ghesani NV. Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer Res.* 2010;30(2):369- 74.
16. Singh KK, Desouki MM, Franklin RB, Costello LC. Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. *Mol Cancer.* 2006;5:14.
17. 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;11(2).
18. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):763- 77.
19. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(15):6719- 25.
20. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell.* 2005;8(4):311- 21.
21. Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(7):519- 32.
22. Peck B, Schug ZT, Zhang Q, Dankworth B, Jones DT, Smethurst E, et al. Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer Metab.* 2016;4:6.
23. Yue S, Li J, Lee S-Y, 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;19(3):393- 406.
24. Kraemer FB, Khor VK, Shen W-J, Azhar S. Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;371(1- 2):15- 9.
25. Thiele C, Spandl J. Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(4):378- 85.
26. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res.* 2011;50(1):14- 27.
27. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009;458(7242):1131- 5.
28. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson A. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(3):582- 9.
29. Grahn THM, Zhang Y, Lee M-J, Sommer AG, Mostoslavsky G, Fried SK, et al. FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(2):296- 301.
30. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(6):759- 70.
31. Vegliante R, Di Leo L, Ciccarone F, Ciriolo MR. Hints on ATGL implications in cancer: beyond bioenergetic clues. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):1- 10.

32. Joffre C, Djavaheri-Mergny M, Pattingre S, Giuriato S. L'autophagie : le yin et le yang des cancers. *médecine/sciences*. 2017;33(3):328- 34.
33. Islam MA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
34. Spandl J, Lohmann D, Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C. Ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) localizes to lipid droplets and binds the E2 ubiquitin conjugase G2 (Ube2g2) via its G2 binding region. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5599- 606.
35. Rui Y-N, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, et al. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2015;17(3):262- 75.
36. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011;17(11):1498- 503.
37. Xu G, Jiang Y, Xiao Y, Liu XD, Yue F, Li W, et al. Fast clearance of lipid droplets through MAP1S-activated autophagy suppresses clear cell renal cell carcinomas and promotes patient survival. *Oncotarget*. 2016;7(5):6255- 65.
38. Zhao T, Ding X, Du H, Yan C. Lung Epithelial Cell-Specific Expression of Human Lysosomal Acid Lipase Ameliorates Lung Inflammation and Tumor Metastasis in *Lipa*(-/-) Mice. *Am J Pathol*. 2016;186(8):2183- 92.
39. Du H, Zhao T, Ding X, Yan C. Hepatocyte-Specific Expression of Human Lysosome Acid Lipase Corrects Liver Inflammation and Tumor Metastasis in *lal*(-/-) Mice. *Am J Pathol*. 2015;185(9):2379- 89.
40. Mukhopadhyay S, Schlaepfer IR, Bergman BC, Panda PK, Prahara PP, Naik PP, et al. ATG14 facilitated lipophagy in cancer cells induce ER stress mediated mitoptosis through a ROS dependent pathway. *Free Radic Biol Med*. 2017;104:199- 213.
41. Zhou K, Yao P, He J, Zhao H. Lipophagy in nonliver tissues and some related diseases: Pathogenic and therapeutic implications. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):7938- 47.
42. Kaini RR, Sillerud LO, Zhaorigetu S, Hu C-AA. Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells. *The Prostate*. 2012;72(13):1412- 22.
43. Panda PK, Patra S, Naik PP, Prahara PP, Mukhopadhyay S, Meher BR, et al. Deacetylation of LAMP1 drives lipophagy-dependent generation of free fatty acids by Abrus agglutinin to promote senescence in prostate cancer. *J Cell Physiol*. 2020;235(3):2776- 91.
44. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*. 2013;8(6):1149- 54.
45. Schläfli AM, Adams O, Galván JA, Gugger M, Savic S, Bubendorf L, et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(26):39544- 55.
46. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016;12(1):1- 222.

47. Burdelski C, Reisch V, Hube-Magg C, Kluth M, Minner S, Koop C, et al. Cytoplasmic Accumulation of Sequestosome 1 (p62) Is a Predictor of Biochemical Recurrence, Rapid Tumor Cell Proliferation, and Genomic Instability in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015;21(15):3471- 9.
48. Jiang X, Huang Y, Liang X, Jiang F, He Y, Li T, et al. Metastatic prostate cancer-associated P62 inhibits autophagy flux and promotes epithelial to mesenchymal transition by sustaining the level of HDAC6. *The Prostate.* 2018;78(6):426- 34.
49. Petan T, Jarc E, Jusović M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem.* 2018;23(8).
50. Corbet C, Bastien E, Santiago de Jesus JP, Dierge E, Martherus R, Vander Linden C, et al. TGF β 2-induced formation of lipid droplets supports acidosis-driven EMT and the metastatic spreading of cancer cells. *Nat Commun.* 23 2020;11(1):454.
51. Swinnen JV, Ulrix W, Heyns W, Verhoeven G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: Evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(24):12975- 80.
52. Singh KB, Hahm E-R, Pore SK, Singh SV. Leelamine Is a Novel Lipogenesis Inhibitor in Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(10):1800- 10.
53. Yeh W-L, Tsai C-F, Chen D-R. Peri-foci adipose-derived stem cells promote chemoresistance in breast cancer. *Stem Cell Res Ther.* 27 2017;8(1):177.

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le**

FONTAINE ALIX

67 pages ; 14 tableaux – 16 figures.

LIPOPHAGIE ET CANCER DE LA PROSTATE

Résumé :

Introduction : La progression du cancer de prostate (CaP) est marquée par l'infiltration du tissu adipeux périprostatique (TAPP), constitué d'adipocytes, par les cellules tumorales. La lipophagie, autophagie spécifique de lipides, pourrait permettre d'approvisionner ces cellules en énergie et favoriser leur progression. L'objectif est d'identifier des marqueurs de lipophagie dans le CaP, de les corrélés aux marqueurs d'agressivité, et d'évaluer l'influence des adipocytes du TAPP sur la lipophagie.

Matériel-Méthodes : Nous avons analysé par immunohistochimie sur un total de 438 CaP l'expression de marqueurs de l'autophagie (p62, LC3), des gouttelettes lipidiques (GL)(PLIN), du récepteur aux androgènes (RA), de prolifération (Ki67) et de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zeb1). Les GL ont également été évaluées par l'huile rouge sur coupes congelées. Des co-cultures d'adipocytes et de lignées de CaP ont recherché l'influence du TAPP sur la lipophagie.

Résultats : Il existe une corrélation entre marqueurs des GL et de l'autophagie dans le CaP. Ces marqueurs sont associés aux marqueurs d'agressivité du CaP (ISUP, pTNM, prolifération, TEM) et à l'expression du RA. Dans les cancers pT3, ces marqueurs sont plus exprimés dans les zones extraprostatiques. Il existe *in vitro* une diminution de l'activité de l'autophagie et une augmentation de la lipophagie et des GL dans les cellules de CaP au contact d'adipocytes.

Conclusion : il existe une lipophagie fonctionnelle dans le CaP, en lien avec l'agressivité de la maladie. Nous retrouvons une influence du TAPP sur l'activité de la lipophagie et de l'autophagie, pouvant refléter l'adaptation et la survie des cellules tumorales.

Mots-clefs : Cancer, prostate, Lipophagie, Autophagie, Tissu adipeux périprostatique, Métabolisme, Lipides, Gouttelettes lipidiques, Microenvironnement tumoral, LC3, p62.

Jury :

- **Président du Jury :** Professeur Claude LINASSIER
- **Directeur de thèse :** Professeur Gaëlle FROMONT
- **Membres du Jury :**
 - Professeur Gaëlle FROMONT
 - Professeur Gonzague DU BOUEXIC de PINIEUX
 - Professeur Franck BRUYÈRE
 - Docteur Lucie BRISSON

Date de soutenance : 26/10/2020