

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**PRÉVENTION DU CANCER DE LA PROSTATE PAR LES COMPOSÉS
NATURELS**

Par
Jihane Gasmi

Thèse présentée pour l'obtention du grade
De Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Denis Girard
INRS, Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Éric Asselin
Université du Québec à Trois-Rivières

Examineur externe

Abdelouahed Khalil
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Thomas Sanderson
INRS, Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Sans vous je ne serais pas là aujourd'hui, vous avez su trouver le mot juste dans les moments les plus durs. Vous avez toujours cru en moi et cette thèse c'est un peu la votre. Merci pour tout ce que vous m'avez offert, je mesure la chance d'avoir des parents comme vous.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche pour son soutien indéfectible, sa patience, son professionnalisme et son calme à toute épreuve. Je ne peux qu'exprimer ma profonde gratitude envers le Dr Thomas Sanderson qui a fait preuve d'une efficacité incroyable lorsqu'il sagissait de corriger un article ou d'innombrables posters et autres écrits. Je le remercie également de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir donné la chance de faire un doctorat dans son laboratoire. Ces années ont été riches en enseignements et c'est grâce à lui que j'ai pu découvrir le monde de la recherche et venir à bout de mon doctorat.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire et plus particulièrement Martin qui m'a accueilli durant mes premiers jours au laboratoire, Patricia et Alex toujours prêts à me donner des cellules ainsi que nos voisins de laboratoire Talal pour ses conseils avisés, Dave toujours prêt à répondre à une question, Cathy, Andréanne, Marc et Joey pour leur bonne humeur.

Je remercie chaleureusement Mme Anne Philippon pour ses conseils et son efficacité ainsi que Mr Michel Courcelles pour avoir sauvé ma bibliothèque endnote sans oublier Mme Josée Labonne.

Les amis se sont succédés durant ces années tous ont compté pour moi, mais une pensée particulière pour Talal, Hayet, Meriem, Nadjat, Hind, Ben, Sihem et Francis.

Ma dernière pensée est pour toi, merci d'être là tous les jours et de me soutenir dans tous mes projets. Merci de répondre à mes coups de fils même lorsque tu es en pleine manip, merci de me redonner confiance et d'avoir toujours le mot qu'il faut pour me redonner le moral. Merci d'être là et de rendre la vie plus belle. Un grand merci à notre fils qui me donne le sourire quelque soit les circonstances. Un jour tu liras ce manuscrit, saches que tu avais 19 mois et que je jonglais entre toi et l'ordinateur, mais ce n'est que du bonheur.

RESUME

Introduction : Le cancer de la prostate est la deuxième cause de mortalité chez les hommes atteints de cancer dans les pays développés. C'est un cancer initialement hormono-dépendant dont la prolifération est stimulée par les androgènes et les œstrogènes. Dans la prostate, la 5 α -réductase (de type 1 et 2) transforme la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), bien plus puissante, qui se lie au récepteur aux androgènes (AR) cytoplasmique et permet son activation. Ce dernier joue le rôle de facteur de transcription et active la transcription des gènes cibles impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. Il existe différents traitements contre le cancer de la prostate. En effet, l'hormonothérapie a pour but de bloquer la synthèse des androgènes responsables de la stimulation des cellules cancéreuses. Cependant, au bout de quelques années, une résistance aux traitements se développe et le cancer évolue invariablement vers un état hormono-indépendant difficile à traiter. C'est un cancer très fréquent chez les hommes âgés de plus de 50 ans et est caractérisé par un temps de latence prolongé. Des études épidémiologiques ont mis en évidence l'impact environnemental sur les risques de développer un cancer de la prostate et de l'importance de sa prévention par l'alimentation. En effet, certains composés naturels et plus particulièrement les composés présents dans la grenade (*punica granatum*), fruit au riche passé ethnométrical et aux propriétés antioxydantes plus élevées que celles du thé ou du vin, retardent sa progression. Nous émettons l'hypothèse que ces composés sont capables d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses à différents niveaux d'évolution du cancer. **Objectif** : Mes travaux ont pour but d'identifier et de déterminer les mécanismes d'action des composés capables d'inhiber la croissance du cancer de la prostate. Pour cela, nous avons déterminé les effets anti-androgéniques mis en jeu dans les cellules androgènes-dépendantes, les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de la croissance des cellules androgènes-dépendantes et -indépendantes et enfin la structure chimique du composé le plus puissant. Dans ce but, nous avons testé différentes classes chimiques de composés provenant de la grenade comme des anthocyanidines, des catéchines et des flavonoïdes. Nous avons également testé des acides gras polyinsaturés naturels connus pour leurs effets protecteurs contre le cancer de la prostate. **Résultats** : Les résultats de l'étude ont permis d'identifier quatre composés de la grenade, l'épigallocatechine gallate (EGCG), le delphinidine chloride, le kaempférol et l'acide punique, ayant des effets anti-androgéniques sur les cellules LNCaP à une concentration ≥ 10

μM . En effet, ils induisent une inhibition de l'expression des gènes codant pour la 5- α réductase de type 1 (SRD5A1) ainsi qu'une réduction du taux de AR nucléaire et une diminution de l'expression d'un gène cible du AR l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Parmi ces composés, l'acide punique, un acide gras conjugué C-18 le plus abondant (70 % à 80 % des acides gras présents dans les graines) induit une apoptose des cellules LNCaP après 24h de traitement à une concentration allant de 10 à 100 μM . Nous avons alors décidé de tester quatre de ses isomères naturels sur les cellules androgènes-dépendantes LNCaP et androgènes-indépendantes PC-3 afin d'identifier la structure chimique la plus efficace. Une analyse 3-D a été également réalisée afin d'identifier la conformation spatiale spécifique des isomères les plus cytotoxiques. Nous avons identifié l'acide jacarique qui se distingue par sa capacité à induire l'apoptose dans les deux lignées cellulaires androgènes-dépendantes et -indépendantes sans avoir d'effets sur les cellules épithéliales normales de la prostate RWPE-1. Il active la voie de signalisation apoptotique extrinsèque via le récepteur de mort cellulaire DR5 et intrinsèque via la voie mitochondriale dans les cellules androgènes-dépendantes et active la voie intrinsèque dans les cellules androgènes-indépendantes. L'analyse 3-D a permis de mettre en avant l'importance de la conformation *cis*, *trans*, *cis* dans l'efficacité des deux acides gras identifiés. **Conclusion** : L'acide punique est un acide gras important présent dans la grenade, capable d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses en modulant les voies androgéniques et en activant la voie apoptotique intrinsèque dans la lignée cellulaire androgène-dépendante. L'acide punique et son isomère le plus proche structurellement, selon l'analyse 3-D, l'acide jacarique, inhibent la prolifération des cellules androgène-dépendantes et -indépendantes sans affecter les cellules épithéliales normales. L'acide jacarique induit la voie apoptotique intrinsèque et extrinsèque dans les cellules androgènes-dépendantes. En revanche, il active la voie intrinsèque seulement dans les cellules androgènes-indépendantes. L'acide punique et jacarique sont deux isomères octadecatriénoïques prometteurs dans la prévention du cancer de la prostate à différents stades de son évolution.

Mots-clés : grenade, acide punique, apoptose, acide jacarique, récepteur de mort cellulaire, SRD5A1, PSA, AR, structure/activité 3-D.

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer is the second leading cause of death among American and European men. It is a hormone-dependent cancer and its growth is stimulated by androgens and estrogens. In the prostate, steroid 5 α -reductase (SRD5A types 1 and 2) converts testosterone to more potent dihydrotestosterone (DHT) which binds with great affinity to the cytoplasmic androgen receptor (AR) and activates the receptor which dimerizes and translocates to the nucleus. Nuclear androgen receptor is a transcription factor that activates transcription in target genes, some of which are implicated in cancer cell proliferation. Several treatments exist to inhibit prostate cancer cell proliferation. Anti-hormone therapy blocks androgen receptor activation or androgen synthesis and subsequent cancer cell stimulation. However, resistance to treatment develops and the cancer will invariably evolve into a hormone-independent state, which is hard to treat. It is a cancer with a prolonged latency that is very common in men over 50 years. Epidemiological studies have highlighted the importance of various environmental factors and especially of diet in the risk of developing prostate cancer. These studies strongly indicate that preventive alimentation needs to be developed to protect against prostate cancer. Various natural compounds found in pomegranate (*Punica granatum*) may delay prostate cancer progression. Our hypothesis is that these compounds inhibit prostate cancer cell growth *in vitro* at different levels of cancer progression. **Objectives:** We intended to identify and determine the mechanism of action of those compounds that are the most potent inhibitors of prostate cancer cell growth. We determined the anti-androgenic effects of natural compounds in androgen-dependent prostate cancer cells and identified signaling pathways involved in growth inhibition of androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. For this purpose, we individually tested several classes of chemical compounds commonly found in the pomegranate like anthocyanidins, catechins and polyphenols. This fruit has a rich ethnomedical history and antioxidant properties greater than those of tea or wine. We also tested polyunsaturated fatty acids purported to have protective effects against prostate cancer. **Results:** We found that four compounds epigallocatechin gallate (EGCG), delphinidin chloride, kaempferol and punicic acid had antiandrogenic effects in androgen-dependent LNCaP human prostate cancer cells at concentrations of 10 μ M and above. They inhibited SRD5A1 gene expression, AR nuclear accumulation and the expression of the AR target gene PSA at concentrations \geq 10 μ M. As the unique C-18 fatty acid, punicic acid, the main constituent of pomegranate seed (70 % à 80 %),

was found to be the most potent inhibitor of LNCaP prostate cancer cell growth. It induced DNA fragmentation after 24h treatment, at concentrations in the 10-100 μ M range. We decided to determine the growth inhibitory effects of this fatty acid and a number of its plant-derived and dietarily relevant geoisomers, in androgen-dependent LNCaP as well as androgen-independent PC-3 cells. A 3-D structure-activity analysis was performed to determine the structural conformational properties that convey potent cytotoxic properties certain geoisomers, but not others. We find that Jacaric acid induces apoptosis in androgen-dependant and -independent cell lines but had no effects on normal epithelial cells. It activates extrinsic apoptotic pathway via death receptor DR5 and intrinsic cell death via mitochondrial pathway, in androgen-dependent cells. It induces intrinsic apoptosis in androgen independent cells. The *cis*, *trans*, *cis* conformation of the two most potent fatty acids seems to be very important in compound efficiency according to 3-D analysis. **Conclusion:** Punicic acid an important fatty acid found in the pomegranate inhibits cancer cell growth by modulating the androgenic signaling pathway and activating intrinsic apoptosis in androgen-dependant prostate cancer cells. Punicic acid and its three-dimensionally most structurally related geostereoisomer, jacaric acid inhibit androgen-dependent and -independent prostate cancer cell proliferation, while not causing cytotoxicity in normal prostate epithelial cells. Jacaric acid induces intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in androgen-dependent cells, but activates the intrinsic pathway only, in androgen-independent cells. Punicic and jacaric acid are two octadecatrienoic acid geoisomers we identified that are interesting dietary constituents with beneficial effects in prostate cancer prevention acting at several levels in the progression of prostate cancer cell growth.

Keywords: pomegranate, puniic acid, apoptosis, jacaric acid, death receptor, SRD5A1, PSA, AR, 3-D structure/activity.

TABLE DES MATIERES

1 PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE	5
1.1 LE CANCER DE LA PROSTATE.....	7
1.1.1 Généralités sur le cancer de la prostate.....	7
1.1.2 Le cancer de la prostate : hormono-dépendant.....	11
1.1.2.1 Le rôle du récepteur aux androgènes (AR).....	11
1.1.2.2 La stéroïdogénèse.....	12
1.1.2.2.1 La P450scc.....	21
1.1.2.2.2 La 3 β -HSD.....	21
1.1.2.2.3 La CYP17.....	23
1.1.2.2.4 La 17 β -HSD.....	23
1.1.2.2.5 La 3 α -HSD.....	24
1.1.2.2.6 La sulfatase.....	24
1.1.2.2.7 La CYP19.....	24
1.1.2.2.8 La SRD5A.....	26
1.1.3 Progression vers un cancer hormono-indépendant.....	28
1.1.3.1 Sensibilité accrue du AR.....	29
1.1.3.1.1 Amplification du gène codant pour le AR.....	29
1.1.3.1.2 Augmentation de la sensibilité du AR.....	30
1.1.3.1.3 Augmentation du taux d'androgènes.....	30
1.1.3.2 Les modifications génétiques du AR.....	30
1.1.3.2.1 Mutations du AR.....	30
1.1.3.2.2 Changements d'expression des corégulateurs du AR.....	32
1.1.3.3 L'activation du AR par un mécanisme ligand indépendant via.....	32
1.1.3.3.1 Les facteurs de croissance.....	32
1.1.3.3.2 Les cytokines.....	33
1.1.3.3.3 Les récepteurs à tyrosine kinase.....	33
1.1.3.3.4 La voie de signalisation Wnt.....	35
1.1.3.4 Les voies AR indépendantes.....	39
1.1.3.4.1 Les facteurs de croissances.....	39
1.1.3.4.2 La voie de signalisation Akt.....	39
1.1.3.4.3 Bcl-2.....	40
1.1.3.4.4 Les régulations épigénétiques.....	40
1.1.3.4.5 Les microRNA.....	41
1.1.3.5 La voie des cellules cachées.....	41
1.1.3.6 Les mécanismes de résistance du cancer androgène-indépendant.....	41
1.1.4 Généralités sur les métastases.....	44
1.1.4.1 La dissémination.....	44
1.1.4.2 La survie pendant la migration.....	45

1.1.4.3	L'installation dans la moelle osseuse	46
1.1.4.4	Formation de métastases par les cellules tumorales disséminées.....	47
1.1.4.5	Clones et cellules souches dans la formation des métastases.....	47
1.1.4.6	Les différents types de tumeurs métastatiques osseuses	48
1.2	APOPTOSE ET CANCER DE LA PROSTATE.....	49
1.2.1	Généralités sur les voies apoptotiques	49
1.2.1.1	La voie intrinsèque	49
1.2.1.2	La voie extrinsèque.....	50
1.2.2	Mécanismes de résistance à l'apoptose dans le cancer de la prostate.....	51
1.3	LA PRÉVENTION PAR L'ALIMENTATION	55
1.3.1	La genistéine.....	57
1.3.2	Le lycopène	58
1.3.3	Le delphinidine.....	58
1.3.4	La quercétine	59
1.3.5	Les crucifères	59
1.3.6	Le thé.....	60
1.3.7	La grenade	60
1.3.8	Les eicosanoïdes	64
1.3.9	Les extraits naturels de plantes.....	64
1.3.10	Les acides gras polyinsaturés (PUFAs).....	65
1.3.10.1	L'inhibition de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) à l'origine de la synthèse des eicosanoïdes.....	66
1.3.10.2	La modulation de l'activité des facteurs de transcription, de l'expression des gènes et des voies de signalisation.	66
1.3.10.2.1	Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR).....	66
1.3.10.2.2	Le facteur de transcription nucléaire kB (NF-kB)	67
1.3.10.2.3	Les radicaux libres et les espèces réactives d'oxygènes (ROS).....	67
1.3.11	Les micronutriments.....	68
2	HYPOTHESES ET OBJECTIFS	71
3	DEUXIEME PARTIE : ARTICLES	77
3.1	CHAPITRE I : LES EFFETS ANTIPROLIFERATIFS, ANTIANDROGENIQUES ET PROAPOPTOTIQUES DE L'ACIDE PUNIQUE DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE LA PROSTATE LNCAP	79
3.1.1	Traduction du résumé de l'article.....	79
3.1.2	Contribution de l'étudiante.....	80
3.1.3	Growth inhibitory, antiandrogenic and pro-apoptotic effects of puniceic acid in LNCaP human prostate cancer cells.....	81
3.2	CHAPITRE II: L'ACIDE JACARIQUE ET SES GEOISOMERES OCTADECATRIENOÏQUES INDUISENT L'APOPTOSE DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE LA PROSTATE HUMAINE, UNE ETUDE MECHANISTIQUE DE LA RELATION STRUCTURE/ACTIVITE EN 3-D	107

3.2.1	<i>Traduction du résumé de l'article</i>	107
3.2.2	<i>Contribution de l'étudiante</i>	108
3.2.3	<i>Jacaric acid and its octadecatrienoic acid geoisomers induce apoptosis selectively in cancerous human prostate cells: a mechanistic and 3-D structure-activity study</i>	109
4	DISCUSSION GENERALE	137
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
6	RÉFÉRENCES	157

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1	MECANISMES D'EVOLUTION VERS UN CANCER DE LA PROSTATE ANDROGENE-INDEPENDANT [80].....	42
TABLEAU 2	SELECTION DE QUELQUES COMPOSES DE LA GRENADE ET LEURS ACTIONS CONNUES CONTRE LE CANCER [276]– J : JUS, L : FEUILLE, F : FLEURS, S : GRAINES, B : ECORCE DE L'ARBRE, R : ECORCE DES RACINES DE L'ARBRE	63

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. ACTIVATION DU AR PAR LA DHT (ADAPTEE DE FELDMAN B.J, FELDMAN D., NATURE REVIEWS CANCER, 2001).....	12
FIGURE 2. LA REGULATION ENDOCRINE DE LA SYNTHÈSE DE LA TESTOSTERONE (INSPIRÉE DE CLAYTON R.N., CATT K.J., ENDOCRINE REVIEWS, 1981).....	16
FIGURE 3. SYNTHÈSE ET DEGRADATION DES STÉROÏDES DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA PROSTATE (ADAPTEE DE LABRIE F. ET AL., JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2005).	20
FIGURE 4. SYNTHÈSE <i>DE NOVO</i> DES HORMONES ANDROGÈNES ET OESTROGÈNES.....	22
FIGURE 5. LES PROMOTEURS ET LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA CYP19 (ADAPTEE DE BULUN, S.E., THE JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2003).	26
FIGURE 6 LES DIFFÉRENTES ÉTAPES AVANT L'APPARITION D'UN CANCER DE LA PROSTATE ANDROGÈNE-INDEPENDANT (ADAPTEE DE TINDALL D.J., RITTMASER R.S., JOURNAL OF UROLOGY, 2008).....	28
FIGURE 7 QUELQUES MUTATIONS SURVENANT SUR LE AR (ADAPTEE DE FELDMAN B.J, FELDMAN D., NATURE REVIEWS CANCER, 2001).	31
FIGURE 8 CREATION D'UNE VOIE D'ACTIVATION DU AR VIA LES FACTEURS DE CROISSANCE (ADAPTEE DE FELDMAN B.J, FELDMAN D., NATURE REVIEWS CANCER, 2001).	35
FIGURE 9 LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/B-CATENINE (ADAPTEE DE KYPTA R.M., WAXMAN J., NATURE REVIEWS UROLOGY, 2012).	38
FIGURE 10 CINQ VOIES POSSIBLES EXPLIQUANT L'ÉVOLUTION VERS UN ÉTAT ANDROGÈNE-INDEPENDANT (ADAPTEE DE FELDMAN B.J, FELDMAN D., NATURE REVIEWS CANCER, 2001).....	43

LISTE DES ABREVIATIONS

AIPC	<i>Androgen independent prostate cancer</i>
Akt	Protéine kinase B
AND	Acide désoxyribonucléique
Apaf-1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
Apollon	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>
AR	Récepteur aux androgènes
AR ^{CCR}	<i>Cortisol and cortisone responsive Androgen Receptor</i>
ARE	Elément de réponse aux androgènes
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CAFs	<i>Cancer-associated Fibroblasts</i>
cIAP1	<i>Cellular inhibitor of apoptosis 1</i>
cIAP2	<i>Cellular inhibitor of apoptosis 2</i>
CYP11A	Cytochrome P450 ou CYP _{scc}
CYP17A1	Cytochrome P450 ou 17 α -hydroxylase
CYP19	Aromatase
CYP21 A2	Cytochrome 21-hydroxylase
DcR2	<i>Decoy receptor 2</i>
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DR5	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
FMN	Flavine mononucléotide
GnRH	Gonadolibérine
Her-2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
3 β -HSD	3 β hydroxystéroïde déshydrogénases
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IAPs	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LH	Hormone lutéinisante
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Ncor	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
Omi/HtrA2	<i>Mitochondrial serine protease</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PSA	Antigène prostatique spécifique
RE	Réticulum endoplasmique

RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
SHBG	<i>Sex-hormone binding globulin</i>
Smac/Diablo	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SRD5A	<i>5 alpha réductase</i>
StAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory peptide</i>
TIF2	<i>Transcriptional mediators/intermediary factor 2</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
Wnt	<i>Wingless et int</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

INTRODUCTION

Les tumeurs qui se développent dans les organes tels que le sein, la prostate, la glande surrénale et les testicules sont souvent des cancers dits hormono-dépendants dont la progression dépend initialement des hormones stéroïdiennes. En effet, les androgènes et plus particulièrement la dihydrotestostérone (DHT) jouent un rôle essentiel dans le développement du cancer de la prostate [1]. C'est un cancer très fréquent qui présente un taux de mortalité important. Aux États-Unis, il est classé au premier rang devant le cancer des poumons et des bronches. Le nombre de cas diagnostiqués a augmenté considérablement depuis le développement du test sanguin de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Cependant, les mécanismes d'évolution du cancer de la prostate restent inconnus et font de cette maladie un problème de santé publique à haut impact socio-économique [2].

Chez les cancers dits hormono-dépendants ou hormono-sensibles tel que le cancer de la prostate, la multiplication de certains types de cellules cancéreuses est stimulée par des hormones naturelles. En effet, le risque de développer un cancer de la prostate fait intervenir les hormones stéroïdiennes et leur voie de biotransformation. Le lien existant entre les androgènes et la prostate saine ou cancéreuse fait intervenir la voie de signalisation des androgènes comme médiateur de la biologie tissulaire et comme cible thérapeutique pour traiter le cancer de la prostate. En effet, la voie de signalisation des androgènes peut être modulée et donc peut être responsable du comportement anormal des cellules cancéreuses. Le traitement hormonal tente de réduire le taux d'androgènes circulant ou de bloquer la voie de signalisation des androgènes dans les cellules cancéreuses. Cependant, il présente certaines limites. En effet, les cellules cancéreuses prostatiques ne restent pas inactives face à la pénurie en androgènes. Au bout d'un certain temps, variable selon les individus, de quelques mois à quelques années, elles s'adaptent à cette situation et se remettent à proliférer. Face à cette situation, le traitement hormonal n'est plus efficace puisque le cancer évolue vers une hormono-résistance, difficile à traiter [3].

La chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie ainsi que le blocage androgénique combinés sont les traitements les plus communément utilisés pour traiter les patients souffrants du cancer de la prostate. Cependant, ces traitements sont à l'origine de plusieurs effets secondaires. De plus, le cancer de la prostate est souvent diagnostiqué chez les hommes de plus de 50 ans, avec une population qui vieillit de plus en plus, leur nombre est en hausse. Il devient donc nécessaire de développer des moyens préventifs contre cette maladie.

Le taux de mortalité du cancer de la prostate varie considérablement en fonction des pays [4]. Il est courant aux États-Unis, notamment chez les Afro-américains qui sont particulièrement touchés par cette tumeur, ainsi qu'en Europe de l'ouest, mais est moins habituel en Europe de l'est et en Asie. Les facteurs expliquant cette large variation géographique sont inconnus. Cependant, le mode de vie ainsi que l'alimentation jouent un rôle déterminant dans son développement.

Dès le début des années 1990, plusieurs études épidémiologiques [5, 6] ont souligné l'influence de l'alimentation dans la prévention des cancers. En effet, des travaux menés sur les propriétés préventives de la grenade ont mis en évidence une activité pharmacologique de chacune des parties de ce fruit [7, 8]. Mehta et Lansky (2004) ont également montré les effets chimioprotecteurs des acides gras provenant des graines de la grenade, sur le cancer du sein, testé sur des glandes mammaires de souris [9].

Nos travaux ont pour objectifs de sélectionner les composés naturels capables d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses de la prostate et cela à différents niveaux d'évolution du cancer et d'analyser la structure chimique qui en est responsable. Notre étude s'est intéressée à trois points principaux :

En se basant sur la littérature, nous nous sommes intéressés à des composés naturels provenant de différentes parties de la grenade. Nous avons testé les effets antiprolifératifs de ces composés sur différentes lignées du cancer de la prostate androgène-dépendant et -indépendant.

Nous avons ensuite sélectionné les composés actifs, capables d'induire un effet antiprolifératif sur les cellules androgènes-dépendantes et avons déterminé leurs effets antiandrogéniques. En effet, nous avons quantifié l'accumulation nucléaire du récepteur aux androgènes suite à une exposition aux composés. De plus, nous avons testé l'expression d'un gène cible du AR, le PSA et enfin nous avons testé l'expression du gène codant pour l'enzyme synthétisant l'androgène nécessaire au développement du cancer de la prostate, la SRD5A1.

Nous avons également identifié les voies de signalisations impliqués dans la diminution de la viabilité cellulaire induite dans les cellules androgènes-dépendantes et -indépendantes suite à une exposition aux composés.

Enfin nous avons déterminé la structure chimique des composés les plus actifs par une analyse tridimensionnelle.

Cette thèse est divisée en trois parties :

Dans la première partie, un rappel bibliographique sera composé de quatre chapitres. Le premier chapitre sera consacré à la compréhension de l'importance des hormones sexuelles et des enzymes impliquées dans leur synthèse et par conséquent de la croissance du cancer de la prostate. Le deuxième chapitre traitera de l'évolution du cancer vers un état androgène-indépendant ainsi que des facteurs favorisant cette évolution. Le troisième chapitre présentera les modulations de l'apoptose dans le cancer de la prostate. Enfin, le dernier chapitre traitera de l'effet préventif des différents composés naturels présents dans la littérature et en particulier de la grenade et des acides gras polyinsaturés.

Les hypothèses et objectifs feront le lien entre la partie bibliographique et la partie résultats.

Dans la deuxième partie, les résultats des études réalisées seront présentés sous forme de deux articles publiés. Selon les trois parties évoquées précédemment, le premier article traite des effets antiprolifératifs et antiandrogéniques des composés de la grenade. Le deuxième traite des voies de signalisation impliquées dans la mort des cellules cancéreuses androgène-dépendantes et -indépendantes ainsi que de l'analyse 3-D de la structure chimique des composés les plus puissants.

Dans la troisième partie, une discussion générale des résultats ainsi qu'une conclusion et perspectives seront présentées pour cloturer ce manuscrit.

1 PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE

1.1 LE CANCER DE LA PROSTATE

1.1.1 Généralités sur le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de mortalité chez les hommes atteints de cancer aux États-Unis et dans les pays développés. Avec plus de 241 000 nouveaux cas et 28 000 morts estimés pour 2012 aux États-Unis seulement [10].

Malgré les progrès qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes de développement des cancers, les causes du cancer de la prostate ne sont actuellement pas connues. Néanmoins, certains facteurs de risque comme l'âge, la génétique et l'origine ethnique interviennent dans le développement du cancer de la prostate. L'âge est l'un des facteurs de risque les plus importants. En effet, le cancer de la prostate est le plus souvent diagnostiqué après 50 ans. Selon l'histoire familiale un cancer de la prostate peut survenir sous trois formes : une forme non héréditaire (la plus répandue), la forme familiale, lorsqu'il existe au moins deux cas de cancers de la prostate chez des apparentés du premier degré (père, frère) ou du second degré (grand père, oncle) (20 % des cancers de la prostate) et la forme héréditaire, qui se définit par l'existence d'au moins 3 cas de cancers de la prostate chez des apparentés du premier degré (père ou frère) ou du second degré, ou de 2 membres de la famille diagnostiqués avant l'âge de 55 ans (5 % des cancers de la prostate). L'origine ethnique est aussi un facteur de risque. En effet, de nombreuses études ont montré que le nombre de cas de cancers de la prostate est beaucoup plus important dans les pays d'Europe du nord et d'Amérique du nord que dans les pays d'Asie du sud-est. De plus, il a été établi que les hommes d'origine Afro-antillaise ont un risque accru de développer un cancer de la prostate. Il existe d'autres facteurs de risque probables qui font intervenir le mode de vie des patients (alimentation, activité physique, environnement) plus difficile à analyser.

La prostate est une glande de l'appareil génital masculin qui produit le liquide prostatique. Elle est entourée d'une capsule, qui la sépare du reste des autres organes du pelvis. Elle est constituée de trois types de cellules : les cellules glandulaires qui sécrètent les liquides pour l'éjaculation, les cellules musculaires qui règlent le jet d'urine et l'éjaculation et les cellules fibreuses qui maintiennent la structure de la glande.

La prostate se divise en 3 zones :

- **une zone périphérique** : c'est la région de la prostate la plus proche du rectum. La majorité des tumeurs malignes de la prostate (environ 75 %) surviennent dans cette zone
- **une zone transitionnelle (de transition)** : c'est la zone située au milieu de la prostate en avant des zones périphérique et centrale, elle entoure l'urètre. Avec le vieillissement, cette zone augmente en taille et est appelée hypertrophie bénigne de la prostate, elle survient chez presque tous les hommes de plus de 70 ans.
- **une zone centrale** : c'est la partie de la prostate située à la base entourant les canaux éjaculateurs. Elle représente 20 % de la prostate.

Les traitements proposés lors d'un diagnostic du cancer de la prostate dépendent de plusieurs facteurs comme son étendue au moment du diagnostic et son évolution potentielle. Pour cela il existe une classification médicale internationale qui prend en compte 3 critères : la taille de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques par des cellules cancéreuses et la présence ou non de métastases ailleurs dans le corps. Ces 3 critères permettent de déterminer ce qu'on appelle le stade du cancer, c'est-à-dire son degré d'extension. On distingue 4 stades différents du cancer de la prostate :

- le cancer de la prostate localisé, qui est limité à la capsule prostatique et est classés en 3 sous-catégories en fonction de son risque d'évolution : le cancer de la prostate à faible risque ; à risque intermédiaire et à risque élevé
- le cancer de la prostate localement avancé, qui s'étend au-delà de la capsule prostatique ou aux organes adjacents; aucun ganglion n'est atteint; il n'y a pas de métastases à distance
- le cancer de la prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne
- le cancer de la prostate métastatique, il présente une ou des métastases à distance.

Ces stades sont établis selon une classification internationale dite classification TNM. Elle permet d'évaluer le stade du cancer de la prostate et prend en compte 3 critères : la taille de la tumeur (T pour tumeur), la présence ou non de cellules cancéreuses dans les ganglions (N pour ganglions) et la présence ou non de métastases (M pour métastase).

T : Tumeur primitive

- T0 : Absence de tumeur
- T1 : Tumeur non palpable ou non visible en imagerie (T1a < 5 % du tissu retiré, T1b > 5 % du tissu retiré et T1c : découverte par élévation du PSA et réalisation de biopsies positives)
- T2 : Tumeur limitée à la prostate (apex et capsule compris) (T2a : Atteinte de la moitié d'un lobe ou moins, T2b : Atteinte de plus de la moitié d'un lobe sans atteinte de l'autre lobe, T2c : Atteinte des deux lobes)
- T3 : Extension au-delà de la capsule (T3a : Extension extra-capsulaire, T3b : Extension aux vésicules séminales)
- T4 : Extension aux organes adjacents (col vésical, sphincter urétral, rectum, paroi pelvienne) ou tumeur fixée à la paroi pelvienne

N : Ganglions régionaux

- N0 : Absence de métastase ganglionnaire
- N1 : Atteinte ganglionnaire régionale

M : Métastases à distance

- M0 : Absence de métastases à distance
- M1 : Métastases à distance (M1a : Ganglions non régionaux, M1b : Os, M1c : Autres sites)

Les formes localisées du cancer de la prostate sont classées en fonction de leur risque évolutif à l'aide d'une classification appelée la classification de d'Amico. Cette classification a établi 3 sous-groupes de cancers de la prostate localisés selon le risque de rechute, c'est-à-dire 3 niveaux de risque de progression du cancer : un risque faible, un risque intermédiaire et un risque élevé. Chaque niveau de risque est défini en fonction de son TNM, son score de Gleason (déterminé grâce à une étude microscopique des cellules cancéreuses et permet de classer la tumeur selon son degré d'agressivité ; plus il est élevé, plus la tumeur est agressive) et la valeur du PSA.

Les principaux traitements médicaux contre le cancer de la prostate sont les suivants :

- La prostatectomie radicale consiste en une ablation de la glande prostatique et des vésicules séminales par voie chirurgicale. C'est la première méthode utilisée pour traiter le cancer de la prostate conçue par Huggins en 1941 [11]. Elle est proposée lorsque le cancer est localisé.
- La radiothérapie externe consiste à exposer la prostate à des irradiations qui créent des lésions dans l'ADN des cellules cancéreuses. Elle est proposée aux patients atteints d'un cancer localisé, mais qui ne peuvent pas subir d'opération chirurgicale.
- Le traitement hormonal ou hormonothérapie consiste à inhiber la synthèse des hormones pour qu'elles cessent de stimuler le cancer. Elle est le plus souvent réservée à des cancers qui ne sont plus limités à la prostate. Ce traitement est, en général, prescrit en association avec des traitements locaux (prostatectomie, radiothérapie). L'objectif essentiel de l'hormonothérapie est de ralentir la progression du cancer et d'accroître la survie du patient tout en lui conférant une qualité de vie décente. L'hormonothérapie peut être de différents types :
 - Castration chirurgicale : consiste en une ablation des testicules afin de prévenir la fabrication de la testostérone. Elle assure une diminution d'environ 95 % du taux d'androgènes dans le sang
 - Castration médicale ou chimique : consiste en l'utilisation de médicaments hormonaux actifs afin de diminuer le niveau de testostérone dans le sang
 - Le blocage androgénique consiste à bloquer les androgènes dans leur accès au AR par un anti-androgène pur de la classe des flutamides ou des bicalutamides [12].

Les traitements médicaux actuellement disponibles comportent des effets indésirables comme l'impuissance sexuelle et l'incontinence urinaire.

La prostate est divisée en deux compartiments cellulaires : un compartiment mésenchymateux et un compartiment épithélial. Le compartiment mésenchymateux comporte des cellules musculaires lisses et des fibroblastes [13], tandis que le compartiment épithélial est composé de cellules épithéliales glandulaires, de cellules basales et de cellules neuroendocrines [14]. La synthèse des androgènes a lieu dans le compartiment épithélial qui est subdivisé en trois

compartiments : un premier compartiment de cellules souches indifférenciées, un deuxième compartiment de cellules prolifératives indifférenciées et un troisième compartiment de cellules différenciées [15].

Chez les cancers dits hormono-dépendants ou hormono-sensibles tel que le cancer de la prostate, la croissance et la différenciation des cellules cancéreuses dépendent essentiellement des androgènes dont la synthèse est assurée par les différentes enzymes de la stéroïdogénèse.

1.1.2 Le cancer de la prostate : hormono-dépendant

Les androgènes sont indispensables au développement de la prostate à sa croissance ainsi qu'à sa progression. De plus, la DHT est l'androgène responsable de la croissance et de la survie des cellules cancéreuses de la prostate. En effet, la testostérone est convertie en DHT dans la prostate par la SRD5A1 et 2. Deux raisons expliquent cette conversion, tout d'abord la DHT se dissocie plus lentement du AR, de plus elle confère au AR une plus grande résistance à la dégradation en comparaison avec la testostérone [16]. De plus, la DHT a une grande affinité pour le AR qui est un régulateur clé assurant la survie et le maintien d'une prostate saine. Il joue aussi un rôle important dans la progression du cancer de la prostate puisqu'il induit une prolifération incontrôlée des cellules.

1.1.2.1 Le rôle du récepteur aux androgènes (AR)

Le AR appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires [17] et comporte 4 régions fonctionnelles : un domaine de régulation N terminal, un domaine de liaison à l'ADN, une région contenant un signal de localisation nucléaire et une région C terminale qui se lie au ligand. Le AR agit comme un facteur de transcription [17-20]. Il est principalement localisé dans le cytoplasme et est maintenu inactif grâce à des protéines HeatShock (HSP90 et HSP70). Lorsqu'il se lie à son ligand, une série de changements conformationnels induit la libération des protéines HeatShock. Le récepteur dimérise, se phosphoryle et transloque dans le noyau pour se lier à l'ADN sous forme d'homodimère sur la région cible de l'ADN, appelée élément de réponse aux androgènes (AREs), localisée dans la région « enhancer » des gènes cibles [20-22]. Des corégulateurs sont alors recrutés (coactivateurs et corépresseurs) [23]. Ils assurent, en association avec la machinerie de la transcription [23], l'expression des gènes régulés par le AR. Il induit par exemple l'expression des gènes codant pour le PSA (Prostate Specific Antigen) et

pour les facteurs de croissance qui agissent sur le développement, la croissance et les fonctions de la prostate [23-27] (Figure 1).

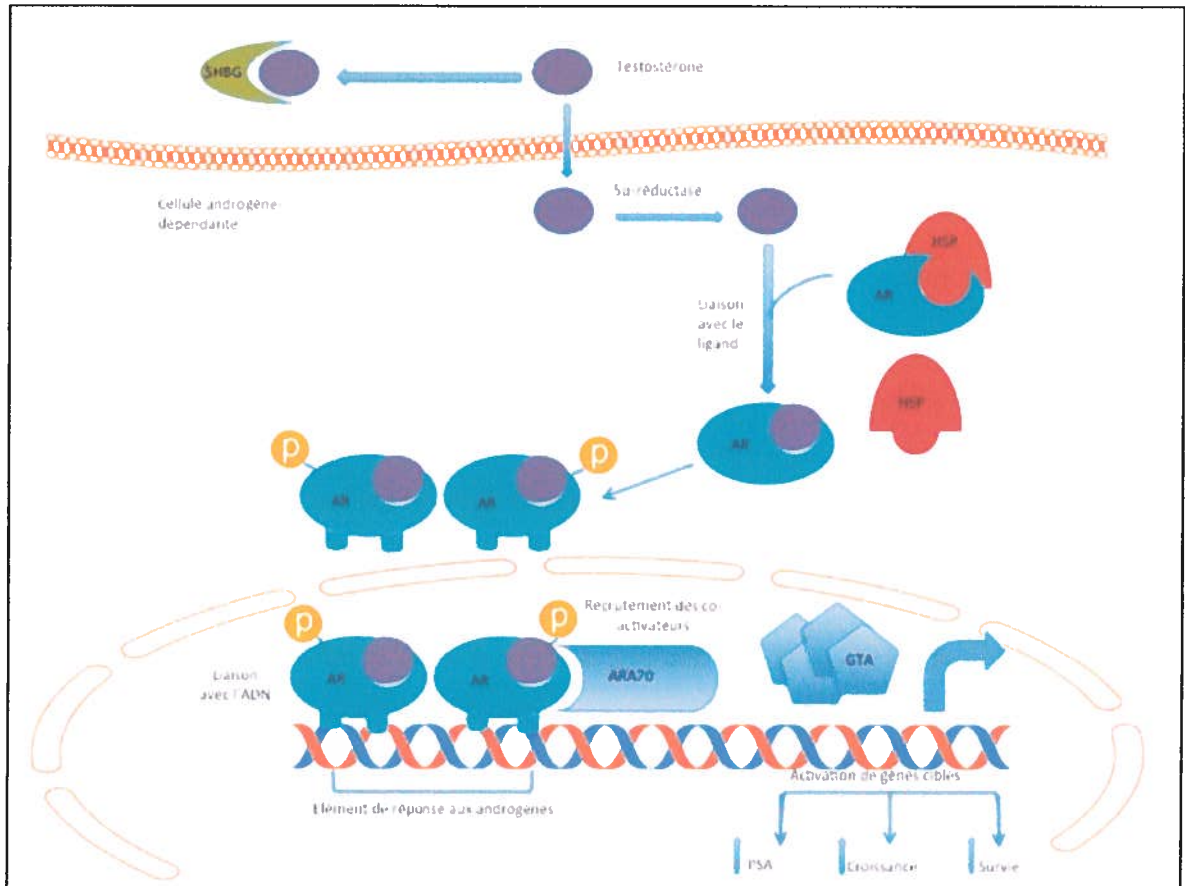


Figure 1. Activation du AR par la DHT (Adaptée de Feldman B.J, Feldman D., Nature Reviews Cancer, 2001).

La testostérone est présente dans le sang et est liée à l'albumine ou à la SHBG. Elle est sous forme libre en faible quantité. Cette dernière entre dans les cellules de la prostate pour être convertie en DHT par la 5 α-réductase. Elle se lie au AR pour permettre l'activation de l'expression des gènes cibles (*HSP* : Heat Shock Protein ; *SHBG* : sex-hormone binding globulin ; *GTA* : G-Protein Activation Transcription ; *ARA70* : Androgen Receptor Associated Protein 70).

1.1.2.2 La stéroïdogénèse

Le risque de développer un cancer de la prostate fait intervenir les hormones stéroïdiennes et leur voie de biotransformation.

Les enzymes stéroïdiennes sont responsables de la biosynthèse à partir du cholestérol de plusieurs hormones tels que les glucocorticoïdes (métabolisme, système immunitaire, inflammation) les minéralocorticoïdes (homéostasie hydrique), ainsi que les hormones sexuelles (caractères sexuels, reproduction, développement osseux). Plusieurs organes sont capables de synthétiser des stéroïdes biologiquement actifs tels que la glande surrénale, les testicules, les ovaires, le cerveau, le placenta et le tissu adipeux. Seul trois organes endocriniens sont spécialisés dans la synthèse *de novo* des stéroïdes : la glande surrénale, les testicules et les ovaires.

La glande surrénale est composée d'un cortex et d'une zone médullaire. Le cortex est composé de trois zones de l'extérieur vers l'intérieur : la zone glomérulée permet la synthèse de l'aldostérone, la zone fasciculée synthétise le cortisol et la zone réticulée synthétise le précurseur des androgènes le déhydroépiandrostérone (DHEA). La synthèse *de novo* de toutes les hormones stéroïdiennes commence par la conversion du cholestérol en prégnénolone (par la CYP11A) qui a son tour est convertie en progestérone (par la 3 β -HSD). La prégnénolone et la progestérone sont les précurseurs de toutes les autres hormones stéroïdes [28].

La stéroïdogenèse des hormones androgènes et œstrogènes a lieu dans les gonades, dans les glandes surrénales, et par conversion d'autres stéroïdes sexuels dans d'autres tissus comme la prostate ou le tissu adipeux. Elle fait intervenir :

- Les hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSDs) qui sont des oxydoréductases à NAD⁺/NADP⁺ (plusieurs isoformes) et les réductases (5 α -réductase) [29].
- Les enzymes de la famille des cytochromes P450 (dont le gène codant porte l'abréviation CYP) qui sont des hémoprotéines constituées d'une porphyrine complexée à un atome de fer³⁺. L'hème, sous forme réduite, peut lier l'oxygène. Elles agissent comme des monooxygénases à NADPH (hydroxylases) et sont classées en deux groupes: un groupe non-spécifique qui traite les molécules exogènes comme les médicaments et un deuxième groupe qui a un rôle spécifique dans le métabolisme des molécules endogènes comme les hormones [30, 31].

Les réactions qui ont lieu pendant la stéroïdogénèse sont unidirectionnelles parce que la plupart sont irréversibles. Les enzymes du cytochrome P450 ont une activité limitée à trois types de réactions chimiques : l'hydroxylation et occasionnellement le clivage d'une liaison carbone-carbone et une activité d'aromatation spécifique à CYP19. Toutes les réactions à cytochrome P450 utilisent de l'oxygène, des électrons provenant de la NADPH et une flavoprotéine à FMN et/ou FAD (une adrénodoxine réductase dans la mitochondrie ou une cytochrome P450 réductase dans le réticulum endoplasmique) pour effectuer une réaction de type :



Les enzymes du cytochrome P450 responsables de la synthèse des hormones sexuelles sont localisées dans le réticulum endoplasmique lisse. Elles sont présentes dans des zones spécifiques des gonades et de la corticosurrénale et catalysent des réactions spécifiques des précurseurs des stéroïdes. Elles comprennent les CYP17A1, les CYP21A2 et les CYP19A1 (aromatase) [32].

Les hormones sexuelles comprennent les androgènes et les œstrogènes. Les androgènes comprennent la testostérone, la DHEA, l'androstènedione, l'androstènediol, l'androstérone et la DHT. Les œstrogènes sont composés de l'estrone, de l'œstradiol et de l'œstriol (produit durant la grossesse seulement).

Origine des androgènes plasmatiques chez l'homme

- La testostérone est sécrétée à 95 % par les testicules (cellules de Leydig) et à 5 % par les glandes surrénales. La synthèse de la testostérone par les testicules a deux grands niveaux de régulation, endocrine et locale. La régulation endocrine met en jeu l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. En effet l'hormone lutéinisante LH (luteinizing hormone), produite par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse et contrôlée par la gonado-libérine (GnRH), est le principal facteur de contrôle de la production de la testostérone (Figure 2). La LH contrôle la croissance et la différenciation Leydigienne

ainsi que toutes les étapes de la stéroïdogénèse. La sécrétion de LH et de GnRH est également régulée, par la testostérone elle-même, au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus respectivement. Un rétrocontrôle négatif direct est assuré après conversion de la testostérone en œstradiol. La régulation locale endocrine et paracrine module aussi l'activité de la LH.

- La DHEA est une hormone stéroïde inactive synthétisée à partir du cholestérol dans le cortex surrénal (100 %) et convertie en androgènes actifs dans différents tissus comme la prostate.
- L'androstènedione est un stéroïde produit par les testicules (50 %) et le cortex surrénal (50 %).
- Soixante-quinze pour cent de la DHT est synthétisée dans le foie et les 25 % restant sont synthétisés dans la peau.

Origine des androgènes plasmatiques chez la femme

- La testostérone provient à 70 % de la conversion des androgènes surrénaliens dans les organes périphériques, 25 % des ovaires et le reste est directement produit par les surrénales
- L'androstènedione provient à 70 % des ovaires, 25 % des surrénales et le reste provient des organes périphériques
- La DHEA provient à environ 100 % des surrénales.

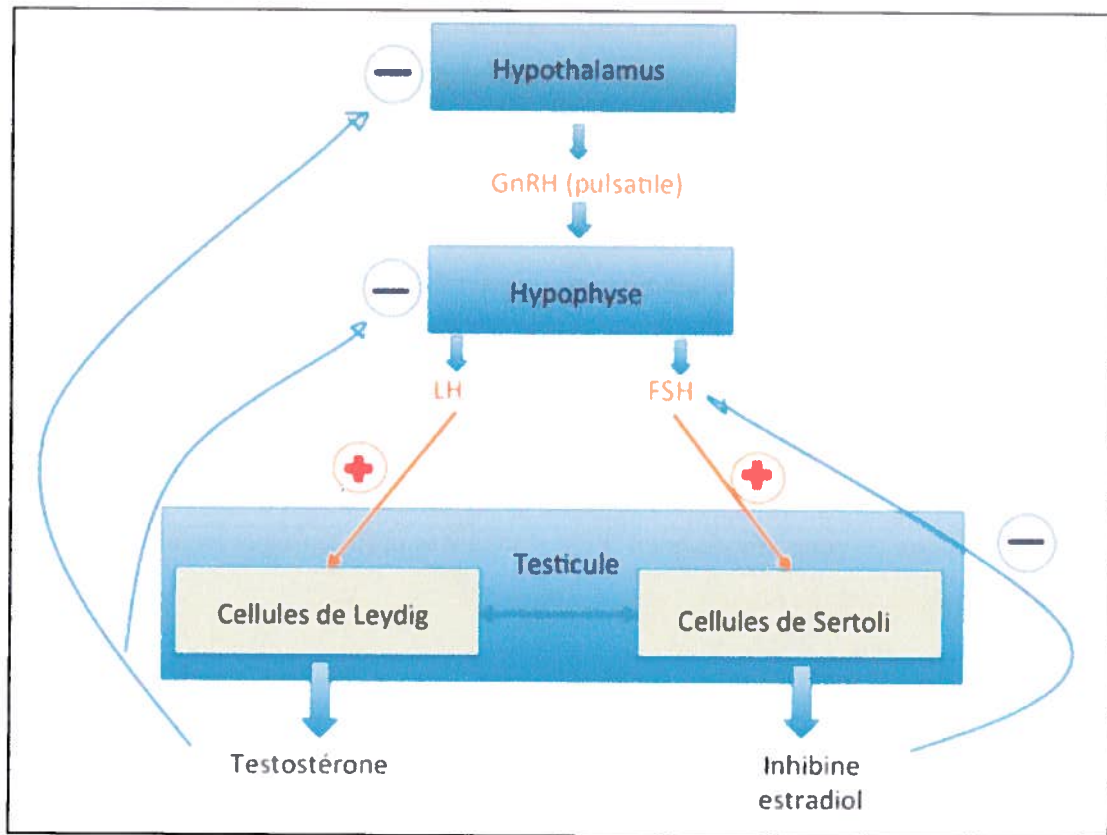


Figure 2. La régulation endocrinienne de la synthèse de la testostérone (Inspirée de Clayton R.N., Catt K.J., Endocrine Reviews, 1981).

La synthèse de la testostérone a lieu dans le tissu interstitiel des testicules, elle est continue de la puberté à la mort. Sa régulation fait intervenir les hormones hypophysaires LH et FSH. La FSH permet la synthèse des spermatozoïdes tandis que la LH permet la synthèse de la testostérone en agissant sur les cellules de Leydig. L'hypophyse est sous le contrôle de l'hypothalamus qui sécrète de la GnRH de façon pulsatile. Cette neurohormone agit sur les cellules hypophysaires et stimule la sécrétion des gonadostimulines. Un rétrocontrôle négatif est assuré par la testostérone pour activer ou inhiber l'axe hypothalamo-hypophysaire pour maintenir le taux de testostérone stable.

Le processus de synthèse des stéroïdes, leurs actions ainsi que leur métabolisme peuvent être divisés en 5 parties. (1) la conversion du cholestérol en prégnénolone, (2) sa conversion en différents intermédiaires et en stéroïdes actifs (3) le métabolisme des précurseurs et des

hormones dans les organes périphériques (4) leurs effets métaboliques spécifiques dans les tissus cibles (5) leurs dégradation.

- (1) La conversion du cholestérol en prégnénolone : le cholestérol provient de la synthèse endogène (dans le RE à partir de l'acétylCoA), de l'apport exogène (LDL) ou des stocks cellulaires (cytosol). Le cholestérol circulant est associé aux LDL. Il entre dans la cellule par fixation aux récepteurs LDL membranaires où il est soit utilisé soit stocké dans des vacuoles cytoplasmiques sous forme d'esters de cholestérol. Ces vacuoles sont situées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Lorsque la cellule reçoit un stimulus, le cholestérol est mobilisé pour la stéroïdogénèse. Il est alors transféré de la membrane externe de la mitochondrie à la membrane interne grâce à un complexe protéique qui comprend la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory peptide) présente dans les gonades et les corticosurrénales. La stéroïdogénèse débute alors avec la conversion du cholestérol (C27) en prégnénolone (C21) dans la face interne de la mitochondrie grâce à une enzyme du cytochrome P450 scc (side chain cleavage) codée par le gène CYP11A1. La prégnénolone est le premier stéroïde commun à la synthèse de tous les stéroïdes.
- (2) La conversion du prégnénolone en intermédiaires et en stéroïdes actifs : les enzymes présentes dans les cellules stéroïdogéniques déterminent le stéroïde qui sera synthétisé à partir du prégnénolone. Par exemple, le prégnénolone est converti en aldostérone dans la zone glomérulée de la glande surrénale. En revanche, il est converti en androstènedione dans les cellules de la thèque dans les ovaires puisqu'elles n'ont pas les enzymes nécessaires pour synthétiser de l'aldostérone.
- (3) Le métabolisme des précurseurs et des hormones dans les organes périphériques : seuls quelques organes sont capables de synthétiser des stéroïdes à partir du cholestérol ; par contre plusieurs organes sont capables de transformer les stéroïdes circulant provenant d'autres sources. Par exemple le DHEA de la glande surrénale est converti en testostérone dans les tissus périphériques et cette voie est la principale source de testostérone chez les

jeunes femmes. La peau, le cerveau et le foie ont aussi la capacité de synthétiser des stéroïdes.

- (4) Les effets métaboliques spécifiques dans les tissus cibles : les hormones peuvent être activées ou devenir plus effectives dans les cellules cibles comme l'exemple de la testostérone qui est convertie en DHT dans la prostate.
- (5) L'inactivation des stéroïdes : le catabolisme des stéroïdes a lieu dans les tissus cibles et dans le foie. Les stéroïdes sont hydrophobes, ils sont transformés en stéroïdes hydrosolubles excrétés dans les urines. Pour cela ils subissent deux transformations : la conjugaison (qui comprend la sulfonation et la glucuronidation) et l'hydroxylation.

La conjugaison

Les enzymes de la conjugaison comprennent les sulfotransférases et les UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Elles jouent un rôle important dans le contrôle de l'activité des stéroïdes sexuels. En effet, elles augmentent leur polarité en ajoutant des groupements qui augmentent leur solubilité dans le sang et facilitent ainsi leur excrétion dans les urines ou la bile. Il existe cependant une différence majeure entre ces deux groupes d'enzymes. La sulfotransférase inactive le stéroïde actif grâce à un groupement sulfate qui pourrait être réactivé ultérieurement par une sulfatase présente dans le tissu. En revanche, la formation d'un dérivé glucuronide par une UGT est irréversible et provoque l'élimination définitive du stéroïde.

- La sulfotransférase

La sulfonation a lieu dans le foie grâce à l'hydroxystéroïde sulfotransférase (HSST, SULT 2A1), présente dans le cytosol et dans la membrane de l'appareil de Golgi. C'est un procédé de désactivation et de détoxification, catalysée par un groupe d'enzymes cytosoliques du nom de sulfotransférases (SULT). Ces dernières ajoutent de manière unidirectionnelle un groupement sulfate, provenant du coenzyme PAPS, aux groupements hydroxyles présents sur les stéroïdes actifs.

- Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT)

Les UGT catalysent un processus biochimique appelé glucuronidation, ils sont présents dans le réticulum endoplasmique et permettent le transfert irréversible d'acides glucuroniques sur différentes molécules endogènes et exogènes [33]. L'ajout d'un groupement glucuronide provoque un encombrement stérique qui empêche la liaison du stéroïde à son récepteur et aboutit à son excrétion de la cellule. La famille des UGT est divisée en deux sous-groupes: les UGT1 et les UGT2. Les enzymes du premier sous-groupe sont principalement actives sur les phénols, la bilirubine et les estrogènes (UGT1A). Le second sous-groupe se divise en deux sous-familles, les UGT2A et les UGT2B; celles-ci sont impliquées dans la glucuronidation des androgènes en position 3 α - ou 17 β -hydroxy plus particulièrement au niveau du foie, mais aussi dans les tissus périphériques (Figure 3). Dans la prostate humaine, ce sont les UGT2B15 et UGT2B17 qui sont responsables de la glucuronidation du DHT et de ses métabolites [34].

L'hydroxylation

L'hydroxylation est effectuée par des hydroxylases du cytochrome P450 qui transforment les stéroïdes en produits polaires pour faciliter leur excrétion dans l'urine [35].

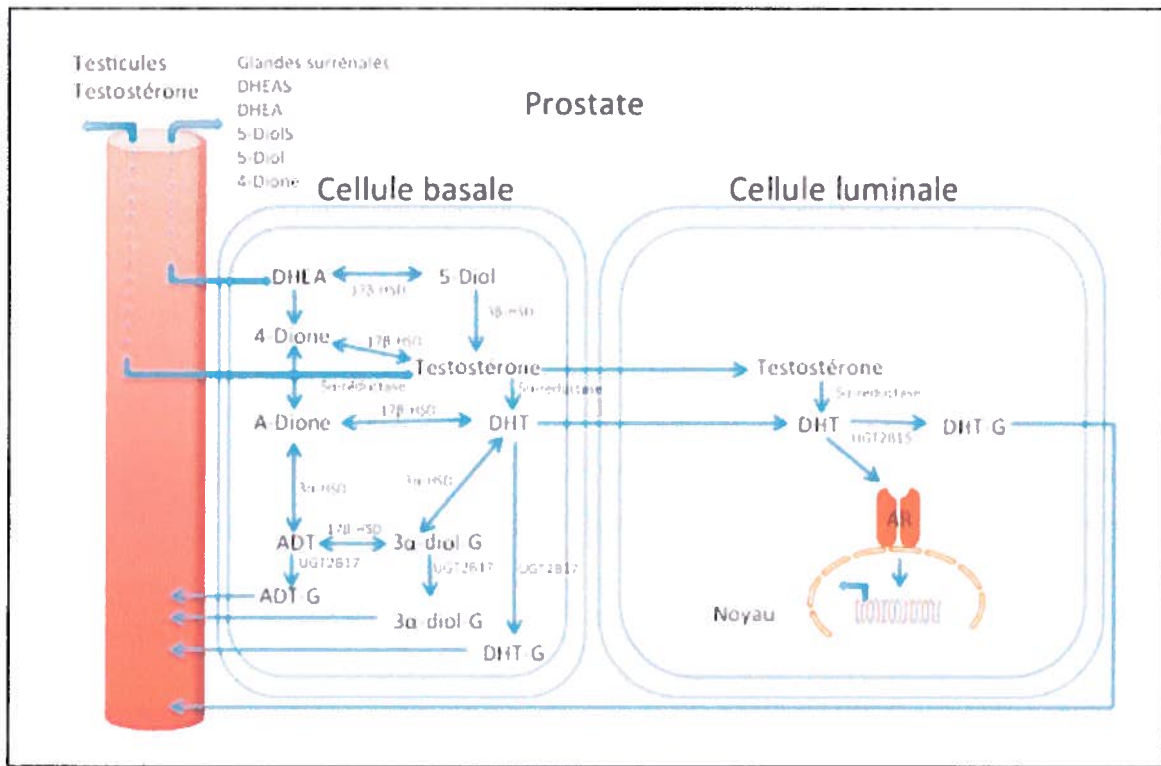


Figure 3. Synthèse et dégradation des stéroïdes dans les cellules épithéliales de la prostate (Adaptée de Labrie F. et al., Journal of Endocrinology 2005).

Le catabolisme des androgènes débute par la conversion des androgènes actifs en androgènes inactifs DHEA, 3 alpha-diols et ADT suivi par leur glucuronidation par trois enzymes UGT2B17, UGT2B15 et UGT2B7, responsables de la glucuronidation de tous les androgènes et leurs métabolites chez l'humain. DHEA, déhydroépiandrosterone ; 4-Dione, androsténédione ; A-Dione, 5-alpha-androstane-3,17-dione ; ADT, androstérone ; 5-Diol, androst-5-ène-3-alpha,17 bêta-diol ; UGT2B17, uridine glucuronosyl transférase 2B17 ; HSD, hydroxystéroïde déshydrogénase.

Les enzymes intervenant dans la synthèse *de novo* des stéroïdes sexuels sont la P450_{scc}, la 3 β -HSD, la CYP17, la 17 β -HSD, la 3 α -HSD, la sulfatase, la CYP19 et la SRD5A. Cependant, les principales enzymes intervenant dans la synthèse des hormones sexuelles et qui jouent un rôle important dans l'évolution du cancer de la prostate sont la CYP19 et la SRD5A.

1.1.2.2.1 La P450scc

La P450scc, aussi connue sous le nom de P450C11A1 (du gène CYP11A1), est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle catalyse la conversion du cholestérol en prégnénolone, première étape de la synthèse de toute hormone stéroïdienne. Cette réaction implique trois monooxygénations consécutives, nécessitant chacune une molécule de NADPH: une 20-hydroxylation, une 22-hydroxylation et finalement une coupure de la chaîne latérale au niveau des carbones 20 et 22 [36]. Cette enzyme est préférentiellement exprimée dans la corticosurrénale [37], les testicules [38], les ovaires [39], le placenta [37] et plus faiblement dans le cerveau [40] et la peau [41] (Figure 4).

1.1.2.2.2 La 3 β -HSD

La prégnénolone synthétisée à partir du cholestérol peut être convertie en 17-OH-PREG par la CYP17 ou servir de substrat à la 3 β -HSD et générer, entre autres, la progestérone, le premier stéroïde biologiquement important. Cette enzyme microsomale de la famille des déshydrogénases à courte chaîne est nécessaire à la formation de toutes les classes d'hormones stéroïdiennes. Elle convertie, entre autres, la prégnénolone en progestérone, la 17-OH-prégnénolone en 17-OH-progestérone et la DHEA en androsténédione. Il existe deux types de 3 β -HSD chez l'homme avec 93 % d'homologie, la HSD3B1 présente dans les tissus périphériques, le placenta [42], le foie [43], la peau [44] et la prostate [45], et la HSD3B2 présente uniquement dans les gonades et la surrénale [46] (Figure 4).

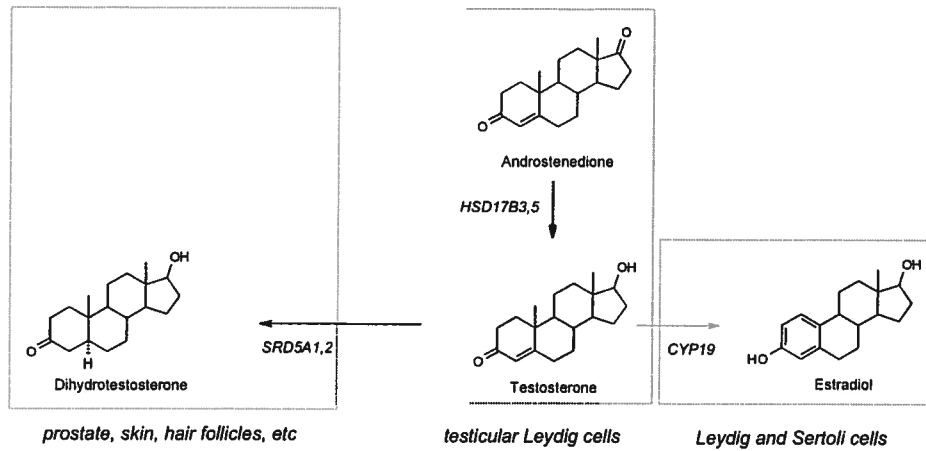
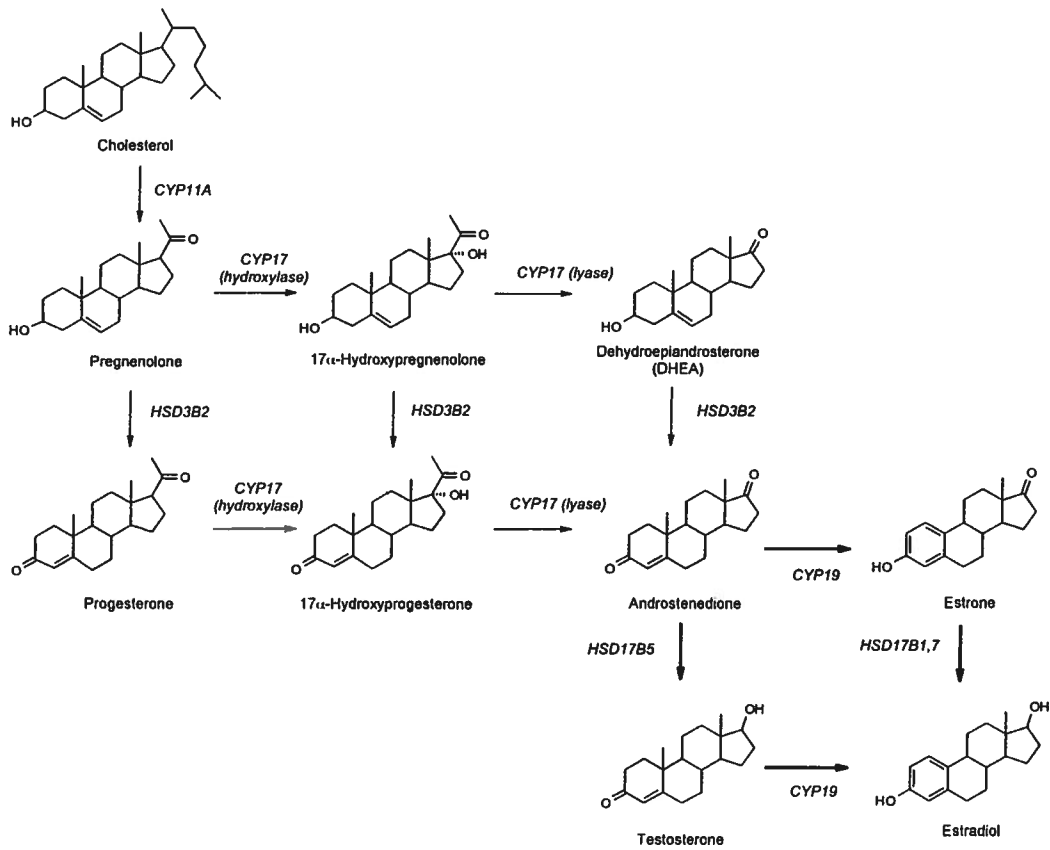


Figure 4. Synthèse *de novo* des hormones androgènes et oestrogènes

1.1.2.2.3 La CYP17

Elle est responsable de la synthèse des androgènes de la glande surrénale. Les glandes surrénales sont deux glandes endocrines triangulaires situées au-dessus des reins. Elles comprennent deux structures distinctes : la médullosurrénale et la corticosurrénale.

La corticosurrénale est divisée en trois zones, de l'extérieur vers l'intérieur : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée [47]. La zone réticulée : synthétise la DHEA et l'androstènedione, elle représente 10 % de la corticosurrénale.

CYP17 est capable de catalyser trois activités : une 17 α -hydroxylase qui produit les précurseurs du cortisol, une 17, 20 lyases qui produit les précurseurs des hormones sexuelles et une faible activité 16 α -hydroxylase qui hydroxyle la progestérone et la DHEA [48]. CYP17 est aussi présente au niveau des ovaires, des testicules et de la prostate. Elle n'est cependant pas présente dans le placenta humain [38].

CYP17 est une enzyme importante qui hydroxyle la prégnénolone et la progestérone dans la zone fasciculée et clive la 17-hydroxyprégnénolone en DHEA dans la zone réticulée. Le taux de DHEA augmente continuellement à partir de 6 ou 7 ans pour atteindre son maximum à l'âge de 20 ans puis commence à décroître jusqu'à 15 % à 90 ans [49]. CYP17 convertie aussi la prégnénolone en DHEA dans les gonades.

Les deux activités de la CYP17 dans la zone réticulée de la glande surrénale, sont transitoires durant la vie d'un individu ; ce phénomène s'appelle l'adrenarche [50]. L'adrenarche apparait chez l'homme ou la femme avant la puberté à environ 8 ans, lorsque la glande surrénale augmente sa production d'androgènes. Puis de l'enfance à l'âge adulte, le taux d'androgène augmente avec l'augmentation de l'activité de clivage de CYP17 (17, 20 lyases). Cette activité atteint son maximum à l'âge de 25-35 ans puis décroît (Figure 4).

1.1.2.2.4 La 17 β -HSD

Les stéroïdes sexuels actifs (testostérone, DHT) possèdent tous un groupement hydroxylé en position 17 β du noyau stéroïdien. La réduction du groupement 17-céto en groupement 17 β -hydroxy est catalysée par les 17 β -HSD. À ce jour, 15 isoenzymes ont été identifiées chez les mammifères [51, 52], dont au moins 13 se retrouvent chez l'homme. Certaines sont responsables

de l'activation des 17-cétostéroïdes (les types 1, 3, 5, 7, 12, 15), alors que d'autres assurent l'inactivation des 17 β -hydroxystéroïdes (les types 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 et 14), en utilisant respectivement le NADPH et le NAD⁺ comme cofacteurs [53].

1.1.2.2.5 La 3 α -HSD

La 3 α -HSD catalyse la réduction des 3-cétoséroïdes en 3-hydroxystéroïdes. Ces enzymes sont principalement en charge de réguler la biodisponibilité du DHT, et secondairement celle de l'androstènedione dans les tissus périphériques. Il existe deux types de 3 α -HSD : le type 1 (du gène AKR1 C4), qui est exprimé au niveau du foie [54] et le type 3 (du gène ARK1 C2) qui est retrouvé, entre autres, dans le foie et la prostate [55].

1.1.2.2.6 La sulfatase

La sulfatase (du gène STS) est une estérase microsomale qui hydrolyse le groupement sulfate de substrats tels que les stéroïdes C19 et les oestrogènes. Elle permet de métaboliser le DHEA-S, présent en grande quantité chez l'homme en DHEA. Ce dernier est converti ultérieurement en androgènes et en oestrogènes actifs [56].

1.1.2.2.7 La CYP19

L'aromatase est l'enzyme qui assure la conversion des androgènes en œstrogènes (Figure 4). Elle est composée d'un cytochrome P450 spécifique : le P450arom et une flavoprotéine : la NADPH-cytochrome-P450 réductase. L'aromatation des androgènes en œstrogènes a lieu dans le réticulum endoplasmique. Trois moles de NADPH et trois moles d'oxygènes sont nécessaires pour la formation d'une mole d'œstrogènes [57, 58].

Elle est exprimée au niveau de différents tissus incluant les cellules de la granulosa des ovaires, le syncytiotrophoblaste du placenta, les cellules de Leydig des testicules ainsi que certains tissus non stéroïdogéniques tels que le cerveau, le tissu adipeux, le foie, les muscles et la peau [30, 35, 59]. Chez l'homme, l'aromatase convertit la testostérone provenant des cellules de Leydig en œstradiol dans les cellules de Sertoli ; c'est une étape importante dans l'initiation de la

spermatogenèse [60]. Chez la femme avant la ménopause, le taux le plus élevé d'aromatase est localisé dans les cellules de la granulosa des ovaires où elle permet la conversion de la testostérone en œstradiol et l'androstènedione en œstrone durant la phase folliculaire. Après la ménopause, le tissu qui exprime le plus l'aromatase est le tissu adipeux.

L'expression de l'aromatase est régulée par l'utilisation différentielle de promoteurs spécifiques à chaque tissu. Le gène de l'aromatase est transcrit du télomère vers le centromère du chromosome 15q 21.2, et la région qui code pour la protéine CYP19 est de 30 kb et contient 9 exon (II-X). Le site d'initiation de la traduction est localisé dans l'exon II. En amont du gène, une région de 93 kb contient différents promoteurs. Le promoteur (II), (I.3) (exprimé dans le tissu adipeux et le cancer du sein) et (I.6) (exprimé dans les os) sont localisés à 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription ATG dans l'exon II. Dans les gonades, l'expression de CYP19 est régulé par le promoteur II, dans le placenta les promoteurs sont (I.1 et 2a), dans le cerveau le promoteur spécifique est le (I.f), dans les cellules endothéliales (I.7), dans le tissu fœtal (I.5) et dans le tissu adipeux (I.4) (Figure 5).

Dans une prostate saine, CYP19 est uniquement exprimée dans les cellules stromales en faible quantité.

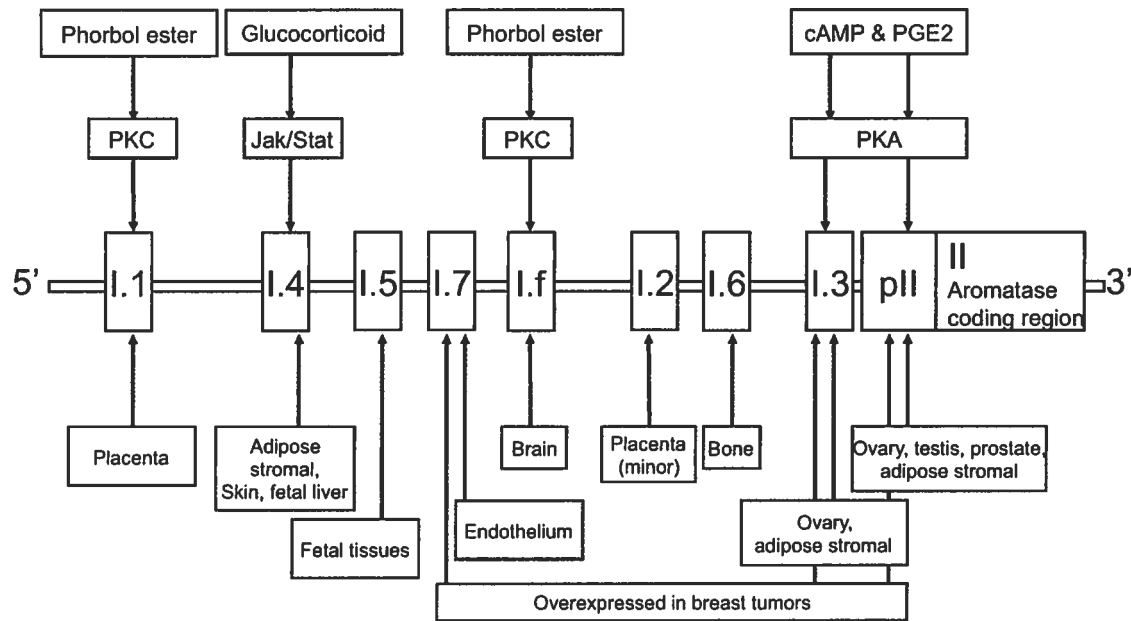


Figure 5. Les promoteurs et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la CYP19 (Adaptée de Bulun, S.E., *The journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003).

Schéma décrivant les promoteurs, spécifiques à chaque tissu, du gène codant pour la CYP19 dans le génome humain. La région codante et la protéine traduite sont identiques dans tous les tissus.

1.1.2.2.8 La SRD5A

La 5 α -réductase convertie la testostérone en DHT (Figure 4). Cette réaction est faible au niveau d'un testicule adulte, mais est prédominante dans l'épididyme et la prostate puisque la DHT joue un rôle important dans le maintien des fonctions sexuelles. La testostérone et la DHT activent le même récepteur aux androgènes mais exercent des fonctions différentes. Au début du développement embryonnaire, la testostérone est responsable de la différenciation du canal de Wolff en ses dérivés, qui comprennent l'épididyme, le canal déférent et les vésicules séminales.

Quant à la DHT, elle intervient dans la différenciation du sinus urogénital (où la prostate se développe) et des organes génitaux externes. De plus, elle permet l'apparition des caractères sexuels secondaires masculins à la puberté [61].

La différence majeure entre les deux androgènes apparaît à faible concentration. En effet, l'action de la testostérone sur la prostate n'est possible qu'à partir d'un certain seuil en dessous duquel elle n'a pas d'effet. Par contre, même à faibles concentrations, la DHT est capable de stimuler la croissance de la prostate. Le rôle majeur de la 5 α -réductase est donc d'améliorer le signal aux androgènes en convertissant la testostérone en DHT. Elle assure ainsi les fonctions normales de la prostate même lorsque la concentration en androgènes circulants est faible [1, 62].

Il existe deux types de 5 α -réductase :

- La SRD5A1 est présente dans le foie, la peau (à l'exception des organes génitaux), le cerveau et en faible quantité dans la prostate dans le noyau des cellules épithéliales et stromales. Elle intervient dans la différenciation des organes sexuels mâles (pénis, scrotum, urètre) et est surexprimée dans le cancer de la prostate. Elle est codée par le gène SRD5A1 qui a une structure de 5 exons et de 4 introns, localisée sur le chromosome 5p15, elle est composée de 259 acides aminés.
- La SRD5A2 est fortement exprimée dans la prostate dans le cytoplasme des cellules épithéliales et stromales, la peau des organes génitaux, l'épididyme, le follicule des cheveux, les seins, l'utérus, les testicules, la vésicule séminale et le foie. La SRD5A2 est aussi présente dans l'utérus, les ovaires, le placenta et le cerveau, mais en plus faible quantité. Elle est codée par le gène SRD5A2 (qui a la même structure que le gène SRD5A1), localisé dans le chromosome 2p23. Elle est composée de 254 acides aminés.

Les recherches de Huggins et Hodges en 1941 ont montré que la croissance et le développement de la prostate dépendaient des androgènes. Ils ont été les pionniers du traitement par hormonothérapie des patients atteints du cancer de la prostate à un stade localement avancé ou métastatique [63]. Cependant, les recherches de Gittes et Laufer ont montré que malgré une réponse initialement positive des patients traités par blocage androgénique (80 à 90 % des cas), la tumeur évoluait vers un stade androgène-indépendant [64, 65].

1.1.3 Progression vers un cancer hormono-indépendant

Les inflammations chroniques, l'alimentation ainsi que les facteurs héréditaires sont, entre autres, responsables de l'apparition d'un cancer de la prostate et de son évolution. Les lésions évoluent vers une tumeur qui progresse lentement vers une maladie invasive (Figure 6). Les androgènes et leurs récepteurs (AR) interviennent à tous les niveaux de la progression du cancer. En effet, le récepteur aux androgènes est un régulateur qui maintient la survie et le bon fonctionnement d'une prostate saine mais induit une prolifération cellulaire incontrôlée dans le cas d'un cancer.

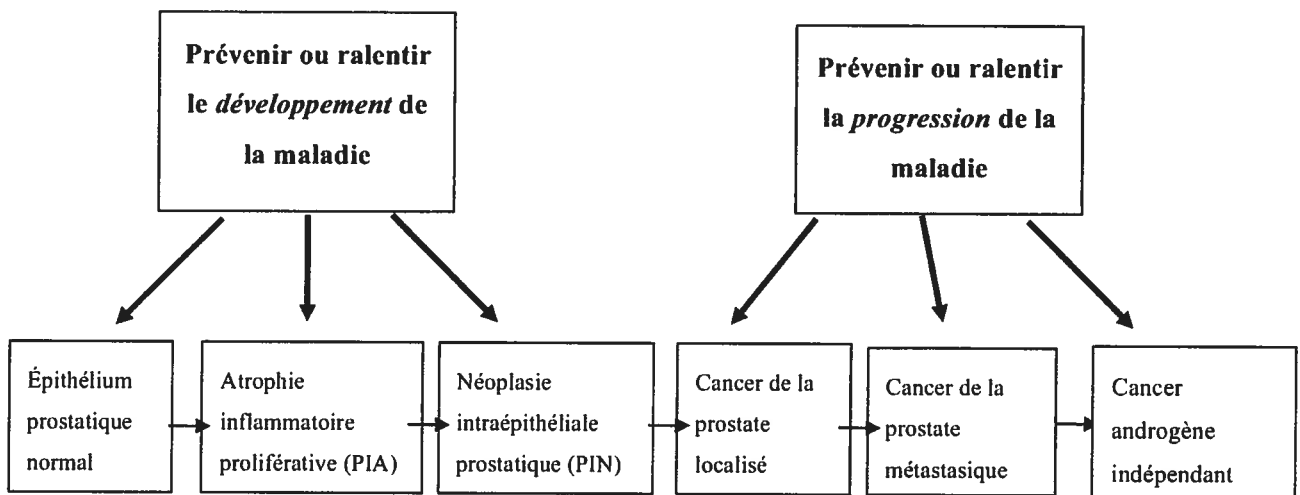


Figure 6 Les différentes étapes avant l'apparition d'un cancer de la prostate androgène-indépendant (Adaptée de Tindall D.J., Rittmaster R.S., Journal of Urology, 2008).

L'évolution du cancer de la prostate vers un état androgène indépendant fait intervenir essentiellement le AR [66-68]. Pour cette raison, il est important d'identifier son mécanisme d'action afin de comprendre cette évolution.

Les androgènes et les AR représentent la cible préférentielle dans le traitement du cancer de la prostate depuis la découverte de la thérapie par la castration il y a 71 ans par Huggins et Hodges [11]. Les premiers traitements consistaient à inhiber l'activité du AR avec des activateurs du GnRH comme le goserelin ou le leuprolide. L'utilisation d'inhibiteurs directs du AR est apparue plus tard, comme le bicalutamide qui a deux mécanismes d'action [69, 70], le premier est un inhibiteur compétitif du DHT, le second recrute des inhibiteurs transcriptionnels

des AREs comme le NcoR [71]. Au niveau cellulaire, l'inhibition du AR induit la mort cellulaire ou l'arrêt du cycle cellulaire et de ce fait la régression tumorale [72-77]. En effet, 80 % des patients présentant un cancer à un état avancé, répondent positivement au blocage androgénique.

Initialement la croissance et la survie des cellules cancéreuses dépendent des androgènes. Lorsque le cancer est diagnostiqué à temps, le blocage androgénique par castration chimique ou par ablation chirurgicale des testicules, organes majeurs de la production des androgènes, constitue une stratégie thérapeutique efficace. Cependant, malgré un blocage continu des androgènes, la maladie finit toujours par progresser après quelques années [78]. La tumeur récidive invariablement [79-81] et cela est précédé d'une augmentation du taux de PSA [20, 80, 82]. Il est certain alors que la progression de la tumeur est reliée à une restauration anormale du AR. Cette réactivation fait intervenir différents mécanismes : une amplification du gène codant pour le AR, des mutations du AR, des changements de concentration des corégulateurs, une altération des voies de la stéroïdogénèse ou encore une activation du AR par un mécanisme ligand indépendant.

1.1.3.1 Sensibilité accrue du AR

1.1.3.1.1 Amplification du gène codant pour le AR

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la surexpression du AR et l'évolution du cancer vers un état androgène-indépendant. En effet, 25 % à 30 % des tumeurs androgène-indépendantes présentent une amplification du gène codant pour le AR [83]. Il est alors surexprimé au niveau de l'ARNm et des protéines [83-85]. Cependant, cette amplification n'apparaît pas dans le cas de cancers non traités par hormonothérapie. Cela suggère que la castration hormonale induit l'amplification du gène codant pour le AR et l'évolution vers une hormono-indépendance. La surexpression au niveau protéique du AR permet aux cellules cancéreuses de survivre et de proliférer même avec un taux très faible d'androgènes, ceci explique l'évolution du cancer sous castration androgénique [86].

1.1.3.1.2 Augmentation de la sensibilité du AR

Un autre mécanisme permettant la progression du cancer de la prostate a été identifié chez un modèle animal [87]. Cette voie comprend une surexpression du AR, une stabilité accrue du AR et une translocation vers le noyau plus efficace. Cela apparait dans plusieurs cellules tumorales qui deviennent plus sensibles aux effets prolifératifs de la DHT. En effet, la concentration nécessaire à la croissance de ces cellules devient 4 fois plus faible que celle nécessaire aux cellules LNCaP androgène-dépendantes.

1.1.3.1.3 Augmentation du taux d'androgènes

Des études récentes ont montré que les cellules cancéreuses de la prostate sont capables de produire *de novo* des androgènes permettant le maintien de l'activité du AR [88]. En effet, pour contourner la faible teneur en testostérone dans la circulation, les cellules tumorales augmentent la production locale en androgènes. De plus, elles augmentent la conversion de la testostérone en DHT, plus active, en augmentant l'activité de la SRD5A. Il en résulte une augmentation de la voie de signalisation du AR même lorsque la concentration en testostérone dans le sérum est faible. Ce mécanisme a été confirmé dans une étude où la thérapie par castration hormonale a induit une diminution de la testostérone de 95 % contre une diminution de la concentration en DHT de 60 % seulement [89] dans le tissu de la prostate. De plus, des études épidémiologiques ont montré que certains groupes ethniques ayant une activité de la SRD5A élevée, présentent une incidence du cancer de la prostate plus élevée [90]. En plus des prédispositions génétiques, une sélection naturelle se met en place durant la castration hormonale. En effet, les cellules tumorales finissent par acquérir une mutation du gène codant pour la SRD5A ou surexpriment l'enzyme.

1.1.3.2 Les modifications génétiques du AR

1.1.3.2.1 Mutations du AR

Les mutations du gène codant pour le AR sont fréquentes lorsque le cancer est à un état avancé ou récidive [91]. Elles ont été rapportées chez 10 % à 20 % des patients qui présentent des tumeurs androgène-indépendantes. Cela confirme que ces mutations permettent aux cellules

de proliférer dans un milieu privé d'androgènes [91]. Il existe plusieurs mutations qui ont été recensées dans une base de données. La première a été identifiée dans les cellules LNCaP. Elle est apparue dans le domaine de liaison au ligand et induit une diminution de la spécificité du ligand. Elle permet donc aux cellules de survivre même lorsqu'elles sont privées d'androgènes puisque le AR peut être activé par d'autres hormones comme les œstrogènes et les anti-androgènes [91] (Figure 7).

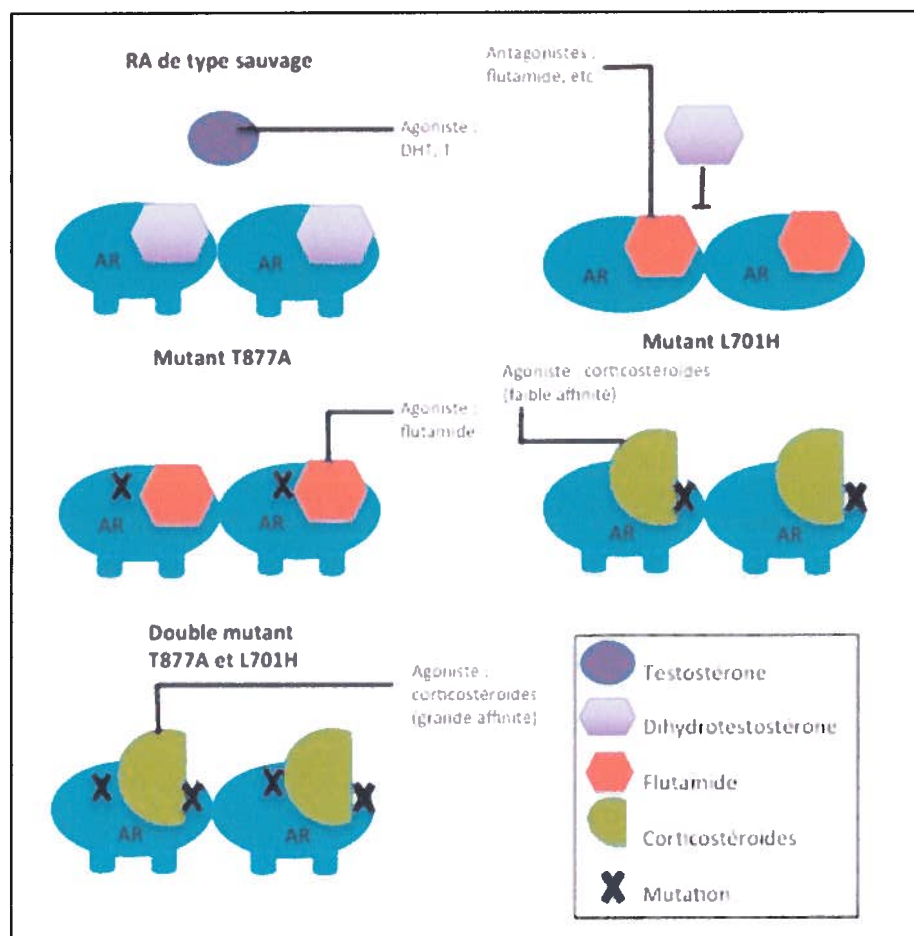


Figure 7 Quelques mutations survenant sur le AR (Adaptée de Feldman B.J, Feldman D., Nature Reviews Cancer, 2001).

La testostérone et la DHT sont des agonistes du AR sauvage contrairement au flutamide qui est un antagoniste. Le mutant T877A est activé par des hormones stéroïdes non androgéniques ainsi que par le flutamide. Le mutant L701H présente une faible affinité pour les corticostéroïdes. Lorsque les deux mutations T877A et L701H sont combinées, le AR formé a une grande affinité pour les corticostéroïdes

1.1.3.2.2 Changements d'expression des corégulateurs du AR

Le AR est un facteur de transcription qui interagit avec plusieurs protéines corégulatrices pour former un complexe transcriptionnel. Ces corégulateurs peuvent activer ou inhiber le AR et bloquer la transcription de certains gènes cibles. A ce jour 170 protéines corégulatrices ont été identifiées [92]. Un déséquilibre entre ses corégulateurs peut donner l'avantage aux cellules cancéreuses et favoriser leur prolifération. Les coactivateurs recrutent des facteurs de transcription pour activer les gènes régulés par le AR. En revanche, les corépresseurs forment des complexes avec le AR et inhibent la transcription des gènes cibles du AR.

1.1.3.3 *L'activation du AR par un mécanisme ligand indépendant via ...*

1.1.3.3.1 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance IGF1 (Insulin-like Growth-Factor-1), KGF (Keratinocyte Growth Factor) et EGF (Epidermal Growth Factor) sont capables d'activer le AR en surexprimant certains coactivateurs (TIF2) [93]. De plus, ils sont capables d'induire l'expression des gènes cibles du AR en l'absence d'androgènes [94]. IGF-1 est le facteur de croissance le plus puissant testé, puisqu'il est capable d'augmenter cinq fois la sécrétion du PSA dans les cellules LNCaP [94]. Ces facteurs de croissance sont des ligands pour le récepteur à tyrosine kinase. Ils initient des cascades intracellulaires complexes. Cependant, leurs effets sur la voie de signalisation du AR ne sont pas encore bien définis. Leur mode d'action n'est pas encore déterminé (action directe sur le AR ou sur une molécule en aval impliquée dans la voie de signalisation). Ils sont surexprimés dans certains cancers de la prostate. Le casodex, un antagoniste du AR, est capable de bloquer complètement l'activation du AR induite par IGF-1, KGF et EGF [94]. Cela indique que le domaine de liaison du AR avec son ligand est nécessaire à cette activation. Cependant, cela n'explique pas le développement d'un cancer androgène-indépendant chez les patients traités au casodex. Il est possible que la surexpression des facteurs de croissance soit combinée aux mutations du AR. Cela expliquerait l'apparition d'une AIPC (androgen independent prostate cancer) chez ces patients. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

1.1.3.3.2 Les cytokines

Plusieurs cytokines sont capables d'activer le AR (IL-6, IL-8) via la voie de signalisation du NF- κ B. En effet, une étude menée par Wallner (2006) a permis de mettre en évidence la contribution de la cytokine IL-6 dans le développement du cancer de la prostate androgène-indépendant [95]. L'IL-6 est capable de stimuler l'activité du RA par un mécanisme ligand-indépendant [96] qui induit une augmentation de la croissance cellulaire [97]. La surexpression d'IL-6 protège de l'apoptose induite par la privation androgénique *in vitro* [97] et *in vivo* [98]. L'activation du AR par l'IL-6 est bloquée par les inhibiteurs de PKA, PKC (Protéine Kinase C) et MAPK (mitogen-activated protein kinase) suggérant que ces voies de signalisation sont impliquées dans l'activation du récepteur [96]. De plus, Ueda et al. (2002) ont montré que la phosphorylation de la protéine co-activatrice SRC-1 par les MAPK est nécessaire pour une activation optimale du RA par l'IL-6 [99].

L'IL-8 permet la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate lorsqu'elles sont déprivées en androgènes. L'équipe de Lee et al. (2000) a montré qu'une courte exposition (30 à 120 min) des cellules LNCaP à l'IL-8 induit la liaison du AR à la région ARE présente sur le promoteur du PSA, via l'activation de src, et a conclu à une activation de la voie de signalisation du AR via l'IL-8 exogène [100]. En revanche l'équipe de Araki et al. (2007) a montré qu'une exposition prolongée des cellules androgènes-dépendantes à l'IL-8 induit une inhibition de l'expression du AR et une activation de l'expression de certains facteurs de croissance comme Akt et NF- κ B [101].

1.1.3.3.3 Les récepteurs à tyrosine kinase

Les RTK (Receptor Tyrosine Kinase) sont des molécules de signalisation, surexprimées dans le cas d'un cancer. En effet, le récepteur HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor-2), un récepteur à tyrosine kinase, membre de la famille des récepteurs EGF est surexprimé dans les lignées cellulaires androgène-indépendantes provenant de xénogreffes de souris castrées [102]. Des études récentes ont montré que la surexpression du récepteur HER-2/neu peut activer le AR via la voie des MAPK. Cette dernière peut phosphoryler le AR *in vitro* et induire son activation [103]. Cette voie est indépendante du domaine de liaison au ligand et permet l'activation des gènes dépendants du AR en l'absence de ses ligands [102, 103] (Figure

8). Les cellules androgène-dépendantes peuvent alors être converties en cellules androgène-indépendantes. L'activation du récepteur HER-2/neu est un mécanisme important expliquant la progression du cancer de la prostate vers une hormono-indépendance.

Il existe une autre alternative permettant au récepteur HER-2/neu d'induire l'activation du AR via la voie Akt [104, 105]. En effet, lorsque Akt est activée par HER-2/neu, elle phosphoryle le AR sur la sérine 213 et la sérine 791 [104], le transformant en un récepteur androgène-indépendant (Figure 8).

La relation entre l'activation du AR par la voie des MAPK et la voie Akt ainsi que leurs implications dans le développement d'un cancer de la prostate androgène-indépendant n'ont pas encore été déterminés.

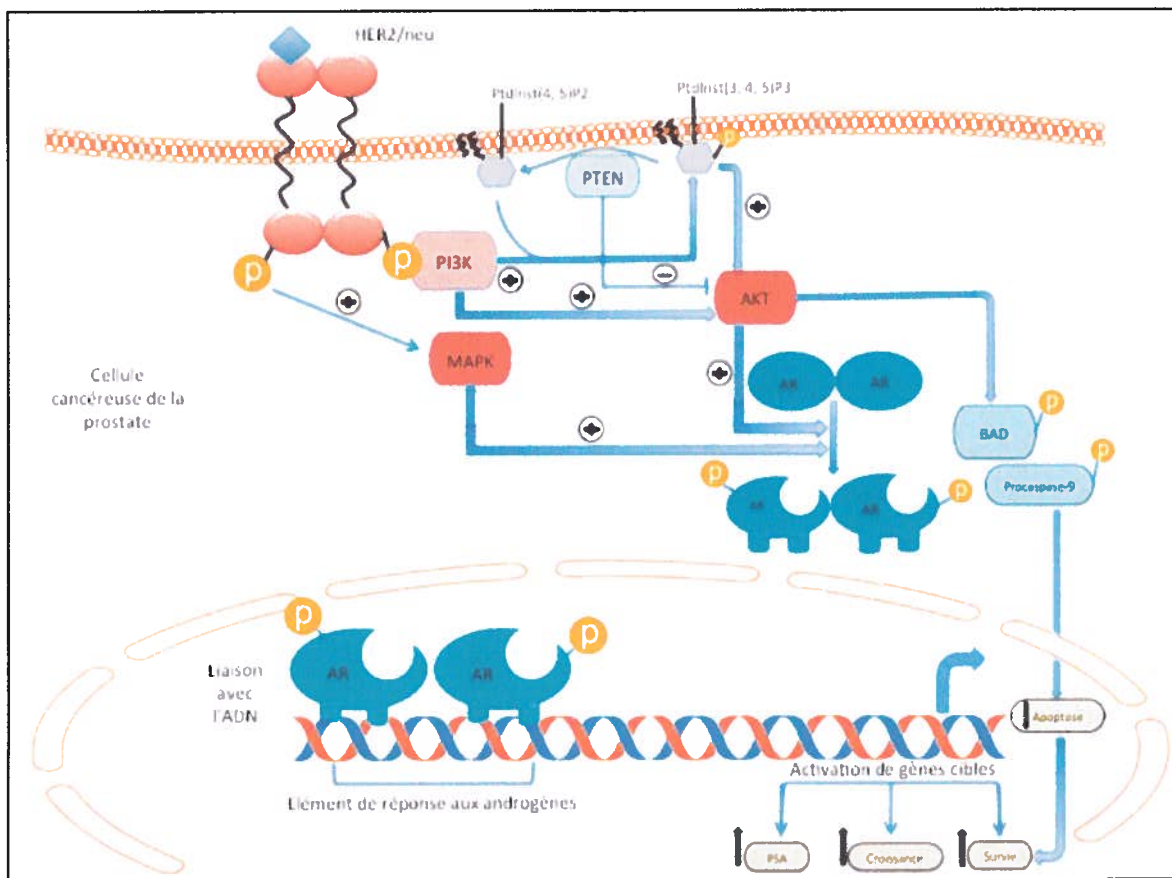


Figure 8 Création d'une voie d'activation du AR via les facteurs de croissance (Adaptée de Feldman B.J, Feldman D., Nature Reviews Cancer, 2001).

Le récepteur HER-2/neu (ou d'autres récepteurs à tyrosine kinase) peut être surexprimé dans le cas de cellules tumorales déprivées en androgènes. Il active indirectement la MAPK qui a son tour phosphoryle le AR et l'active. Il est également possible d'activer le AR via la voie AKT. En effet, le récepteur HER-2/neu augmente le taux de phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) via la PI3K ce qui active AKT. Un autre moyen d'activer AKT consiste à inactiver la phosphatase à lipides PTEN ce qui inhibe la conversion du PtdIns(3,4,5)P₃ en son substrat PtdIns(4,5)P₂. AKT peut également activer des voies de survie cellulaire en phosphorylant et inactivant des protéines pro-apoptotiques comme BAD et la procaspase-9.

1.1.3.3.4 La voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt (contraction de *Wingless* mutant de *Drosophila* et de *int*, lignée cellulaire maligne) relayée par la β -caténine est impliquée dans l'embryogenèse, la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration, la communication entre les cellules, la

survie et la polarisation cellulaire [106]. Dans les tissus adultes, elle participe au contrôle de la prolifération cellulaire. Une activation anormale de cette voie par mutation de l'un ou l'autre de ses composants joue un rôle important dans un grand nombre de cancers humains. Cette voie est alors plus couramment appelée voie APC (*Adenomatous Polyposis Coli*)/ β -caténine/ TCF (*T-cell factor*).

Le gène Wnt code pour une glycoprotéine sécrétée dans le réticulum endoplasmique et qui rejoint l'appareil de Golgi pour être sécrétée dans le milieu extracellulaire. La protéine Wnt se lie à deux récepteurs différents, le premier est un récepteur à sept domaines transmembranaires le Frizzled (Fzd), le second est un co-récepteur transmembranaire à un seul domaine le LRP [107]. Le récepteur le plus important est le Fzd, il a un domaine extracellulaire riche en cystéine qui permet la liaison avec la protéine Wnt. Le récepteur Fzd est capable de transmettre au moins trois voies de signalisation différentes. Une voie canonique qui régule la β -caténine cellulaire et deux autres voies non canoniques la Wnt/PCP [108] et la Wnt/Ca²⁺.

Lorsque la voie de signalisation canonique Wnt est inactive, la β -caténine est dégradée. Lorsque la voie est active, la β -caténine est libérée dans le cytoplasme où elle exerce ses fonctions. Dans la position «OFF», la β -caténine est partie intégrante d'un complexe multiprotéique composé de l'Axine, de la protéine phosphatase PP2A, de la glycogène synthase kinase-3 β (GSK3 β) et d'APC. Au sein de ce complexe, l'interaction entre l'Axine et la GSK3 β permettra la dégradation de la β -caténine en la phosphorylant.

La position «ON» est obtenue de manière différente selon qu'il s'agisse d'un processus normal de développement ou d'un processus de carcinogenèse. Dans le premier cas, l'activation des récepteurs Fzd par la fixation de Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine dishevelled (Dsh) qui, par son association à l'Axine, empêche la GSK3 β de phosphoryler la β -caténine, rendant ainsi la liberté à cette dernière. Les β -caténines stabilisées dans le cytoplasme vont ensuite pénétrer dans le noyau et se lient au domaine N-terminal de LEF-1/TCF, ce qui induit un changement de conformation qui libère le suppresseur Groucho initialement lié au LEF-1/TCF et permet le recrutement d'autres protéines et la formation d'un complexe de transcription actif qui active les gènes cibles *c-Myc*. Ces derniers inactivent l'expression de p21 qui n'a plus d'effet sur le cycle cellulaire [109, 110].

Dans le cas d'un cancer, la voie Wnt échappe au contrôle physiologique, si bien que les cellules continuent à se diviser et à se comporter comme des cellules progénitrices malgré leur localisation à la surface de l'épithélium.

Les mutations du gène codant pour les β -caténines et le complexe boîte de destruction sont liées au développement du cancer de la prostate [66, 71, 111, 112]. De plus l'activation de la voie Wnt signifie qu'il y a développement d'une tumeur et progression de métastases [107, 113].

Il existe trois différentes interactions entre Wnt et AR qui favorisent le développement d'un cancer hormono-indépendant :

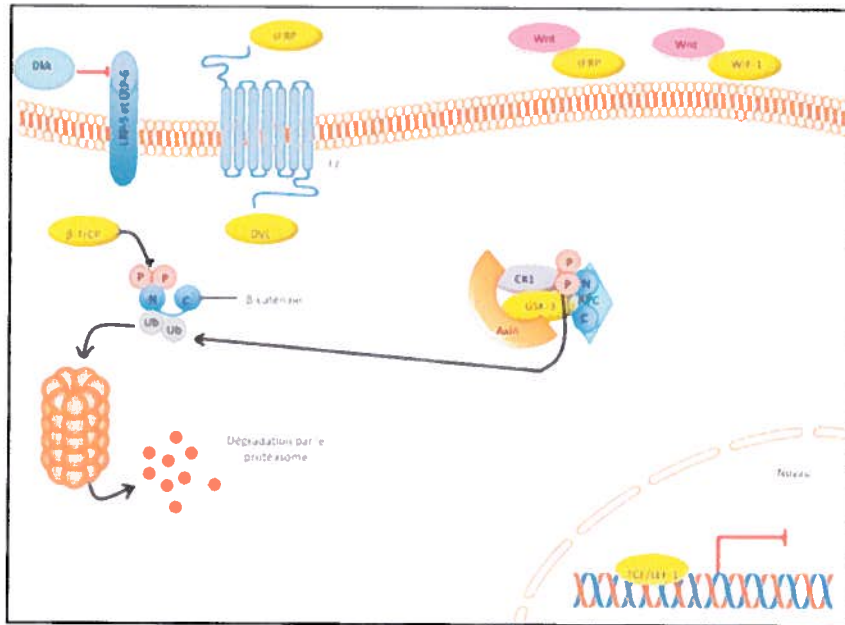
La β -caténine joue le rôle d'un ligand activateur du AR : Elle peut directement se lier à l'extrémité C-terminale du AR ce qui permet l'activation de la transcription des gènes androgène-dépendant. Elle permet aussi une utilisation plus efficace de l'androstènedione et de l'œstradiol (agonistes de la voie de signalisation des androgènes) et réduit l'effet du bicalutamide (antagoniste pharmaceutique du AR).

L'activité de GSK3 β est inhibée : GSK3 β régule la dégradation de la β -caténine et inhibe la transcription du AR. Elle agit donc comme un gène suppresseur de la tumeur. Cependant, elle est inactivée par deux voies de signalisation : la voie Wnt et la voie Akt qui sont actives dans le cas d'un cancer de la prostate ce qui explique l'évolution du cancer.

LEF-1/TCF régule l'expression de l'ARNm codant pour le AR et ses protéines : L'expression de l'ARNm codant pour le AR est surexprimée lorsque la voie Wnt est activée. En revanche, l'ARNm codant pour les protéines du AR est sous-exprimé. Ce résultat contradictoire s'explique par le fait que la voie Wnt active aussi la voie de dégradation du AR.

Ces différentes interactions, sont un moyen d'activer ou d'inhiber la voie de signalisation des androgènes ce qui permet de développer des moyens pour contrôler la croissance cellulaire et d'évoluer vers un cancer de la prostate hormono-indépendant.

a



b

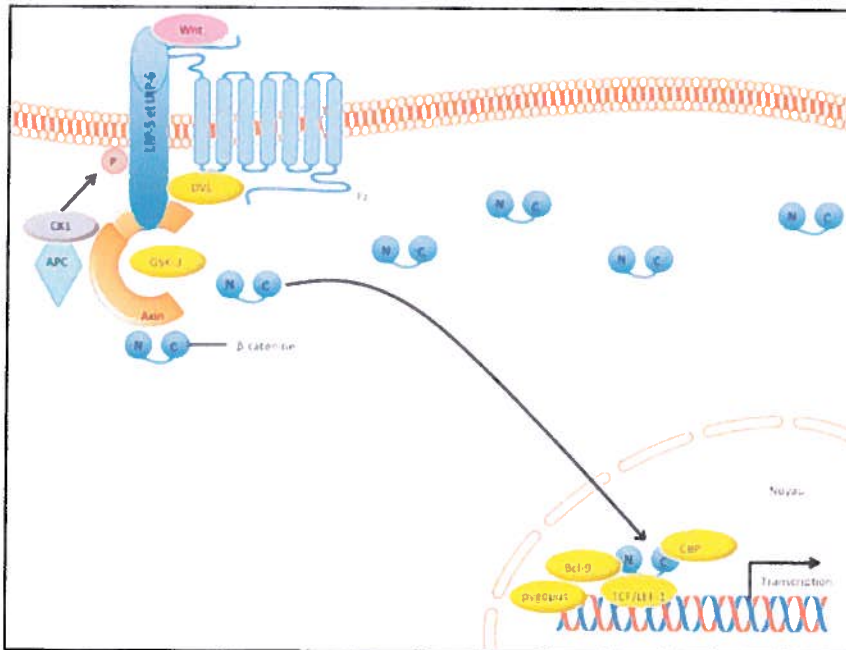


Figure 9 La voie de signalisation Wnt/b-caténine (Adaptée de Kypta R.M., Waxman J., Nature Reviews Urology, 2012).

a. La voie de signalisation Wnt/β-caténine est en mode « OFF ». b. La voie de signalisation Wnt/β-caténine est en mode « ON ».

1.1.3.4 Les voies AR indépendantes

Il existe d'autres voies capables de faire évoluer le cancer de la prostate vers un état androgène-indépendant et qui ne font pas intervenir le AR (Figure 10).

1.1.3.4.1 Les facteurs de croissances

Les facteurs de croissance comme IGF1 et ses récepteurs à tyrosine kinases qui induisent l'expression de différents gènes responsables de la croissance et de la survie cellulaire comme la voie MAPK/Ras/Raf/PKC [114].

1.1.3.4.2 La voie de signalisation Akt

La voie de signalisation Akt joue aussi un rôle important dans le développement du cancer androgène-indépendant sans faire intervenir le AR. En effet, PTEN est un gène suppresseur de tumeur souvent inactivé lorsque le cancer de la prostate est à un état métastatique avancé [115]. Il code pour une phosphatase à lipide qui déphosphoryle le phosphate 3 des lipides 3-phospho-inositol comme le phosphatidyl-inositol (3,4,5) triphosphates (PI(3,4,5)P3) [111]. Les lipides 3-phospho-inositol sont des messagers secondaires qui activent Akt [116-118]. La voie Akt intervient dans la tumorigenèse en raison de son activité anti-apoptotique. En effet, Akt phosphoryle et inactive plusieurs protéines pro-apoptotiques comme Bad et la procaspase-9 [105]. Dans les cellules normales, PTEN bloque la voie de signalisation de Akt pour permettre aux cellules d'aller en apoptose. En revanche, dans les cellules tumorales, la fonction PTEN est perdue, ce qui induit une augmentation de l'activité de Akt qui bloque le signal d'apoptose. De plus, Akt est capable de contrôler l'apoptose et la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate en induisant, entre autres, une diminution de l'expression de p27 [115], un inhibiteur important du cycle cellulaire [119].

1.1.3.4.3 Bcl-2

Un autre mécanisme d'évolution vers un état androgène-indépendant qui ne fait pas intervenir le AR est le facteur anti-apoptotique Bcl-2. En effet, lorsque les cellules sont privées d'androgènes, les voies apoptotiques sont activées. Bcl-2 permet de déjouer la mort cellulaire programmée causée par l'absence d'androgènes. C'est une protéine qui n'est pas exprimée dans les cellules normales et est surexprimée dans le cas d'un cancer. Elle joue un rôle important dans le mécanisme de survie des cellules cancéreuses de la prostate [120].

1.1.3.4.4 Les régulations épigénétiques

Les régulations épigénétiques sont importantes dans le développement cellulaire normal. Cependant, dans certains cas, elles interviennent dans l'apparition d'un cancer. En effet, elles altèrent l'expression des gènes suppresseurs de tumeur sans modifier la séquence d'ADN. Les altérations les plus communes retrouvées dans les cas d'un cancer de la prostate androgène-indépendant, sont la méthylation et les modifications des histones. La méthylation est la modification épigénétique la plus commune affectant la fonction cellulaire. Elle consiste à ajouter un groupement méthyle sur le carbone 5 d'une cytosine d'un dinucléotide CpG par une méthyl transférase. L'inhibition de l'expression du gène codant pour le AR par une méthylation de l'ADN est un mécanisme permettant aux cellules cancéreuses d'évoluer vers un état androgène-indépendant. En effet, certaines études ont montré qu'une surexpression du AR est un mécanisme mis en jeu par les cellules androgène-indépendantes pour compenser la diminution de la concentration d'androgènes. Cependant, 20 % à 30 % des cancers androgène-indépendants dont les deux lignées cellulaires les plus étudiées DU145 et PC-3 n'expriment pas le AR [121]. Cela s'explique par la perte du AR causée par une hyperméthylation du promoteur qui survient le plus souvent dans les tumeurs androgènes-indépendantes [122]. De plus, des études ont montré que plusieurs autres gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'invasion cellulaire, de l'architecture cellulaire, de la réparation de l'ADN endommagé ainsi que certains gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes ont été modifiés épigénétiquement dans plusieurs tissus et lignées cellulaires cancéreuses [123, 124].

1.1.3.4.5 Les microRNA

Le mécanisme de régulation des miRNA (microRNA) peut aussi avoir un impact sur la progression du cancer vers un état androgène-indépendant. En effet, les miRNAs sont des petits ARN non codants capables de réguler l'expression de certains gènes de façon post-transcriptionnelle. Les miRNAs appartiennent à deux catégories : les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs. Certains miRNAs sont surexprimés dans les cellules cancéreuses dans le but d'inhiber les gènes suppresseurs de tumeurs et sont appelés miRNAs oncogéniques ou oncomirs. En revanche, d'autres miRNAs sont inhibés pour bloquer la progression du cancer et sont appelés les miRNAs suppresseurs de tumeurs [125, 126].

1.1.3.5 *La voie des cellules cachées*

Il existe plusieurs mécanismes permettant à la cellule de devenir androgène-indépendante et d'induire un échec de l'hormonothérapie. Cependant, d'après une hypothèse proposée par John Isaacs (1999), cet échec est causé par une sous-population de cellules tumorales androgène-indépendantes présentes dans la prostate avant même le début de la thérapie [127]. Ces cellules souches épithéliales présumées sont androgène-indépendantes et leur ratio prolifération/mort cellulaire n'est pas affecté par la privation en androgènes (Figure 10).

1.1.3.6 *Les mécanismes de résistance du cancer androgène-indépendant*

La mortalité causée par le cancer de la prostate s'explique par son évolution d'un état androgène dépendant à un état androgène indépendant difficile à traiter. Cette évolution fait intervenir différents mécanismes (Tableau 1) (Figure 10).

Tableau 1 Mécanismes d'évolution vers un cancer de la prostate androgène-indépendant [80].

	Voie de signalisation	Dépendance au ligand	Dépendance au AR	Mécanisme d'action
A	Sensibilité accrue du AR	Androgène dépendante	AR dépendante	AR amplifié AR plus sensible DHT augmentée
B	Modifications génétiques du AR	Pseudo-androgènes Antagonistes des androgènes Corticostéroïdes Mutations des corégulateurs	Dépendante d'un AR muté dans les cellules LNCaP et dans les cellules AR ^{cr}	AR moins spécifique Stimulation par des molécules autres que les androgènes
C	Activation du AR par un mécanisme ligand indépendant	Androgène indépendante Ligand indépendante	AR dépendante	PTEN muté HER-2/neu amplifié PI3K activée MAPK activée Corégulateurs mutés
D	Voies de signalisation AR indépendantes	Androgène indépendante	AR indépendante	Voies de survie cellulaire: surexpression de Bcl2 Activation d'autres oncogènes Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs
E	La voie des cellules cachées	Androgène indépendante	AR indépendante	Cellules souches épithéliales malignes

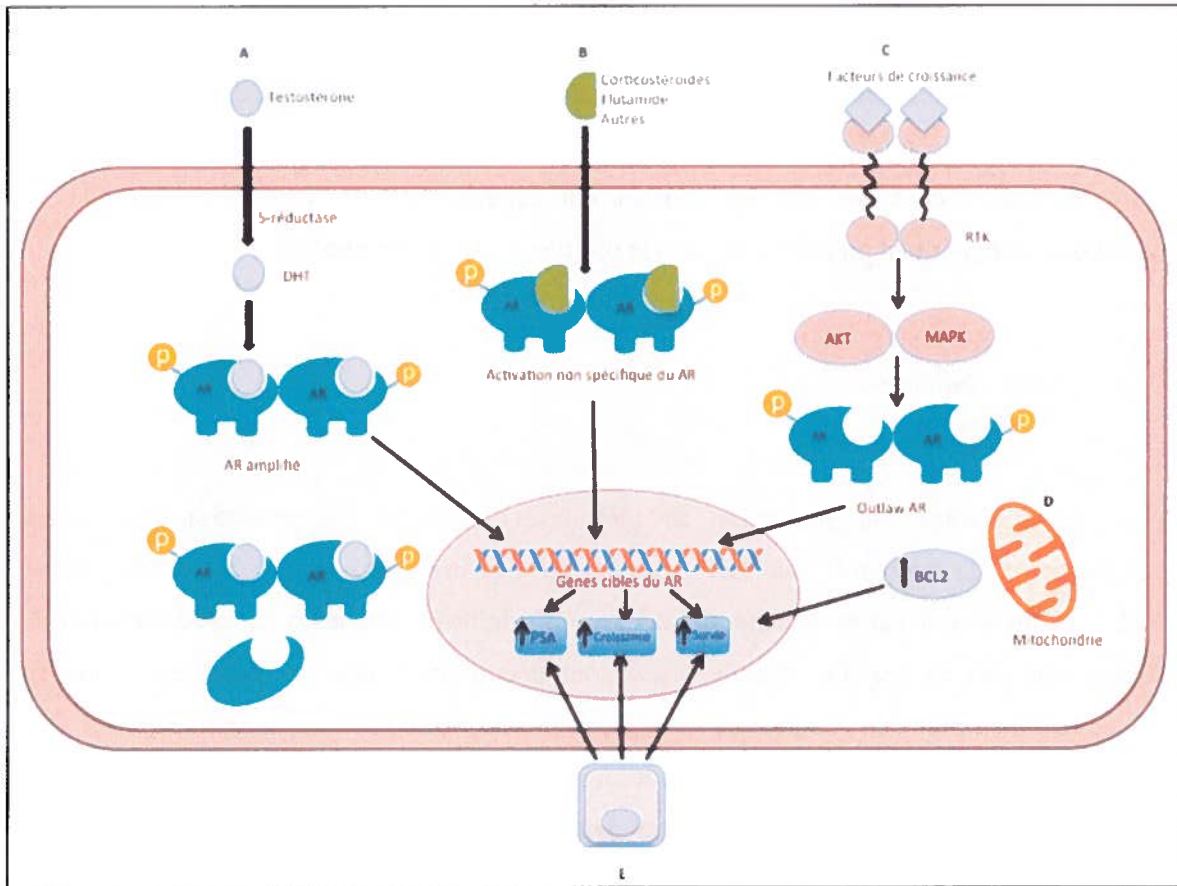


Figure 10 Cinq voies possibles expliquant l'évolution vers un état androgène-indépendant (Adaptée de Feldman B.J, Feldman D., Nature Reviews Cancer, 2001).

A. Cette voie fait intervenir : une augmentation de la quantité de AR par amplification du gène ou une sensibilité accrue du AR ou une augmentation de la quantité de DHT. **B.** Cette voie fait intervenir : une activation non spécifique du AR. **C.** Cette voie fait intervenir : une activation du AR par les RTKs, par Akt ou par les MAPK. **D.** Cette voie fait intervenir des voies de survies cellulaires comme Bcl-2. **E.** Cette voie fait intervenir des cellules souches épithéliales.

1.1.4 Généralités sur les métastases

La castration androgénique induit, la plupart du temps, la sélection d'une population de cellules capables de survivre en l'absence d'androgènes. Il en résulte la formation d'un cancer androgène-indépendant. Ces cellules induisent une augmentation de l'angiogenèse, forment des métastases et migrent en premier lieu vers les os et les nodules lymphoïdes.

1.1.4.1 La dissémination

Tout d'abord, la formation de métastases nécessite l'extravasation des cellules cancéreuses de la tumeur et leur survie pendant la migration dans la circulation sanguine. En effet, les cellules doivent se détacher de leur tissu d'origine et cela nécessite sa dégradation. Les mécanismes mis en jeu durant cette phase sont déterminants pour la suite des événements particulièrement pour les cellules qui vont former le noyau métastatique dans les os. Il existe deux facteurs qui contribuent à cette migration : les changements qui apparaissent dans le tissu stromal de la tumeur et ceux qui apparaissent dans la cellule elle-même.

Les fibroblastes associés aux tumeurs solides acquièrent un phénotype myofibroblastique suite à un contact physiologique avec les cellules tumorales, à une sécrétion élevée de facteurs de croissance (EGF, FGF et IGF) ou encore à une hypoxie provenant du métabolisme anormal des cellules tumorales. Les fibroblastes activés produisent un taux élevé de métalloprotéinases matricielles et restructurent ainsi la matrice extracellulaire tumorale. Les cellules cancéreuses ainsi que les fibroblastes, secrètent aussi beaucoup de chimiokines ce qui induit la création d'un gradient qui recrute des leucocytes et des cellules endothéliales dans le microenvironnement de la tumeur [128]. Ces leucocytes s'infiltrent et se différencient en macrophages associés aux tumeurs. Ils produisent des facteurs de croissance angiogéniques, des chimiokines de recrutement, des producteurs de vascularisation et des métalloprotéinases contribuant au remodelage de la matrice extracellulaire [129]. Ce remodelage favorise le développement de la vascularisation de la tumeur et la dissociation des cellules tumorales de leur tissu d'origine [128]. Pendant ce temps, des cellules vasculaires sont recrutées et créent des vaisseaux à haute

perméabilité qui expriment des molécules d'adhésion cellulaire permettant ainsi à la tumeur d'avoir sa propre vascularisation interne [130, 131].

D'autres changements apparaissent dans le microenvironnement de la tumeur comme les mutations génétiques [132] et épigénétiques [133]. Ces mutations vont permettre aux transcriptomes des cellules métastatiques de développer un phénotype favorisant le détachement tissulaire et la motilité du cytosquelette.

1.1.4.2 La survie pendant la migration

La survie pendant la migration est un facteur déterminant pour la formation des métastases. En effet, les cellules qui arrivent à se détacher de leur tissu d'origine, mais qui ne survivent pas pendant la migration, ne seront pas en mesure de créer un noyau métastatique. L'environnement biochimique et mécanique de la voie de migration des cellules métastatiques est très différent de celui du tissu épithélial d'origine. Cette migration représente donc un défi pour les cellules cancéreuses. De plus, le tissu épithélial d'origine a une propriété unique : la mort cellulaire programmée appelée anoïkose qui se déclenche lorsqu'une cellule se détache de son tissu natif. L'activation de mécanismes de survie est donc une étape nécessaire pour qu'il y ait formation de métastases osseuses.

D'après Igney et Krammer (2002), les cellules cancéreuses surexpriment les protéines mitochondriales antiapoptotiques (Bcl2, Bcl-XL et mcl1). En revanche, elles diminuent l'expression des protéines proapoptotiques (Bax, Apaf1 et les caspases) ou développent des mutations qui les inactivent [134]. Il en résulte un état moléculaire qui favorise la survie cellulaire au détriment de l'apoptose. De plus les cellules cancéreuses inhibent la dégradation de Mcl-1 ce qui induit son accumulation et par conséquent une inhibition de la mort cellulaire par anoïkose [135]. Les cellules malignes inactivent aussi la voie apoptotique induite par FADD et les récepteurs de mort cellulaire. En effet, elles surexpriment la protéine FLIP [136] qui séquestre FADD et bloque la voie des caspases.

En plus de la résistance à l'apoptose et à l'anoïkose, les cellules cancéreuses peuvent utiliser l'autophagie comme mécanisme de survie. En effet, l'autophagie est activée suite à une diminution de l'activité de mTOR ainsi que d'autres voies de signalisation.

1.1.4.3 L'installation dans la moelle osseuse

Les cellules qui se libèrent de leur tissu d'origine et qui survivent à la migration ne sont pas toutes capables de créer des métastases. En effet, le nombre de cellules tumorales circulantes par millilitre de sang dans le cas d'un cancer des ovaires est 10 fois supérieur à celui d'un cancer de la prostate [137]. Cependant, les métastases sont rares dans le cas d'un cancer des ovaires mais fréquentes dans le cas du cancer de la prostate. Cela suggère qu'il existe des cellules capables de se détacher de leur tissu d'origine et de survivre dans la circulation sanguine mais qui ne sont pas capable d'induire des métastases dans la moelle osseuse.

Au tournant du 20^{ème} siècle, Paget et Ewing ont émis des hypothèses contradictoires concernant le mécanisme de développement des métastases. En effet, Ewing considère que c'est un processus physique qui favorise le développement des métastases dans les tissus présentant une vascularisation dense [138]. En revanche, Paget considère que les cellules cancéreuses ainsi que le site secondaire dans lequel elles vont se loger contribuent tous les deux au développement des métastases [139]. L'hypothèse de Paget correspond d'avantage à la réalité. En effet, la moelle osseuse est le site de production des cellules sanguines, elle possède une vascularisation particulièrement dense et représente de ce fait un endroit favorable au développement des métastases. Les cellules cancéreuses induisent la formation de métastases dans la moelle osseuse en raison d'une affinité biologique unique contrôlée par une variété de facteurs régulant la communication entre ces cellules et la moelle osseuse.

L'extraction des cellules cancéreuses des vaisseaux sanguins, une fois arrivées dans la cavité de la moelle osseuse, représente une des étapes les plus importantes dans l'établissement d'une communication entre les cellules métastatiques et la moelle osseuse. Ce processus fait intervenir des chimiokines et leurs récepteurs en imitant le mode d'action des progéniteurs hématopoïétiques [140].

1.1.4.4 Formation de métastases par les cellules tumorales disséminées

Les cellules tumorales qui se retrouvent dans la moelle osseuse sont celles qui ont réussi à migrer, à survivre dans la circulation sanguine, à s'installer, à envahir la moelle osseuse et à survivre dans leur nouveau site de croissance. Malgré leur apparente agressivité, les métastases mettent plusieurs années pour se développer [141, 142]. Ce phénomène s'explique par un processus biphasique dans la formation tumorale. En effet, les cellules tumorales disséminées présentent un état initialement latent suivi d'une phase agressive active. Cette cinétique s'explique par deux états: la dormance cellulaire et la dormance de la masse [143].

La dormance cellulaire décrit le fait que les cellules tumorales disséminées sont métaboliquement actives mais que leur cycle cellulaire est en arrêt [143]. Dans ce cas, les cellules survivent mais ne prolifèrent pas parce qu'elles n'ont pas les conditions nécessaires, dans l'immédiat, pour se multiplier. En revanche, la dormance de la masse est une phase latente durant laquelle les micro-métastases multicellulaires persistent mais ne prolifèrent pas [144]. Elle apparaît lorsque la tumeur n'a plus d'espace pour prendre du volume ou lorsqu'elle n'a pas accès aux vaisseaux sanguins ou encore lorsqu'elle est attaquée par le système immunitaire.

1.1.4.5 Clones et cellules souches dans la formation des métastases

En plus de la capacité d'entrer dans une phase de dormance, les cellules tumorales sont capables d'accumuler des lésions génétiques pour pouvoir croître dans un site secondaire [145]. De plus, les travaux de Visvader et al. (2008) ont mis en évidence l'existence d'une catégorie de cellules monoclonales à l'origine de toutes les tumeurs. Il existe donc un sous-ensemble clonal unique de cellules primaires cancéreuses capables de former des lésions métastatiques suite à leur dissémination. Cette théorie ne peut s'expliquer que par la présence de cellules souches cancéreuses. En effet, les cellules souches présentent 3 caractéristiques: la capacité de se renouveler, de se différencier et d'induire la croissance des organes. Il semblerait en effet qu'une sous-population de cellules présentant ces caractéristiques soient présentes dans les cancers somatiques [146]. Cependant, d'autres travaux sont nécessaires pour confirmer cette théorie.

1.1.4.6 Les différents types de tumeurs métastatiques osseuses

La moelle osseuse normale a une architecture définie avec un compartiment produisant le sang et un autre produisant les os. En revanche les tumeurs qui se développent par dissémination de métastases vers la moelle osseuse présentent différents phénotypes générés par un ensemble de facteurs uniques. En effet, ces différents phénotypes ont été classés en deux grandes catégories : les tumeurs ostéolytiques (résorbent les os) et les tumeurs ostéoblastiques (synthétisent les os) [147].

1.2 APOPTOSE ET CANCER DE LA PROSTATE

1.2.1 Généralités sur les voies apoptotiques

Plusieurs études montrent l'importance de l'induction de l'apoptose dans la prévention du cancer par les composés naturels consommables. L'apoptose comprend deux voies majeures : la voie extrinsèque activée par des signaux proapoptotiques provenant de la surface de la membrane cellulaire et la voie intrinsèque qui met en jeu une perturbation de l'intégrité membranaire mitochondriale.

1.2.1.1 La voie intrinsèque

Elle est activée par la perte de signal des facteurs de croissance, en réponse à une dégradation de l'ADN, à un stress oxydant, à une hypoxie, ou à une exposition à certains composés chimiques. Elle est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 qui contrôlent la libération des facteurs pro-apoptotique dans l'espace inter-membranaire mitochondrial.

Lorsque le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme, il se lie à la région C- terminale d'Apaf-1, une protéine cytosolique capable de recruter les caspases. L'association du cytochrome c et d'Apaf-1 permet de recruter la caspase-9. Le complexe apoptosome formé par le cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 permet l'activation des caspases exécutrices comme la caspase-3. Cette dernière scinde à son tour des protéines cellulaires comme les protéines de structure, nucléaires et du cytosquelette.

D'autres protéines libérées par la mitochondrie comme Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 facilitent l'activation des caspases en bloquant ses inhibiteurs endogènes (IAPs) [148]. Un équilibre dynamique entre les effecteurs pro- et antiapoptotique permet à la cellule de survivre aux dommages causés à la mitochondrie. Cependant, lorsque ces dommages affectent plusieurs mitochondries, l'action antiapoptotique des IAPs est annulée par une concentration cytosolique importante de ses antagonistes Smac/DIABLO et Omi/HtrA2.

Il existe une voie d'activation de l'apoptose mitochondriale indépendante des caspases qui fait intervenir l'activité protéase de Omi/HtrA2 [149-151]. En effet, des études *in vitro* ont montré une dégradation de XIAP, cIAP1, cIAP2 et Apollon, des protéines anti-apoptotique, par l'activité protéase de Omi/HtrA2 [152]. Une autre voie indépendante des caspases fait intervenir l'AIF et l'endonucléase G. En effet, elles sont libérées de la mitochondrie et transloquent dans le noyau pour induire la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN [148, 153]. Le moment précis de la libération de ces deux protéines par rapport au cytochrome c n'est pas encore connu de même que le moyen de dégrader l'ADN [154]. Cependant, des études réalisées sur des cellules de mammifères montrent une coopération entre l'AIF et la cyclophiline A pour dégrader l'ADN [153].

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle central dans le contrôle de la voie mitochondriale. En effet, plus de 20 membres de cette famille ont été identifiés chez l'homme comprenant les suppresseurs (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-W et Bcl-G) et les promoteurs (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-Xs, Krk, Mtd, Nip3, Nix, Nora et Bcl-B) de l'apoptose [155].

En plus du cytochrome c, la mitochondrie libère un grand nombre de polypeptides comme AIF, EndoG, Smac/Diablo (activateur secondaire des caspases) et Omi/HtrA2 dans l'espace inter-membranaire. Smac/Diablo et Omi/HtrA2 induisent l'activation des caspases en neutralisant l'effet inhibiteur des IAPs.

1.2.1.2 La voie extrinsèque

Elle est initiée par la liaison d'un ligand spécifique aux récepteurs transmembranaires de mort cellulaire comme le récepteur CD95 (APO-1/Fas), le récepteur TNF1 (TNFR1), les récepteurs TRAIL-R1 (DR4) ou encore TRAIL-R2 (DR5). Ces récepteurs sont activés par liaison avec leurs ligands respectifs (CD95L, TNF α ou lymphotoxine- α et TRAIL) ce qui induit leur trimérisation. Une protéine adaptatrice FADD est alors recrutée et se lie à la procaspase-8 et/ou caspase-10 pour former un complexe de mort cellulaire appelé DISC [156]. La procaspase-

8 est activée et joue le rôle d'initiateur de caspase. Elle active les caspases effectrices caspase-3 et -7 pour initier la dégradation cellulaire causant une apoptose inévitable [157].

1.2.2 Mécanismes de résistance à l'apoptose dans le cancer de la prostate

L'apoptose ou la mort programmée des cellules est un mécanisme important pour le développement cellulaire normal, pour le système de défense cellulaire et pour la suppression de l'oncogenèse [158, 159]. En effet, une mauvaise régulation de l'apoptose provoque le développement des cancers et des maladies dégénératives et vasculaires [160, 161].

Le phénotype cancéreux agressif est le résultat d'altérations génétiques et épigénétiques induisant une dérégulation de la voie de signalisation intracellulaire comme l'apoptose [162]. Cette dérégulation joue un rôle important dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements médicamenteux [159, 163]. En effet, la résistance des cellules hormono-indépendantes du cancer de la prostate, a été associée à une résistance à l'apoptose qui fait intervenir différents facteurs [161, 164, 165].

Bcl-2 est la première protéine identifiée, produite par un oncogène [166, 167]. Les protéines appartenant à la famille Bcl-2 possèdent quatre régions de séquences homologues doublées appelées les domaines homologues Bcl-2 (BH1-4). Des études structurales des protéines de survie (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl-1) ont mis en évidence la formation d'une poche hydrophobe de liaison, par trois de ces domaines (BH1-3). Seules les protéines ayant un domaine BH3 (Bim, Bad, Puma, Noxa, etc) et les protéines pro-apoptotique Bax/Bak peuvent se lier à cette poche. De ce fait, plusieurs études ont développé des analogues possédant le domaine BH3 afin d'inhiber les protéines de survie cellulaire. Comprendre le déséquilibre qui survient dans les membres de la famille des protéines Bcl-2 est devenu essentiel dans le développement de traitements efficaces contre le cancer.

Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL sont très liées et surexprimées dans plusieurs types de cancers [97, 168]. En effet, Bcl-2 est surexprimée dans 30-60 % des cancers de la prostate, au diagnostic et dans 100 % des cancers hormono-indépendant [169, 170]. Sa surexpression est à l'origine d'une diminution de la réponse pro-apoptotique qui devrait survenir à la suite d'irradiations, d'une chimiothérapie ou encore d'une castration androgénique. De ce fait, elle induit une résistance aux traitements [171-175].

Bcl-xL est surexprimée dans 100 % des cancers de la prostate hormono-résistants. Elle est aussi associée à un stade avancé de la maladie, à un faible pronostic de survie, à un risque de récurrence et à l'apparition de métastases [176-178].

Il est certain que la transition du cancer de la prostate vers un état androgène-indépendant est accompagnée de plusieurs changements génétiques. Par conséquent, la surexpression des protéines clés de survie cellulaire comme Bcl-2 et Bcl-xL représente un obstacle important à l'induction de l'apoptose par chimiothérapie [97, 179-181].

Mcl-1 (myeloid cell leukemia) est aussi une protéine anti-apoptotique appartenant à la famille des Bcl-2. C'est une molécule hautement régulée qui favorise la viabilité cellulaire et qui contribue à la malignité lorsqu'elle est dérégulée [182, 183]. L'expression de Bcl-2, Bcl-xL et de Mcl-1 augmente pendant la progression du cancer de la prostate [179].

Puisque Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose lorsqu'elle est induite par différents stimulus, leur surexpression est associée à une progression du cancer vers un état androgène-indépendant [168, 184-186].

Le NF- κ B contrôle l'apoptose en régulant la transcription des gènes antiapoptotiques qui agissent à différents niveaux. Ces gènes comprennent Bcl-2, Bcl-xL et Bfl-1/A1 qui agissent au niveau mitochondrial [164, 165], la survivine et le XIAP qui agissent au niveau cytoplasmique, le c-IAP1 et le c-IAP2 qui inhibent l'activité de différentes caspases [166, 187] et enfin TRAF1 et TRAF2 qui agissent en amont de la voie apoptotique et qui sont à l'origine de la résistance à l'apoptose induite par le TNF- α [187, 188]. Le NF- κ B contrôle aussi le ratio récepteurs leurre TRAIL et récepteurs de mort cellulaire TRAIL et régule ainsi la sensibilité des cellules au TRAIL. En effet, une surexpression des protéines antiapoptotiques contrôlée par la famille des NF- κ B explique la résistance aux traitements, des cellules cancéreuses de la prostate [189-191]. De plus l'activation continue de NF- κ B dans les cellules cancéreuses de la prostate, androgène-indépendantes, explique leur résistance aux agents thérapeutiques proapoptotiques [192].

TRAIL est un ligand cytotoxique qui induit l'apoptose dans différentes cellules cancéreuses par liaison avec son récepteur exprimé à la surface des cellules tumorales. DR5 est un récepteur TRAIL localisé dans une région souvent perdue dans les cellules cancéreuses de la prostate ce qui leur procure une résistance à ce ligand [179]. De plus, l'expression des récepteurs de leurre TRAIL comme le DcR2 est plus importante dans les cellules tumorales que dans les

cellules normales ce qui pourrait représenter un mécanisme supplémentaire de résistance face au système immunitaire [172].

L'expression des caspase-1 et 3 est plus faible dans les cellules cancéreuses de la prostate que dans les cellules normales. En revanche, les protéines Bcl-2 sont surexprimées dans les cellules cancéreuses de la prostate [173].

Un déséquilibre entre les facteurs de croissance et les facteurs d'apoptose induisent la tumorigenèse. Il est donc intéressant de développer des traitements permettant de favoriser l'apoptose des cellules cancéreuses. Depuis quelques années, plusieurs études ont montré les bienfaits de certains aliments dans la prévention du cancer via l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. De plus, le cancer de la prostate présente toutes les caractéristiques favorisant une approche chimiopréventive par des interventions nutritionnelles qui ont pour but de retarder ou d'inhiber la progression du cancer. En effet, plusieurs composés naturels testés sur des cellules cancéreuses de la prostate ainsi que sur des modèles animaux présentent un effet préventif. Certains des composés les plus reconnus sont présents dans la grenade, les tomates, les légumes verts, les fruits rouges, les crucifères, le thé et le soja.

1.3 LA PRÉVENTION PAR L'ALIMENTATION

La chimioprévention est une alternative intéressante dans le traitement du cancer de la prostate en raison de sa latence, de son incidence, de la présence de biomarqueurs quantifiables, de l'identification des lésions préneoplastiques et enfin de son hétérogénéité [193].

Les études épidémiologiques confirment de plus en plus le rôle évident de l'alimentation et du mode de vie dans la prévalence de risque dans le développement du cancer de la prostate et de sa progression. La plupart du temps, les facteurs alimentaires initiateurs du cancer ne sont pas identifiés. En revanche, plusieurs nutriments ainsi que des extraits naturels de plantes sont reconnus pour leurs effets thérapeutiques.

D'après certaines études épidémiologiques, les Afro-américains présentent le risque le plus élevé au monde de développer un cancer de la prostate. Les caucasiens et les Afro-américains ont 5 à 50 fois plus de risques de développer un cancer de la prostate que les japonais résidants au Japon [194, 195]. Le régime alimentaire joue donc un rôle important dans le développement du cancer de la prostate.

Certains facteurs comme le taux calorique, le ratio omega-6/omega-3, les produits laitiers et la consommation de viande, présentent une forte corrélation avec le risque de développer un cancer de la prostate. Ces facteurs peuvent agir comme des promoteurs ou des initiateurs transformant une néoplasie bénigne en une forme agressive.

La consommation de **graisses** d'origine animale a été associée à un risque élevé de développer un cancer de la prostate [196-198]. Le mécanisme par lequel ses graisses induisent une carcinogenèse prostatique n'a pas encore été identifié. Cependant, elles ont un effet sur le taux de testostérone dans le sérum, sur le stress oxydant ou encore sur l'augmentation du taux d'hormones IGF-1. De plus, l'obésité augmente les risques de développer un cancer de la prostate et les risques de récurrence, en raison des changements survenant dans l'équilibre hormonal. En effet, l'excès de poids dégrade l'activité des œstrogènes et de la testostérone.

Avant l'avènement des aliments traités, le **ratio omega-6/omega-3** dans l'alimentation de base était de 2:1. Aujourd'hui, les standards alimentaires ont changé et ce ratio atteint 40:1. En effet, l'alimentation américaine est riche en omega-6 polyinsaturé (PUFAs) et en gras *trans*. Une

consommation élevée en acides gras saturés provenant de la viande rouge, des jaunes d'œufs, des produits laitiers et des acides gras *trans* contenus dans les huiles végétales hydrogénées, a été associée à une augmentation de l'incidence du cancer de la prostate et du taux de mortalité. En revanche une consommation élevée d'acides gras omega-3 (comme l'acide docosahexanoïque, eicosapentanoïque et *alpha*-linoléinique) a été associée à une réduction du risque de développer un cancer de la prostate. En effet, une consommation journalière de 0,5 g d'acide gras provenant de la consommation de poissons, réduit de 24 % les risques de cancers métastatiques [199]. De plus, les huiles végétales non raffinées, riches en phytostérols (comme le *beta*-sitostérol et le campestérol), présentent dans le régime alimentaire méditerranéen et asiatique, réduisent le risque de développer un cancer de la prostate, contrairement aux cholestérols, aux gras saturés et aux huiles raffinées présentes dans l'alimentation américaine.

Certaines études cliniques réalisées pour déterminer l'effet des **produits laitiers** sur le cancer de la prostate présentent certaines contradictions. En effet, une large analyse de 45 études d'observations montre que les produits laitiers n'ont pas d'effets significatifs sur le risque de développer un cancer de la prostate [200]. En revanche, d'autres études montrent une augmentation du risque de 11 à 39 % [201, 202]. L'augmentation du taux de calcium dans le plasma a pour conséquence la suppression de la 1,25 dihydroxyvitamine D3, ce qui expliquerait cette augmentation de risque [203]. D'autres chercheurs expliquent cela par la présence de gras saturés dans les produits laitiers et par l'augmentation du taux d'IGF-1 circulante (associée à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate) [204-206]. De plus certains travaux ont montré qu'une faible consommation de produits laitiers diminuait le taux de PSA [207].

La **viande rouge** est riche en acide arachidonique [208], en amine hétérocycliques (HCAs) (provenant d'une cuisson prolongée) et en nitrosamines (agents de conservation). Colli et Colli (2005) ont montré une forte corrélation entre la consommation de viande rouge et la mortalité associée à un cancer de la prostate dans deux études rétrospectives sur des populations provenant de 71 pays [209, 210].

L'alimentation méditerranéenne et asiatique sont les plus recommandées pour prévenir l'apparition d'un cancer de la prostate. En effet, le poisson et le soja remplacent la viande rouge. De plus, les produits laitiers sont consommés avec modération.

Le régime alimentaire « idéal » pour prévenir le cancer de la prostate est une alimentation faible en gras, en viande rouge et en produits laitiers et riche en fruits, en légumes, en grains entiers, en extraits naturels de plantes (curcumin, gingembre) et en thé vert. Les composés présentant un effet préventif reconnu, sur le cancer de la prostate, ont été développés ci-dessous.

1.3.1 La genistéine

Les phytoestrogènes sont des composés provenant de plantes biologiquement actives et qui ont une structure chimique semblable aux œstradiols. Les phytoestrogènes les plus importants sont les isoflavones. La génistéine (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) est une isoflavone présente dans le soja, les lentilles, les pois et les haricots [211]. Elle est capable d'inhiber, *in vitro*, la progression des cellules cancéreuses de la prostate androgène-dépendantes et – indépendantes [212-214]. La génistéine a plusieurs modes d'actions anti cancérogènes. En effet, elle est capable d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses (en inhibant la tyrosine kinase, la voie de signalisation du PTK, la topoisomérase I et II et l'histidine kinase), d'induire leur apoptose, d'avoir des effets antioxydants (en inhibant les voies de signalisation du NF-kB et de Akt) et enfin d'inhiber l'angiogenèse (en inhibant TGF- β et EGF) [215, 216].

Des études *in vitro* ont montré que la génistéine induisait une diminution de l'expression du AR dans les cellules cancéreuses de la prostate via le récepteur à œstrogènes β , ce qui induit une modification de la réponse cellulaire suite à une stimulation hormonale. Elle induit aussi une inhibition de la synthèse des enzymes stéroïdiennes comme la SRD5A et la CYP19 ce qui diminue la production hormonale. Enfin, elle bloque le cycle cellulaire en phase G1 et inhibe l'expression du PSA [211].

1.3.2 Le lycopène

Le lycopène est un caroténoïde présent dans la tomate, la pastèque, les raisins rouges et la papaye. Une consommation régulière de tomates crues ou cuites aide à prévenir le cancer de la prostate [217] et réduit sa progression [218]. La cuisson des tomates favorise la libération du lycopène qui a la capacité d'arrêter le cycle cellulaire et d'induire l'apoptose dans plusieurs types de cellules cancéreuses [219]. Il réduit aussi le taux d'IGF-1 dans le sérum qui est associé à un risque élevé de cancer de la prostate [220]. Cependant, une étude menée sur le cancer de la prostate, des poumons, du colon et des ovaires n'a pas réussi à identifier l'effet protecteur global du lycopène sur l'incidence du cancer [221].

1.3.3 Le delphinidine

Le delphinidine est un polyphénol provenant des baies, il est également présent dans la grenade, les raisins, les betteraves ainsi que les aubergines [222]. Il possède des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, et anti-angiogéniques [222]. Il induit également l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate et inhibe la croissance tumorale *in vivo* [223]. En effet, les travaux de Yun et al. (2008) montrent que le delphinidine inhibe la croissance des cellules hautement agressives PC-3 et induit leur apoptose [224, 225]. De plus, il inhibe la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Cette voie est dérégulée dans le cas d'un cancer de la prostate et contribue à sa progression. En effet, le delphinidine induit, dans les cellules PC-3, la phosphorylation de GSK3 β , l'expression des protéines APC et Axine et la phosphorylation de la β -caténine sur les résidus sérine et thréonine. Il en résulte la dégradation de la β -caténine, l'inhibition de sa translocation dans le noyau et par conséquent l'inhibition de l'expression des gènes intervenant dans la croissance cellulaire [224].

1.3.4 La quercétine

La quercétine est un antioxydant polyphénolique, présent dans plusieurs fruits et légumes et particulièrement dans les oignons, les brocolis, les pommes, le vin rouge et le soja. Ce flavonoïde, en plus de ces propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, a des effets antiprolifératifs contre les cellules cancéreuses de la prostate. Cependant, son mécanisme chimiopréventif n'est pas encore bien défini [226]. La quercétine est associée à des propriétés pro-apoptotiques. En effet, elle induit l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 et module certaines protéines de régulation du cycle cellulaire comme la cycline D1 et la CDK4. Elle induit la libération du cytochrome c et active la caspase-9 et -3. Dans les cellules LNCaP, elle inhibe la voie PI3K/Akt, supprime la phosphorylation de Bad (une protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2), ce qui bloque l'interaction entre Bcl-xL et Bax provoquant la libération du cytochrome c et l'activation des caspases [227]. Elle inhibe aussi la prolifération des cellules PC-3 [228] et réduit le risque de métastases. En effet, elle inhibe l'expression de MMP2 et 9 dans les cellules PC-3 via l'inhibition des protéines kinases [229]. Elle empêche ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire, étape nécessaire à l'initiation de l'invasion tumorale.

1.3.5 Les crucifères

La consommation de crucifères comme le brocoli, le chou-fleur et le chou, réduit le risque de développer un cancer de la prostate. En effet l'indole-3-carbinol (I3C) présent dans les crucifères réduit la prolifération et induit l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate hormono-résistante [230]. L'I3C produit, durant la digestion, plusieurs métabolites dont le diindolylméthane (DIM). Des travaux réalisés, *in vivo* et *in vitro*, ont montré que l'I3C et le DIM inhibaient la croissance des cellules cancéreuses androgène-dépendantes et -indépendantes. En effet, DIM et I3C agissent comme des antagonistes du AR dans les cellules LNCaP. De plus, DIM induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate androgène-indépendantes (DU145 et PC-3).

1.3.6 Le thé

Le thé vert, l'Oolong et le thé noir proviennent des feuilles de la même plante : *Camellia Sinensis*. Cependant, leurs contenus chimiques ainsi que leurs goûts sont très différents en raison de la méthode de fermentation. Les feuilles de thé sont très riches en polyphénols appelés catéchines. Des études épidémiologiques récentes ont montré que l'epigallocatechine-3-gallate, l'epigallocatechine et l'epicatechine-3-gallate diminuaient le risque de développer un cancer de la prostate [231-235]. En effet, l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) représente 10 à 50 % des catéchines totales. Il inhibe la croissance des cellules tumorales en agissant comme un antioxydant. Elle induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses via l'altération de la voie PI3K/Akt, la protéine kinase C, l'inhibition de la voie inflammatoire (NF- κ B et COX-2), la modulation du facteur IGF et de l'axe du récepteur à androgènes [236, 237].

1.3.7 La grenade

La grenade est un fruit provenant de l'arbre *Punica granatum*. Cet arbre est cultivé dans le bassin méditerranéen, l'Afghanistan, l'Inde, la Chine, le Japon, la Russie et dans certaines régions des États-Unis [238]. Le fruit est constitué de trois parties : les graines, le jus et la peau incluant les cloisons internes. D'autres parties de la plante tels que les racines, l'écorce, les feuilles et les fleurs peuvent être utilisées [7].

Les graines représentent 3 % du poids total du fruit et contiennent 20 % d'huile. L'huile est composée de 80 % d'acide gras conjugués octadécatriénoïques, avec un taux élevé d'acide gras 9 *cis*, 11 *trans* et 13 *cis* et de 7 % d'acide linoléique [239, 240]. La majorité de l'huile (95 %) est composée d'acide gras, les 5 % restant sont des stérols, des stéroïdes, des composés de la gaine de myéline et des cérébrosides [241]. La matrice des graines contient de la lignine [242], de l'acide hydroxycinnamique et des dérivés antioxydants de la lignine [243]. Le jus représente 30 % du poids total du fruit. Il contient six anthocyanines (la pelargonidine 3-glucoside, la cyanidine 3-glucoside, la delphinidine 3-glucoside, la pelargonidine 3,5-diglucoside, la cyanidine

3,5-diglucoïde et la delphinidine 3,5-diglucoïde) des ellagitannins et des tannins hydrolysables. Au total, 124 composés naturels ont été identifiés dans la grenade [244]. Le jus contient également des minéraux dont le fer est le plus important [245]. Le péricarpe contient des flavonoïdes, des tannins, des polysaccharides complexes et probablement des alcaloïdes [7, 246]. Les feuilles contiennent des tannins, de l'apigénine, des flavones et des minéraux. Les fleurs contiennent des composés présents aussi dans les feuilles (acide gallique) et les grains (acide ursolique) [7]. L'écorce et les racines contiennent des alcaloïdes (Tableau 2).

La grenade est riche en composés polyphénoliques comme les anthocyanines et les tannins. Elle a un effet antioxydant plus important que le thé vert et le vin, ainsi qu'un effet anti-inflammatoire [247, 248].

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence les propriétés anticancéreuses de la grenade [249-254]. De plus, des études récentes ont montré que la consommation de jus de grenade par des patients souffrant du cancer de la prostate avec un taux de PSA élevé, à la suite d'un traitement primaire, diminue significativement le taux de PSA en doublant le temps de survie de 15 à 54 mois ($p < 0.001$) [255].

Le traitement des cellules cancéreuses DU-145, PC-3 et LNCaP avec des extraits de la grenade induit une activation de l'apoptose et une inhibition de la viabilité cellulaire [256]. De plus, les travaux de Seeram et al. (2005) sur des souris nues athymiques, transplantées avec des cellules cancéreuses CWR22Rv1, androgène-dépendantes, et nourries avec des extraits de grenade, ont mis en évidence une diminution de la taille des tumeurs ainsi que du taux de PSA sérique [257].

Les ellagitannins sont les polyphénols les plus abondants du jus de grenade [255]. Ces composés, ainsi que leurs produits d'hydrolyse comme l'acide ellagique, inhibent la progression du cancer de la prostate en bloquant la division cellulaire et en stimulant l'apoptose [258]. De plus, les ellagitannins sont métabolisés par la flore intestinale et produisent l'urolithine A et B conjuguées dans le foie pour être excrétés dans les urines, 12 à 56 heures après l'administration de 8 oz (250 mL) de jus de grenade à des patients. Ces urolithines circulent dans le sang et peuvent atteindre plusieurs organes cibles où les effets des ellagitannins ont été observés [259].

L'acide punique, un acide gras conjugué présent dans l'huile des graines de grenade [260], inhibe la formation des prostaglandines [251]. Des études *in vitro* ont également montré

une inhibition de l'invasion des cellules cancéreuses PC-3 suite à leur exposition à un mélange d'extraits d'huiles de grenade [257, 261, 262]. L'acide punique induit également un effet cytotoxique sur les cellules leucémiques via une peroxydation lipidique [263].

L'acide gallique, un acide hydroxybenzoïque contenu dans le jus, les fleurs et la peau [264, 265] induit l'expression de p53/p21, l'arrêt de la phase G1 et l'apoptose des cellules cancéreuses de la vessie [266]. Il inhibe également la croissance des cellules cancéreuses de la prostate DU-145 et induit leur apoptose [267].

Les anthocyanidines contenues dans la peau comme le delphinidine, le cyanidine et le pelargonidine [268] ont des activités antiangiogéniques, antioxydantes et anticarcinogènes [269]. Ils inhibent également l'activité de la cyclooxygénase, la production de l'oxyde nitrique et le récepteur du facteur de croissance épidermal [270]. Ils possèdent également une activité antimutagénique [271].

Le kaempferol est un flavonol contenu dans la peau [272]. Il agit en synergie avec la quercétine pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein [273]. Il inhibe également l'activité de l'acide gras synthase, dans les cellules tumorales humaines [274].

Les flavan-3-ols comme les catéchines et l'épicatéchine, présents dans le jus et la peau, inhibent la métalloprotéinase-9 et l'invasion des cellules tumorales. [275].

Tableau 2 Sélection de quelques composés de la grenade et leurs actions connues contre le cancer [276]– J : jus, L : feuille, F : fleurs, S : graines, B : écorce de l'arbre, R : écorce des racines de l'arbre

Classe chimique	Nom du composé	Partie de la plante	Prévention du cancer et traitements
Acide hydroxybenzoïque	Acide gallique	J, L, F	Induit l'expression de p53/p21, stoppe la phase G1 et l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la vessie Inhibe la croissance et entraîne la mort des cellules DU-145
	Acide ellagique	J, L, S	
Anthocyanidines	Delphinidine	L	Activités antiangiogéniques, antioxydantes et anticancérogènes
	Cyanidine	L	
	Pelargonidine	L	
Acides gras conjugués	Acide punique	S	Améliore la fonction des cellules B <i>in vivo</i> Cause un effet cytotoxique sur les cellules leucémiques par peroxydation lipidique
Acides gras non conjugués	Acide linoléique	S	Inhibent la CYP19 dans des expériences non cellulaires
	Acide oléique		
	Acide palmitique		
	Acide stéarique		
	Acide cis-vaccénique		
	Acide trans-vaccénique		
Flavan-3-ols	Epigallocatechine 3-gallate (ECGC)	J, L	Inhibiteur puissant de la métalloprotéinase-9 et de l'invasion des cellules cancéreuses Antagoniste des facteurs de croissance responsables des maladies prolifératives
	Epicatéchine		
	Epicatéchine gallate		
Flavonols	Quercétine	J, L	Le kaempférol agit en synergie avec la quercétine pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein
Flavones	Lutéoline	L	
Flavonol glycoside	Kaempferol	L	Diminue la synthèse des acides gras dans les cellules cancéreuses Induit l'apoptose des cellules en activant les récepteurs de mort cellulaire et les caspases

1.3.8 Les eicosanoïdes

L'inflammation fait intervenir des molécules présentant une structure similaire à celle des hormones, appelées eicosanoïdes. Certains eicosanoïdes favorisent l'inflammation chronique d'autres l'empêchent. De plus, ils jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Ils sont synthétisés à partir d'acides gras polyinsaturés provenant de l'alimentation. Certaines enzymes synthétisent de «bons» eicosanoïdes anti-inflammatoires d'autres synthétisent de «mauvais» eicosanoïdes pro-inflammatoires. Les «bons» eicosanoïdes sont synthétisés à partir des acides gras oméga-3 présents dans le poisson, les graines de lin, les noix et les légumes verts. Les «mauvais» eicosanoïdes sont synthétisés à partir d'acides gras omega-6 présents dans les huiles végétales, utilisées pour la fabrication des aliments industriels, comme l'huile de soja, de tournesol, de maïs, de carthame et de coton. La production d'eicosanoïdes dans le corps dépend essentiellement de la composition en acides gras du régime alimentaire.

Les enzymes COX-2, 5-LOX et 12-LOX synthétisent des eicosanoïdes qui jouent un rôle important dans la progression du cancer de la prostate. Ces enzymes produisent des eicosanoïdes pro-inflammatoires comme la prostaglandine E2 et le leucotriène B4. De plus, la surexpression de COX-2 est un prédicteur de mauvais pronostic du cancer de la prostate [277]. Il est donc important de limiter la production d'eicosanoïdes pro-inflammatoire en favorisant la consommation d'omega-3. Il est aussi possible de limiter l'action des enzymes COX et LO qui favorisent la carcinogenèse en consommant des acides gras qui limitent leur activation.

1.3.9 Les extraits naturels de plantes

Les extraits naturels de plantes contiennent des agents anti-inflammatoires qui agissent de façon moins spécifique et leur valeur thérapeutique est de plus en plus reconnue. Plusieurs chercheurs ont étudié une variété d'extraits naturels de plantes pour identifier leurs effets spécifiques et non spécifiques sur les COX et les LO. Le curcumin, le gingembre, le basilic, le resveratrol et la berbérine sont les agents anti-inflammatoires les plus prometteurs. Le **curcumin**

est un diféruoylméthane. Il est capable de prévenir le cancer de la prostate en modulant les suppresseurs de l'apoptose et les facteurs de croissance qui favorisent sa progression [278, 279]. Le **gingembre** comporte plus de 20 composés chimiques capables d'inhiber COX-2 et 5-LO. Il a des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires et prévient l'apparition de plusieurs cancers [280]. Le **resvératrol** est une phytoalexine polyphénolique présente dans le raisin rouge et dans les cacahuètes [281]. Le resvératrol inhibe la croissance des cellules LNCaP, DU-145 (androgène-indépendante) et PC-3 de façon dose-dépendante. De plus, il réduit le stress oxydant en diminuant la production de NO dans les cellules PC-3 et DU-145 [282]. Il induit l'apoptose dans les cellules LNCaP et DU145 via les voies MAPK [283] ou via le récepteur Fas [284] et module l'expression du AR [282].

1.3.10 Les acides gras polyinsaturés (PUFAs)

Des études ont montré qu'une consommation même modérée de poissons gras a des propriétés protectrices contre le cancer de la prostate. A l'origine de ce phénomène, les acides gras à longue chaîne aux propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales [285]. Des études *in vitro* ont montré que les acides gras **Oméga-3** présents dans l'huile de maquereau, de saumon, de sardines, d'anchois et de thon ou encore extraits des plantes comme le canola, le soja et les graines de lin [286], diminuent le taux de testostérone dans le sang, reconnue pour accélérer la progression du cancer de la prostate. De plus, ils inhibent l'expression du PSA [287]. L'**acide eicosapentanoïque** (EPA, 20:5n-3) et l'**acide docosahexanoïque** (DHA, 22:6n-3) présents dans les poissons gras, inhibent l'activité des eicosanoïdes et des androgènes, reconnus pour leurs effets stimulants sur la croissance des cellules cancéreuses de la prostate [288].

Il existe plusieurs mécanismes d'action des PUFAs contre la carcinogenèse :

1.3.10.1 L'inhibition de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) à l'origine de la synthèse des eicosanoïdes

Une des fonctions les plus importantes des PUFAs (acides gras n-3 et n-6) est reliée à leur conversion en eicosanoïdes, caractérisés par une durée de vie courte, une structure proche des hormones et comportent 20 atomes de carbones. Les eicosanoïdes sont biologiquement importants puisqu'ils modulent l'inflammation et la réponse immunitaire. Ils jouent un rôle important dans la coagulation, la croissance et la différenciation cellulaire. Comme le PUFA le plus abondant de la membrane cellulaire est le AA, la plupart des eicosanoïdes produits ont des propriétés pro-inflammatoires [289-291] et procarcinogènes [292]. Donc, le meilleur moyen de diminuer le risque de cancer, est de supprimer la synthèse des eicosanoïdes provenant du AA.

1.3.10.2 La modulation de l'activité des facteurs de transcription, de l'expression des gènes et des voies de signalisation.

Les PUFAs, et leurs métabolites, peuvent exercer un effet anti-tumoral en affectant l'expression de certains gènes ou encore en modulant certaines voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire, de la différenciation cellulaire, de l'apoptose, de l'angiogenèse et de l'apparition de métastases.

1.3.10.2.1 Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR)

Le premier facteur de transcription identifié, régulé par les acides gras, est le PPAR α [293]. C'est un membre de la famille des PPAR qui comprend aussi le PPAR β et le PPAR γ (γ 1, γ 2 et γ 3). Ce facteur de transcription activé par un ligand a d'abord été identifié dans la régulation du métabolisme lipidique et dans l'homéostasie. Des études récentes ont mis en évidence son implication dans la prolifération cellulaire, la différenciation et les réponses inflammatoires [294]. PPAR γ est exprimé dans les cellules épithéliales du cancer de la prostate [295]. De plus, des études ont montré que l'agoniste du PPAR γ , le troglitazone, est capable de bloquer ou d'inverser la progression d'un cancer de la prostate [296-298]. Puisque ses ligands

privilégiés sont les PUFAs (LA, α -LNA, AA et EPA) [299, 300], il représente une cible intéressante pour le traitement du cancer de la prostate.

1.3.10.2.2 Le facteur de transcription nucléaire kB (NF-kB)

La famille des facteurs de transcription nucléaire kB ou NF-kB est impliquée dans l'expression des gènes codant pour les cytokines, l'adhésion cellulaire, l'activation du cycle cellulaire, l'apoptose et la carcinogenèse [301]. En effet, l'activation constitutive de NF-kB dans le cancer joue un rôle dans la croissance tumorale [301]. Une étude expérimentale a montré une diminution significative de l'activation du NF-kB par des acides gras n-3 dans les macrophages de murins [302].

1.3.10.2.3 Les radicaux libres et les espèces réactives d'oxygènes (ROS)

Elles sont produites dans les cellules et peuvent attaquer les PUFAs pour former des hydroxypéroxydes qui à leur tour produisent des radicaux libres et des aldéhydes réactifs. Ces métabolites génèrent des adduits d'ADN exocyclique pro-mutagénique dans les cellules humaines ce qui favorise l'apparition d'un cancer [303, 304]. L'auto-oxydation des acides gras exposés à l'air atmosphérique, est proportionnelle au nombre de doubles liaisons présentes dans la molécule. Puisque les PUFAs n-3 possèdent plusieurs insaturations, il est évident qu'ils favorisent la peroxydation lipidique et donc la carcinogenèse. Ces conclusions proviennent de travaux réalisés *in vitro* dans des systèmes homogènes [305]. Cependant, plusieurs études démontrent que la consommation d'acides gras n-3 supprime les maladies causées par les radicaux libres comme le cancer et l'athérosclérose, ce qui suggère que la peroxydation lipidique *in vivo* est différente de celle *in vitro* [306].

Takahashi et al. (2002) ont montré que certains gènes codant pour des enzymes antioxydantes, comme la glutathion transférase et la superoxyde dismutase, sont surexprimées chez des souris nourries avec de l'huile de poisson [307]. Il existe donc un effet protecteur contre la production d'espèces réactives d'oxygène et contre l'initiation du cancer. De plus, la génération de radicaux oxygénés est impliquée dans l'initiation de l'apoptose et dans l'activation des défenses naturelles contre les cellules transformées ou étrangères [308]. Donc, l'effet

inhibiteur des acides gras n-3 sur la prolifération cellulaire, est, en partie, expliqué par la formation de produits oxydés qui induisent l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire.

1.3.11 Les micronutriments

À ce jour, aucun nutriment n'a été identifié comme un chimioprotecteur capable d'agir seul, mais plutôt en synergie avec un large spectre de micro-nutriments. La vitamine E, le sélénium, le calcium, la vitamine D et le zinc jouent un rôle dans la prévention du cancer de la prostate [309].

Les vitamines sont un groupe de composés organiques essentiels pour le fonctionnement normal du corps. Elles sont présentes dans différentes sources alimentaires. D'après une étude effectuée par l'institut américain de la recherche sur le cancer (AICR), plus de la moitié des adultes âgés de plus de 45 ans consomment des multivitamines pour diminuer le risque de développer un cancer. Plusieurs études *in vitro* sur des cellules cancéreuses de la prostate ont montré que la vitamine E (plus particulièrement l'alpha- et le gamma-tocophérol) réduisent le risque de développer un cancer de la prostate de 32 % [310, 311]. En effet, la vitamine E a une activité antioxydante et détoxifiante des radicaux libres formés dans la membrane des cellules cancéreuses [312]. De plus, elle induit l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses et induit la surexpression de p27, un régulateur du cycle cellulaire [313].

Le sélénium est un minéral essentiel qui permet à la vitamine E d'avoir un potentiel redox. Il est présent dans les noix du Brésil, dans le thon, l'espadon et les huitres. Le taux de sélénium présent dans l'alimentation diffère en raison de la diversité des sols dans lesquels les aliments sont cultivés. Des études sur les populations ont montré que les hommes atteints du cancer de la prostate ont un taux en sélénium plus faible que celui des hommes sains. Le sélénium inhibe l'angiogenèse et la prolifération cellulaire [314] et induit l'apoptose *in vitro* [315].

La vitamine E combinée au sélénium induit un arrêt de la prolifération des cellules anormales. Cependant, une étude contradictoire réalisée sur 35 000 hommes a montré que ni le

sélénium ni la vitamine E n'avaient d'effets sur la réduction du risque lié au développement du cancer de la prostate [316]. D'autres investigations concernant la chimioprévention du sélénium sont en cours [193, 299, 300].

Pour prévenir l'ostéoporose chez les hommes âgés de plus de 50 ans, il est recommandé de consommer 1,200 mg de calcium par jour. Cependant, des études épidémiologiques ont montré qu'une consommation importante de calcium augmentait les risques de développer un cancer de la prostate. Il est donc important de déterminer la limite maximale de consommation de calcium pour limiter les risques. En effet, une consommation importante réduit la production de 1,25(OH)₂ vitamine D qui a des propriétés antiprolifératives et anti-métastatiques sur le cancer de la prostate [317, 318]. Des études ont montré que les régions du monde où l'exposition au soleil était plus faible, et par conséquent la production de vitamine D aussi, la prévalence du cancer de la prostate était plus élevée [319, 320].

La quantité de zinc dans les cellules cancéreuses de la prostate est inférieure à celle des cellules normales [321]. En effet, dans les cellules normales, le zinc agit comme inhibiteur d'une enzyme, la m-aconitase, qui fait partie du cycle de Krebs. La faible teneur en zinc dans les cellules cancéreuses leur permet de compléter le cycle de Krebs, de produire de l'énergie et de se multiplier de façon incontrôlée [322].

2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Le cancer de la prostate est un cancer très fréquent qui présente un taux de mortalité important. Durant les deux dernières décennies, le nombre de cas a fortement augmenté grâce à un test de dépistage sanguin de la PSA. C'est un cancer dont la croissance et la progression dépendent essentiellement des androgènes et plus particulièrement de la DHT. En effet, la testostérone est convertie en DHT par une enzyme stéroïdienne la SRD5A, la DHT se lie alors au AR et induit son activation. Ce dernier une fois activé induit l'expression des gènes intervenant dans la prolifération cellulaire, incontrôlée dans le cas d'un cancer.

Il existe actuellement plusieurs traitements contre le cancer de la prostate comme l'hormonothérapie qui a pour but de bloquer l'action de ces androgènes. Cependant, en plus des effets secondaires indésirables, ces traitements induisent une résistance aux traitements [2]. En effet, les cellules cancéreuses évoluent invariablement vers un état androgène-indépendant difficile à traiter [3].

C'est un cancer qui survient vers l'âge de 50 ans et évolue la plupart du temps lentement. Pour toutes ces raisons, les traitements préventifs semblent être les plus appropriés. En effet, des études épidémiologiques ont mis en évidence l'importance des facteurs environnementaux dans le développement du cancer de la prostate et plus particulièrement l'influence du régime alimentaire dans la prévalence des risques de développer ce cancer [5, 6]. Des études récentes ont mis en évidence les propriétés thérapeutiques (chimiopréventives et chimiothérapeutiques) des composés naturels et plus particulièrement de certains dérivés de la grenade sur le cancer de la prostate [7, 323]. Les recherches actuelles tentent de mettre en évidence le composé bioactif présent dans la grenade et responsable partiellement ou totalement d'un effet thérapeutique.

Nous émettons l'hypothèse que cet effet chimiopréventif se traduit, dans les cellules hormono-dépendantes, par un effet antiandrogénique capable d'inhiber la croissance cellulaire. Cet effet antiandrogénique se traduirait par la modulation de l'expression du AR ou encore par la modulation de l'expression des gènes codant pour une enzyme clé de la synthèse *de novo* des stéroïdes, la SRD5A. **En revanche, nous pensons qu'une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses hormono-dépendantes et hormono-indépendantes ferait intervenir d'autres voies cellulaires indépendantes de la voie androgénique.**

Notre **objectif** est de déterminer l'effet antiprolifératif des composés naturels extraits de la grenade sur les cellules cancéreuses de la prostate.

Objectif 1 : Effets antiprolifératifs et antiandrogéniques

Treize composés de la grenade appartenant à différentes classes chimiques et présentant des effets préventifs sur différents cancers ont été sélectionnés. Les effets antiprolifératifs et antiandrogéniques de ces composés ont été déterminés sur les lignées cellulaires LNCaP grâce à une méthode colorimétrique qui permet d'estimer le nombre de cellules viables cultivées dans une plaque de microtitration à l'aide d'un spectrophotomètre. La lignée cellulaire LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) est disponible comme modèle *in vitro* pour étudier l'effet de différents composés à différents niveaux d'évolution du cancer de la prostate [324]. Les composés présentant des effets antiprolifératifs sur les LNCaP ont été sélectionnés pour identifier leurs effets antiandrogéniques.

L'effet antiandrogénique a été défini comme étant l'inhibition de la capacité transcriptionnelle du AR. Pour cela nous avons déterminé la modulation de l'expression protéique du AR par immunobuvardage de type western sur des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques provenant des cellules LNCaP, exposées aux composés extraits de la grenade. Nous avons également déterminé la modulation de l'expression des gènes codant pour la SRD5A1 et pour le PSA par une RT-PCR semi-quantitative.

Objectif 2 : Effets cytotoxiques et apoptotiques

Les composés induisant une diminution de la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses LNCaP et PC-3 ont été sélectionnés pour identifier leurs effets apoptotiques. De plus, nous avons testé leurs effets sur la viabilité des cellules épithéliales normales RWPE-1.

Les voies apoptotiques mises en jeu ont été déterminées grâce à différentes techniques : Les cellules ont été colorées avec de l'iodure de propidium (PI) pour identifier les cellules nécrotiques et avec du Hoechst 33342 pour identifier les cellules apoptotiques, puis observées au microscope à fluorescence. Un dosage de l'ADN fragmenté a aussi été réalisé. Enfin, les voies apoptotiques mises en jeu ont été identifiées par immunobuvardage de type western.

Objectif 3 : Analyse structure/activité des composés naturels actifs

Nous avons testé sept acides gras polyinsaturés, dont quatre isomères de l'acide punicique, que nous avons sélectionné comme composés de référence. Nous avons identifié les composés les plus cytotoxiques sur les cellules LNCaP, PC-3 et avons déterminé le lien entre leurs activités biologiques et leurs structures chimiques spécifiques. Pour cela nous avons réalisé une analyse 3-D grâce au logiciel PubChem Compound qui permet de différencier des composés ayant la même formule brute, mais dont la formule développée est différente. De plus, il permet d'identifier la structure du composé le plus actif et de le comparer à d'autres composés ayant les mêmes propriétés physico-chimiques. C'est un moyen de comprendre la différence structurelle qui peut exister entre les composés et qui n'est pas visible en 2-D.

3 DEUXIÈME PARTIE : ARTICLES

3.1 CHAPITRE I : Les effets antiprolifératifs, antiandrogéniques et proapoptotiques de l'acide punique dans les cellules cancéreuses de la prostate LNCaP

3.1.1 Traduction du résumé de l'article

Le cancer de la prostate est une maladie de plus en plus répandue chez les hommes. De plus, la chimioprévention par des composés extraits de la grenade (*punica granatum*) présente plusieurs effets bénéfiques. Nous avons déterminé les effets antiprolifératifs, antiandrogéniques et pro-apoptotiques de 13 composés purs, extraits de la grenade, sur des cellules cancéreuses de la prostate androgène-dépendantes LNCaP. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture dépourvu de stéroïdes et ont été exposées à des concentrations croissantes de composés de la grenade (1-100 μM) en présence de dihydrotestostérone (DHT) à 0.1 nM. L'inhibition de la croissance cellulaire a été mesurée après 4 jours d'exposition grâce à un test colorimétrique le WST-1. Quatre composés, à une concentration de 10 μM et plus, ont été capables d'inhiber la croissance des cellules stimulées par la DHT. Ces composés ont inhibé l'accumulation du récepteur à androgène, stimulé par la DHT, dans le noyau. De plus, ils ont inhibé l'expression des gènes dont l'expression dépend du récepteur à androgène, du PSA et de la 5 α -réductase de type 1 à des concentrations $\geq 10 \mu\text{M}$. La contribution de l'apoptose à la diminution de la croissance cellulaire observée a été déterminée. En effet, trois composés l'EGCG, le kaempférol, et plus particulièrement, l'acide punique, ont provoqué une fragmentation de l'ADN après 24 h d'exposition à des concentrations allant de 10 à 100 μM . De plus, l'acide punique, un acide gras abondant dans les graines de la grenade, a induit une apoptose via la voie intrinsèque. En conclusion, l'acide punique, le constituant principal des graines de la grenade (70-80 %), possède des propriétés antiprolifératives sur les cellules cancéreuses de la prostate androgène-dépendantes LNCaP. Ces propriétés font intervenir des mécanismes antiandrogéniques et pro-apoptotiques.

3.1.2 Contribution de l'étudiante

Toutes les expériences, la rédaction du manuscrit ainsi que la soumission à des revues scientifiques ont été réalisées par le premier auteur de l'article.

3.1.3 Growth inhibitory, antiandrogenic and pro-apoptotic effects of punicic acid in LNCaP human prostate cancer cells

Jihane Gasmi and J. Thomas Sanderson

Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
Laval, Québec, Canada

Corresponding author:

J. Thomas Sanderson, PhD

INRS-Institut Armand-Frappier

531 blv des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V1B7

Phone: (450) 687-5010 ext 8819 / Fax: (450) 686-5309

E-mail: thomas.sanderson@iaf.inrs.ca

J Agric Food Chem 2010 Nov 10.

Abstract

Prostate cancer is a commonly diagnosed cancer in men and dietary chemoprevention by pomegranate (*Punica granatum*) extracts has shown noticeable benefits. In this study we investigated the growth inhibitory, antiandrogenic and pro-apoptotic effect of 13 pure compounds found in the pomegranate in androgen-dependent LNCaP human prostate cancer cells. Cells deprived of steroid hormones were exposed to increasing concentrations (1-100 μM) of pomegranate compounds in the presence of 0.1 nM dihydrotestosterone (DHT) and inhibition of cell growth was measured by WST-1 colorimetric assay after a 4 day exposure. Four compounds epigallocatechin gallate (EGCG), delphinidin chloride, kaempferol and puniic acid were found to inhibit DHT-stimulated cell growth at concentrations of 10 μM and above. These four pomegranate compounds inhibited DHT-stimulated androgen receptor nuclear accumulation and the expression of the androgen receptor-(AR)-dependent genes prostate specific antigen (PSA) and steroid 5 α -reductase type 1 (SRD5A1) at concentrations ≥ 10 μM . We determined the possible contribution of apoptosis to the observed decrease in cell growth and found that three compounds, EGCG, kaempferol and, in particular puniic acid, induced DNA fragmentation after a 24h treatment, at concentrations in the 10-100 μM range. Puniic acid, an important fatty acid in pomegranate seeds, was further found to induce intrinsic apoptosis via a caspase-dependent pathway. In conclusion, puniic acid, the main constituent of pomegranate seed (70-80%) exhibited potent growth inhibitory activities in androgen-dependent LNCaP cells, which appear to be mediated by both antiandrogenic and pro-apoptotic mechanisms.

Keywords: Pomegranate, puniic acid, SRD5A1, PSA, LNCaP, apoptosis.

Abbreviations: AR: androgen receptor; CS-FBS: Charcoal stripped fetal bovine serum; DMSO: dimethylsulfoxide; DHT: dihydrotestosterone; PSA: prostate specific antigen; SRD5A1: steroid 5 α -reductase type 1.

1. Introduction

Prostate cancer is the most common cancer diagnosed in North American men, and is the third leading cause of cancer death in western countries (1). The number of cases diagnosed has increased over the last decades in part due to the development of sensitive tests for the detection of prostate cancer markers, such as prostate-specific antigen (PSA) which are expressed androgen-dependently and are secreted into the blood circulation (2).

Most prostate cancers are initially androgen-dependent and the main treatment option at this early-stage is androgen ablation (3, 4). However, after initial successful response to androgen ablation therapy, most prostate cancers progress to an androgen-resistant state that is highly aggressive, metastatic, and often leads to death (5).

Compelling risk factors involved in the development and progression of prostate cancer include older age, a family history of prostate cancer, and race. Increasing interest has centered on nutritional or other environmental factors that either offer protection against prostate cancer or increase its incidence. Asian men have much lower incidences of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) than their Western counterparts (6). Moreover, vegetarian men have a lower incidence of prostate cancer than omnivorous males. Taken together, both populations of men consume low-fat, high-fibre diets containing fruits and vegetables, which provide a rich supply of antioxidants, weak dietary estrogens and possible anti-androgens. This implies that environmental factors, rather than genetics alone, contribute substantially to the risk of developing prostate cancer (7).

Dietary chemoprevention of prostate cancer is increasingly considered to be an important way to reduce this health problem (8, 9). Recently, pomegranate (*Punica granatum*) a source of many polyphenols including ellagitannins, punicaligins, gallotannins, anthocyanins and flavonoids has shown promise in the prevention of prostate cancer as has been demonstrated in studies with extracts and/or isolated bioactive compounds (10-12). More recently, ellagitannin metabolites formed in the gut, such as urolithin A and B are being considered as biologically active agents against prostate cancer (13); they appear to have protective (anti-inflammatory) actions in colon (14), although little is yet known about their concentrations in prostate, therapeutically relevant levels or mechanism of action.

We hypothesize that certain compounds found in the pomegranate have growth inhibitory and antiandrogenic properties which contribute to their protection against the development and

growth of prostate cancer. The objective of the present study was to examine the potential protective effects of a number of pure compounds known to be found in various parts of the pomegranate, including puniic acid, which is the predominant trienoic acid in this fruit (15). The effects of pomegranate compounds on cell growth, and apoptosis were examined in an androgen-dependent and androgen receptor (AR)-positive human prostate cancer cell line (LNCaP). Since androgens and the androgen receptor (AR) play central roles throughout prostate cancer development, the effects of pomegranate polyphenols and fatty acids were evaluated on the transcription of genes for the AR-dependent dihydrotestosterone (DHT)-synthesizing enzyme SRD5A1 (steroid 5 reductase type 1), PSA and nuclear androgen receptor levels.

2. Materials and methods

2.1. Pomegranate compounds

Puniic acid, gallic-, *cis*-vaccenic-, *trans*-vaccenic- and quinic acid were purchased from Larodan Fine Chemicals AB (Malmö, Sweden), kaempferol, delphinidin chloride, pelargonidin chloride, cyanidin chloride, malvidin chloride, epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG) and epigallocatechin gallate (EGCG) were purchased from Extrasynthèse (Genay, France) (Table 1). All compounds were dissolved in DMSO as 1000-fold concentrated stock solutions. Although some compounds are water soluble we chose DMSO for all solutions to remain consistent. The quantitative pomegranate contents of these compounds in the actual fruit, as far as known, are summarized in Table 1.

2.2. Cell culture

Androgen-dependent LNCaP cells (American Type Culture Collection, Manassas, USA) were maintained and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 37°C. Cells in 75cm² flasks were grown to 80 % confluence and then seeded in multi-well cell culture plates for the experimental procedures. Fresh batches of LNCaP cells were cryogenically frozen (in steps of 1°C until -80°C; then frozen in liquid nitrogen) at passage number 4-5 for future use. Passage numbers between 2 and 25 were used; after 25 passages androgen responsiveness declined.

2.3. Cell growth inhibition assay

LNCaP cells were seeded in 96-well plates (Fisher, Ottawa, ON) at a concentration of 5×10^4 cells/well in 100 μ l phenol red-free culture medium with 10 % CS-FBS (charcoal-stripped fetal bovine serum) for 24h, to arrest cell growth by removing steroids. Cells were then exposed to solvent (negative) control (0.1 % DMSO), DHT (0.1 nM; positive control for stimulation of cell growth), or the pomegranate compounds (3, 10, 30 and 100 μ M) in the presence of 0.1 nM DHT (an approximate EC_{50} for increased cell growth) for 48h. The medium was then refreshed and the cells were exposed for a further 48h to the same experimental treatments. A WST-1 cell viability assay (Roche Applied Science, Germany) was performed according to the manufacturer's instruction. Absorbance was measured at 440 nm using a Spectramax M5 multifunctional spectrometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.4. Assay of apoptosis

Cells were seeded at a concentration of 0.5×10^4 cells/well in 100 μ l of complete culture medium in 96-well plates for 24h. The pomegranate compounds (0, 1, 3, 10, 30, 100 μ M) were added and the cells were incubated for an additional 24h. A Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche Applied Science) was used to determine the formation of cytoplasmic histone-associated DNA-fragments following the manufacturer's instructions.

2.5. Protein isolation and immunoblotting

A Ne-Per Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL) was used for the extraction of nuclear and cytoplasmic protein fractions. Cell pellets were lysed in RIPA buffer containing 1X protease inhibitor cocktail, and protein concentrations were determined using the Bradford assay. Proteins (15 μ g) were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Bio-Rad, Mississauga, ON). Membranes were blocked with 5% reconstituted milk powder (Sobeys, Mississauga, ON) and then probed with the appropriate primary and secondary antibodies at 4°C overnight. Antibody-antigen complexes were visualized by Immobilon Western Chemiluminescence reagents (Millipore, Billerica, MA) using a Versadoc imaging system (Biorad, Mississauga, ON). β -actin and GAPDH were used as protein loading (reference) controls. The mouse antibodies raised against human β -actin, androgen receptor and caspase-8 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The rabbit antibodies raised against human caspase-9, cleaved PARP, Bcl2, Bax, GSK-3 β

and phospho-GSK-3 β were purchased from Cell Signalling Technology (Danvers, MA). GAPDH, phospho-Akt1 and Akt1 were purchased from Millipore. Electrophoresis and immunoblotting equipment was purchased from Bio-Rad. LY294002 (Sigma-Adrich, St Louis, Mo), a phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor was used as positive control for inhibition of Akt phosphorylation at the Ser473 position.

2.6. mRNA extraction and reverse transcription polymerase chain reaction

LNCaP cells were seeded at a concentration of 3×10^5 cells/well in 2 ml phenol red-free with CS-FBS in 6 wells plates for 24h to arrest cell growth. Cells were then exposed for 24 h to solvent (negative) control (0.1 % DMSO), DHT (0.1 nM; an approximate EC₅₀ value for PSA induction and positive control for stimulation of AR-dependent gene expression), or the pomegranate compounds (1, 3, 10, 30, 100 μ M) in the presence of 0.1 nM DHT. Total RNA was prepared using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science) and was reverse transcribed and amplified using a one-step Access RT-PCR kit (Promega, Madison, WI). RT-PCR reactions were performed in 25 μ l containing 100 ng RNA and 23 μ l MasterMix. Oligonucleotide primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) were included in the reactions with sequences as follows: PSA (accession number M26663, NCBI GenBank): 5' GCC TCT CGT GGC AGG GCA GT 3' (forward), 5' CTG AGG GTG AAC TTG CGC AC 3' (reverse); SRD5A1 (accession number M32313): 5'GCG AGG AGG AAA GCC TAT GC 3' (forward), 5' CAG GGC ATA GCC ACA CCA CT 3' (reverse) ; β -actin (accession number M10277): 5' GTA CCC TGG CAT TGC CGA C 3' (forward), 5' TAA CGC AAC TAA GTC ATA GTC C 3' (reverse). Cycling conditions for PSA were as follows; denaturing at 95°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min for 35 cycles. Cycling conditions for SRD5A1 and β -actin were as follows; denaturing at 95°C for 1 min, annealing at 59°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min for 35 cycles. These conditions were chosen to produce amplified products in the exponential phase, assuring semi-quantitative results were obtained.

2.7. Statistical analyses

All treatments were performed in quadruplicate (growth inhibition experiments) or in triplicate (immunoblotting and apoptosis experiments) per experiment and each experiment was performed three times independently. All densitometric analyses of immunoblots were expressed as normalized means \pm SDs. Statistically significant differences (* $p < 0.05$) were determined using

one-way ANOVA with Tukey *posterior* test. IC₅₀ values were calculated using non-linear curve-fit analysis and are presented as means ± 95% confidence intervals, based on the average of 3 independent experiments. All analyses were performed using GraphPad Prism v5.03 (GraphPad Software, San Diego CA).

3. Results

3.1 Growth inhibitory and antiandrogenic effects of pomegranate compounds

LNCaP cells, after initial deprivation of steroids (24h), were exposed to the thirteen pomegranate compounds for 48 h, in the presence of a growth inducing (0.1 nM) concentration of DHT. DHT (0.1 nM) alone stimulated cell growth by 3-4 fold and control cells increased in number by about 2% (not shown). Only four pomegranate compounds displayed a consistent concentration-dependent (3-100 µM) growth inhibition of DHT-stimulated LNCaP cells. These were EGCG, delphinidin chloride, kaempferol and puniic acid (Fig. 1), with IC₅₀ values of 34 ± 8, 38 ± 7, 29 ± 6, and 18 ± 4, respectively. LNCaP cells, conditioned in the same way as in the growth inhibition experiments, were incubated with increasing concentrations (3-100 µM) of EGCG, delphinidin chloride, kaempferol or puniic acid in the presence of 10 nM of DHT (the DHT concentration required to produce a clear increase in AR protein in nucleus) for 24h. DHT-induced AR nuclear accumulation (determined by immunoblotting) was inhibited by EGCG at concentrations ≥10 µM (Fig. 2A) and by delphinidin chloride, kaempferol and puniic acid at a concentration of 100 µM (Fig. 2B-D). None of the pomegranate compounds were cytotoxic when tested in the absence of DHT (not shown). In a parallel experiment using the same conditions, total RNA was extracted and levels of PSA, SRD5A1 and β-actin mRNA were determined by semi-quantitative RT-PCR. DHT-stimulated expression of PSA and SRD5A1 was inhibited at concentrations ≥3 µM for puniic acid (Fig. 3D and H), and ≥30 µM for EGCG (Fig. 3A and E) and kaempferol (Fig 3C and G) and at 100 µM for delphinidin chloride (Fig. 3B) but without statistically significant effect on the expression of SRD5A1 (Fig 3F).

3.2. Do growth inhibitory pomegranate compounds induce apoptosis in LNCaP cells?

To test whether the decrease in cell growth by these compounds was due to induction of apoptosis, we determined LNCaP nuclear DNA fragmentation after a 24h exposure to the four pomegranate compounds (10, 30 and 100 µM) in complete culture medium. EGCG and kaempferol induced apoptosis above 30 µM in LNCaP cells. However puniic acid was the most

potent compound since it induced apoptosis at $\geq 10 \mu\text{M}$ (Fig. 4) and was selected for further experiments.

Cells were treated with increasing concentrations of puniic acid (0, 3, 10, 30, 100 μM) in complete culture medium for 24h. A reduction in Bcl2 expression by puniic acid was seen at 30 and 100 μM indicating that disintegration of mitochondrial structures had occurred resulting in initiation of the apoptotic pathway, likely via activation of the caspase 9 cascade as we detected caspase 9 cleavage (Fig. 5). Further evidences in favour of apoptosis were chromatin cleavage resulting in oligonucleosomal DNA fragmentation and cleavage of PARP. PARP is one of the targets of active caspase-3 and puniic acid induced its cleavage into an 89-kDa fragment after 24h of exposure, which was statistically significant at a concentration $\geq 30 \mu\text{M}$. Puniic acid further caused inactivation of Akt via reduction of the active phospho-Akt-Ser 473 and reduced inactivation of GSK-3 β by decreasing the inactive phospho-GSK-3 β -Ser 9 at $\geq 30 \mu\text{M}$, after 1h of exposure (Fig. 6).

4. Discussion

Prostate cancer is an important malignant disease in men, particularly in western countries. The number of new cases in United States in 2009 was estimated to be almost two hundred thousand with an estimated death toll of almost thirty thousand (16). To prevent and control this disease more effectively, there is a need to identify chemopreventive approaches (17, 18) (11, 19). Pomegranate fruits, juices and extracts have been used extensively in ancient cultures for various medicinal purposes (20). Pomegranate polyphenols are potent antioxidants that have been shown both *in vitro* and *in vivo* to inhibit the growth of prostate and certain other forms of cancer (21-23).

In this study, we have demonstrated that 4 out of the 13 pomegranate compounds we tested (Table 1), EGCG, delphinidin chloride, kaempferol and puniic acid had growth inhibitory effects (Fig. 1) and pro-apoptotic activities (delphinidin chloride excepted) (Fig. 4) in LNCaP androgen-dependent human prostate cancer cells. All four compounds significantly inhibited the expression levels of AR proteins in a concentration-dependent manner (Fig. 2), as well as reducing the DHT-mediated up-regulation of PSA and steroid 5 α -reductase SRD5A1 gene expression in LNCaP cells (Fig. 3). Inhibition of gene expression involved in androgen synthesizing enzymes and reduction of nuclear AR levels may contribute to the growth-inhibitory effects of these compounds.

The LNCaP cells express androgen receptors and their growth is androgen-dependent. Cell growth requires androgen receptor activation and local steroid 5 α -reduction of circulating testosterone to produce the potent androgen DHT (24) which is an effective inducer of transcription of PSA resulting in increased synthesis and secretion of PSA protein. Our study shows that four pomegranate compounds are able to down-regulate the expression of these AR-dependent marker genes in LNCaP cells (Fig. 3), as well as reducing nuclear AR levels (Fig. 2), indicating that these compounds not only interfere with AR-dependent cell growth but also affect the conversion of testosterone into the more potent dihydrotestosterone. In the case of EGCG, our findings confirm studies that have shown that catechins (EGCG) present in green tea, polyunsaturated fatty acids such as γ -linolenic acid, ellagitannins, the flavonoids and lignans are also inhibitors of 5 α -reductase (25-27). Although the structures of EGCG and EG are very similar only EGCG had significant antiandrogenic effects. This is likely due to the additional electron donating hydroxy-group on the phenyl B-ring of EGCG, which increases the electronegative properties of this phenolic moiety. It is known that the interaction of DHT with the ligand-binding pocket of the AR is driven predominantly by electrostatic bonds (28, 29). Thus, the highly hydroxylated EGCG has the greatest potential to interfere with the binding of DHT to the AR. In support of this, electron-spin resonance studies have shown that EGCG is considerably more electrostatically charged than its epicatechin analogues that lack three hydroxygroups on the B-ring (30). This study also showed that the gallate group (the hydroxylated D ring – Table 1) had no influence.

The present study has demonstrated that out of the 4 most growth inhibitory and anti-androgenic pomegranate compounds selected, punicalic acid was the most potent inducer of apoptosis in LNCaP cells (Fig. 4). It has previously been shown to inhibit breast cancer proliferation and induce apoptosis in MDA-MB-231 and MDA-ERalpha7 cells (31). Several apoptosis-associated genes or proteins have been shown to play critical roles in regulating apoptosis. These include caspases, Bcl2 family members and PARP (32, 33). To determine whether these proteins are involved in the mediation of punicalic acid-induced inhibition of LNCaP cell growth, we examined caspase activation and cleavage of PARP by Western blotting (Fig. 5). Bcl2 is an upstream effector molecule in the intrinsic apoptotic pathway and has been identified as a potent suppressor of apoptosis [12]. Most cancers, including prostate cancer, generally overexpress Bcl2 (34, 35) thereby escaping apoptosis and undermining effective therapy. Bcl2

forms a heterodimer with the apoptotic protein Bax and neutralizes its apoptotic effects. We showed that puniic acid, the most abundant trienoic acid found in the pomegranate, significantly decreased Bcl2 protein levels after a 24h treatment without affecting the level of Bax protein (Fig. 5). These results suggest that puniic acid-induced apoptosis is mediated via down-regulation of Bcl2 antiapoptotic proteins together with an decreased Bcl2/Bax ratio in LNCaP cells. Alteration of this ratio is a decisive factor in whether cells will undergo apoptosis. We found that puniic acid downregulates Bcl2, which results in cytochrome c release from the mitochondria. This initiates an apoptotic process by activation of caspase 9 which once initiated goes on to cleave procaspase-3. Activated caspase-3 cleaves poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and allows the degradation of DNA to continue. Taken together, these data clearly indicate that puniic acid is an efficient inducer of apoptosis via this pathway in LNCaP cells.

Apoptosis is a normal cellular function that controls excessive proliferation by eliminating unnecessary or damaged cells. Cancer cells have devised several mechanisms to inhibit apoptosis and prolong their survival. Akt serves as one of the major anti-apoptotic factors in apoptotic pathway. Akt is constitutively activated in LNCaP cells (36), therefore, it is possible that Akt provides survival support to prostate cancer cells in the absence of androgens. Since we have shown that puniic acid inhibits the phosphorylation of Akt, survival support of these cells is eliminated and they are driven towards apoptosis (Fig. 6). The principal characterized physiological substrate of Akt is glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) (37), which was initially identified as an enzyme that regulates glycogen synthesis in response to insulin (38). GSK-3 β is a ubiquitously expressed protein-serine/threonine kinase whose activity is inhibited by Akt phosphorylation in response to growth factor stimulation. Here we show that GSK-3 β is involved in the regulation of apoptosis, identifying it as a critical downstream element of the PI 3-kinase/Akt cell survival pathway (Fig. 6). Although, identification of the GSK-3 β targets that regulate apoptosis is a critical next step. Also, our observation that both Akt and caspase 9 are associated with apoptosis induced by puniic acid brings up the question whether both pathways are activated independently or that they interact.

Our findings confirm studies that have shown that EGCG, delphinidin chloride, and kaempferol have anti-tumor effects on prostate cancer cell line LNCaP (18, 39-46). However, we are the first to show that puniic acid, which is the main trienoic acid in pomegranate seed oil, has greater pro-apoptotic effects than EGCG, kaempferol or delphinidin chloride. We postulate

that mixtures of the numerous biologically active compounds in the pomegranate may have additive or synergistic effects resulting in more effective inhibition of cell growth than any one single compound. As these compounds appear to have different/complementary mechanisms of growth inhibitory action they could also be effective agents for the treatment of both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells (47, 48). We will address the above hypotheses in future studies. Future studies should furthermore focus on the bioavailable metabolites that are formed and their biologically relevant concentrations in plasma and ideally in target organs of interest such as the prostate.

In conclusion, our results show that among several other compounds found in the pomegranate, punicic acid has a relatively potent growth inhibitory and antiandrogenic effect on androgen-dependent LNCaP cells. This is also the first study to implicate Akt as a key mediator of apoptosis induced by punicic acid. Impairment of the PI3K/Akt pathway by punicic acid appears to be an important and relevant chemotherapeutic mechanism against prostate cancer growth.

Acknowledgements

We would like to thank Dave Lanoix, Patricia Rivest and Talal Oufkir for their technical assistance with the experiments. We would also like to thank Dr Ephraim Lansky for his important advice. This work was supported financially by a Natural Sciences and Engineering Council (NSERC) of Canada grant (No 313313) to Thomas Sanderson.

References

1. Heidenreich, A.; Aus, G.; Bolla, M.; Joniau, S.; Matveev, V. B.; Schmid, H. P.; Zattoni, F., EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* **2008**, *53*, (1), 68-80.
2. Ulmert, D.; Cronin, A. M.; Bjork, T.; O'Brien, M. F.; Scardino, P. T.; Eastham, J. A.; Becker, C.; Berglund, G.; Vickers, A. J.; Lilja, H., Prostate-specific antigen at or before age 50 as a predictor of advanced prostate cancer diagnosed up to 25 years later: a case-control study. *BMC Med* **2008**, *6*, 6.
3. Aquilina, J. W.; Lipsky, J. J.; Bostwick, D. G., Androgen deprivation as a strategy for prostate cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* **1997**, *89*, (10), 689-96.
4. Cleutjens, K. B.; van Eekelen, C. C.; van der Korput, H. A.; Brinkmann, A. O.; Trapman, J., Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* **1996**, *271*, (11), 6379-88.
5. Feldman, B. J.; Feldman, D., The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, (1), 34-45.
6. Shimizu, H.; Ross, R. K.; Bernstein, L.; Yatani, R.; Henderson, B. E.; Mack, T. M., Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* **1991**, *63*, (6), 963-6.
7. Fleshner, N.; Zlotta, A. R., Prostate cancer prevention: past, present, and future. *Cancer* **2007**, *110*, (9), 1889-99.
8. Moorthy, H. K.; Venugopal, P., Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature. *Indian J Urol* **2008**, *24*, (3), 295-302.
9. Singh, R. P.; Agarwal, R., Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer* **2006**, *13*, (3), 751-78.
10. Trottier, G.; Bostrom, P. J.; Lawrentschuk, N.; Fleshner, N. E., Nutraceuticals and prostate cancer prevention: a current review. *Nat Rev Urol* **2010**, *7*, (1), 21-30.
11. Syed, D. N.; Suh, Y.; Afaq, F.; Mukhtar, H., Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer. *Cancer Lett* **2008**, *265*, (2), 167-76.
12. Lansky, E. P.; Newman, R. A., Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* **2007**, *109*, (2), 177-206.
13. Gonzalez-Sarrias, A.; Gimenez-Bastida, J. A.; Garcia-Conesa, M. T.; Gomez-Sanchez, M. B.; Garcia-Talavera, N. V.; Gil-Izquierdo, A.; Sanchez-Alvarez, C.; Fontana-Compiano, L. O.; Morga-Egea, J. P.; Pastor-Quirante, F. A.; Martinez-Diaz, F.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C., Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54*, (3), 311-22.
14. Gonzalez-Sarrias, A.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Conesa, M. T., Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol Nutr Food Res* **2009**, *53*, (6), 686-98.
15. Lansky, E. P.; Jiang, W.; Mo, H.; Bravo, L.; Froom, P.; Yu, W.; Harris, N. M.; Neeman, I.; Campbell, M. J., Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs* **2005**, *23*, (1), 11-20.
16. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M. J., Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **2009**, *59*, (4), 225-249.

17. Sporn, M. B.; Newton, D. L., Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* **1979**, *38*, (11), 2528-34.
18. Hafeez, B. B.; Siddiqui, I. A.; Asim, M.; Malik, A.; Afaq, F.; Adhami, V. M.; Saleem, M.; Din, M.; Mukhtar, H., A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* **2008**, *68*, (20), 8564-72.
19. Malik, A.; Afaq, F.; Sarfaraz, S.; Adhami, V. M.; Syed, D. N.; Mukhtar, H., Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**, *102*, (41), 14813-8.
20. Longtin, R., The pomegranate: nature's power fruit? *J Natl Cancer Inst* **2003**, *95*, (5), 346-8.
21. Kim, N. D.; Mehta, R.; Yu, W.; Neeman, I.; Livney, T.; Amichay, A.; Poirier, D.; Nicholls, P.; Kirby, A.; Jiang, W.; Mansel, R.; Ramachandran, C.; Rabi, T.; Kaplan, B.; Lansky, E., Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2002**, *71*, (3), 203-17.
22. Albrecht, M.; Jiang, W.; Kumi-Diaka, J.; Lansky, E. P.; Gommersall, L. M.; Patel, A.; Mansel, R. E.; Neeman, I.; Geldof, A. A.; Campbell, M. J., Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food* **2004**, *7*, (3), 274-83.
23. Chuu, C. P.; Chen, R. Y.; Kokontis, J. M.; Hiipakka, R. A.; Liao, S., Suppression of androgen receptor signaling and prostate specific antigen expression by (-)-epigallocatechin-3-gallate in different progression stages of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Lett* **2009**, *275*, (1), 86-92.
24. Torres, J. M.; Ruiz, E.; Ortega, E., Development of a quantitative RT-PCR method to study 5alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* **2003**, *56*, (1), 74-9.
25. Liao, S.; Hiipakka, R. A., Selective inhibition of steroid 5 alpha-reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, *214*, (3), 833-8.
26. Liang, T.; Liao, S., Inhibition of steroid 5 alpha-reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids. *Biochem J* **1992**, *285* (Pt 2), 557-62.
27. Hong, M. Y.; Seeram, N. P.; Heber, D., Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J Nutr Biochem* **2008**, *19*, (12), 848-55.
28. Matias, P. M.; Donner, P.; Coelho, R.; Thomaz, M.; Peixoto, C.; Macedo, S.; Otto, N.; Joschko, S.; Scholz, P.; Wegg, A.; Basler, S.; Schafer, M.; Egner, U.; Carrondo, M. A., Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem* **2000**, *275*, (34), 26164-71.
29. Pereira de Jesus-Tran, K.; Cote, P. L.; Cantin, L.; Blanchet, J.; Labrie, F.; Breton, R., Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci* **2006**, *15*, (5), 987-99.
30. Guo, Q.; Zhao, B.; Shen, S.; Hou, J.; Hu, J.; Xin, W., ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1427*, (1), 13-23.

31. Grossmann, M. E.; Mizuno, N. K.; Schuster, T.; Cleary, M. P., Punicic acid is an omega-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *Int J Oncol* **2010**, *36*, (2), 421-6.
32. Nicholson, D. W., Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **1999**, *6*, (11), 1028-42.
33. Zimmermann, K. C.; Bonzon, C.; Green, D. R., The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **2001**, *92*, (1), 57-70.
34. Reed, J. C., Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* **1995**, *7*, (6), 541-6.
35. Revelos, K.; Petraki, C.; Gregorakis, A.; Scorilas, A.; Papanastasiou, P.; Koutsilieris, M., Immunohistochemical expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy. *Anticancer Res* **2005**, *25*, (4), 3123-33.
36. Uzgare, A. R.; Isaacs, J. T., Enhanced redundancy in Akt and mitogen-activated protein kinase-induced survival of malignant versus normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* **2004**, *64*, (17), 6190-9.
37. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **1995**, *378*, (6559), 785-9.
38. Welsh, G. I.; Wilson, C.; Proud, C. G., GSK3: a SHAGGY frog story. *Trends Cell Biol* **1996**, *6*, (7), 274-9.
39. Roomi, M. W.; Ivanov, V.; Kalinovsky, T.; Niedzwiecki, A.; Rath, M., Anti-tumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, and epigallocatechin gallate on prostate cancer cell lines PC-3, LNCaP, and DU145. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **2004**, 115-116, 251-64.
40. Siddiqui, I. A.; Malik, A.; Adhami, V. M.; Asim, M.; Hafeez, B. B.; Sarfaraz, S.; Mukhtar, H., Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene* **2008**, *27*, (14), 2055-63.
41. Siddiqui, I. A.; Adhami, V. M.; Afaq, F.; Ahmad, N.; Mukhtar, H., Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* **2004**, *91*, (2), 232-42.
42. Brusselmans, K.; De Schrijver, E.; Heyns, W.; Verhoeven, G.; Swinnen, J. V., Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer* **2003**, *106*, (6), 856-62.
43. Hastak, K.; Gupta, S.; Ahmad, N.; Agarwal, M. K.; Agarwal, M. L.; Mukhtar, H., Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* **2003**, *22*, (31), 4851-9.
44. Gupta, S.; Ahmad, N.; Nieminen, A. L.; Mukhtar, H., Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **2000**, *164*, (1), 82-90.
45. Paschka, A. G.; Butler, R.; Young, C. Y., Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* **1998**, *130*, (1-2), 1-7.

46. Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Lee, R.; Feng, L.; Heber, D., Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, (3), 670-5.
47. Gil, M. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A., Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, (10), 4581-9.
48. Cerda, B.; Llorach, R.; Ceron, J. J.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A., Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr* **2003**, *42*, (1), 18-28.
49. de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C., Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, (11), 5331-7.
50. El-Shaarawy, M. I.; Nahapetian, A., Studies of pomegranate seed oil. *Fette Seifen Austrichmittel* **1983**, *85*, 123-126.
51. Poyrazoğlu, E.; Gökmen, V.; Artık, N., Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum L.*) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* **2002**, *15*, 567-575.

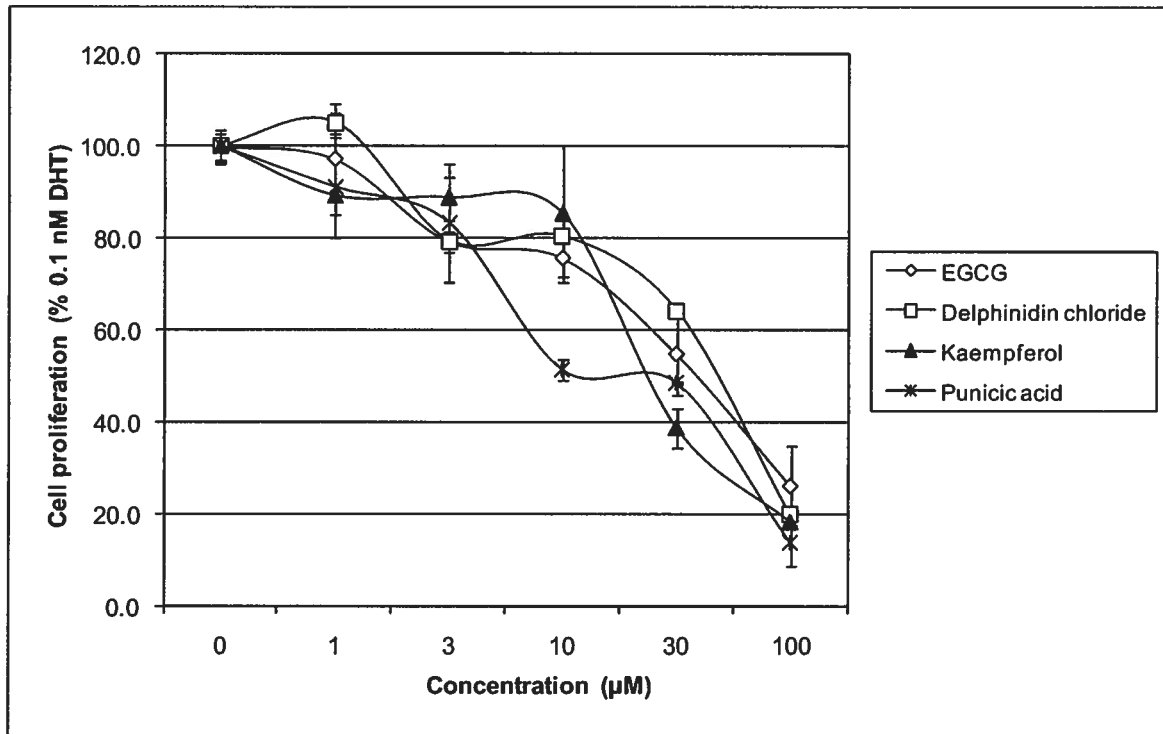


Fig 1

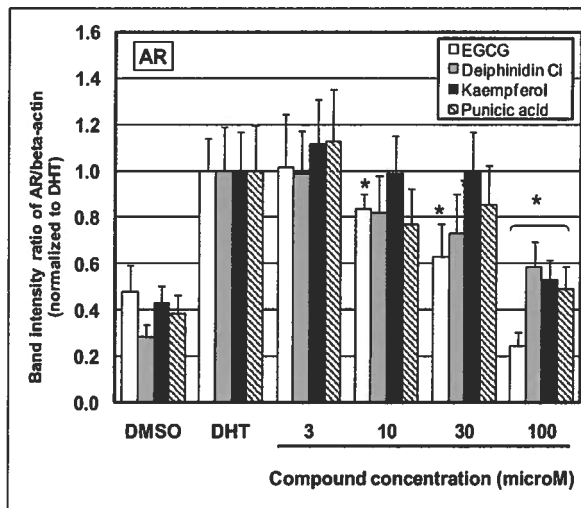
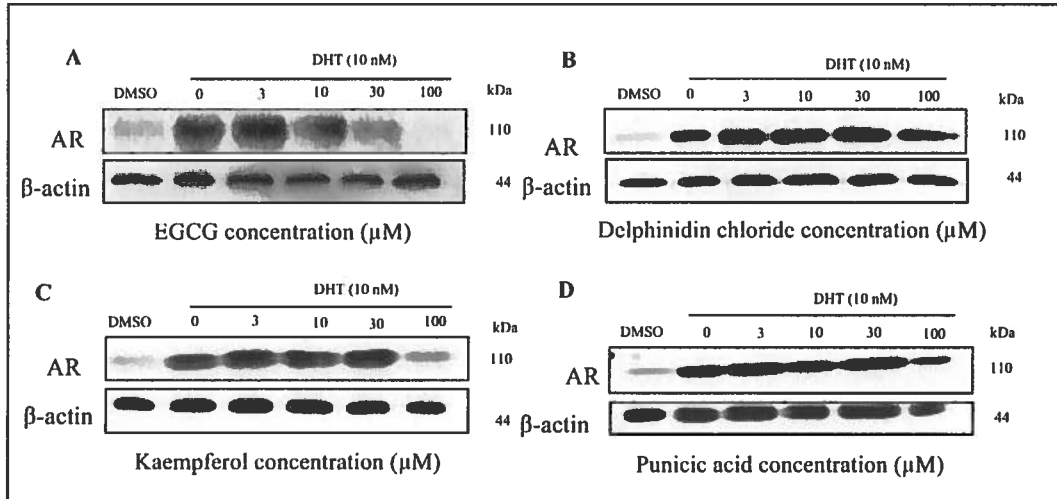


Fig 2

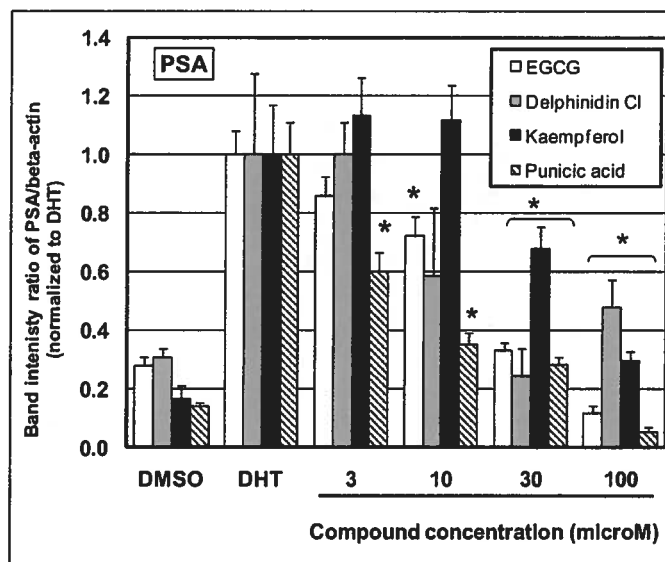
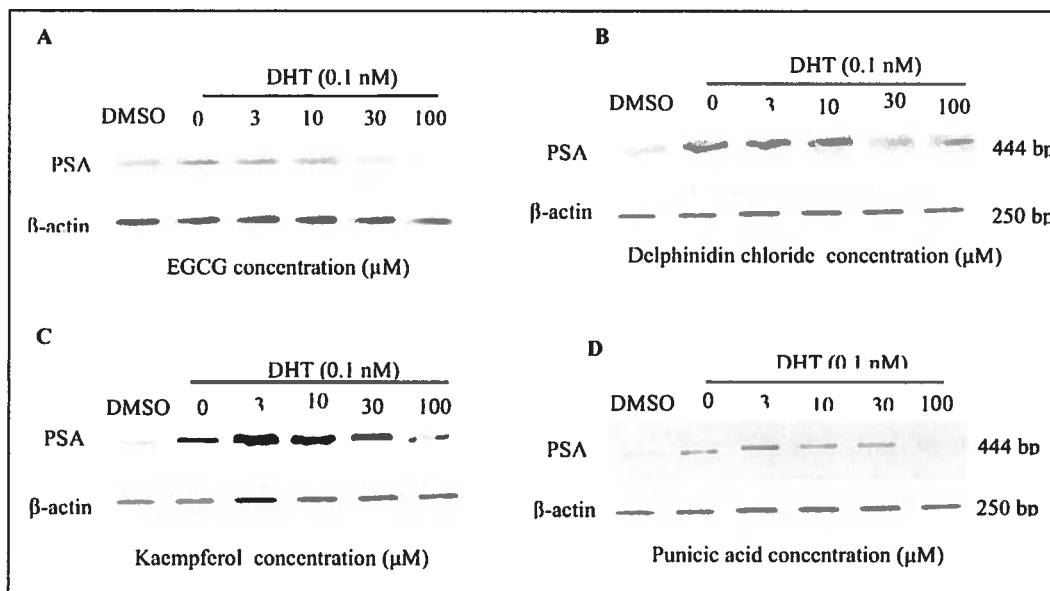


Fig 3

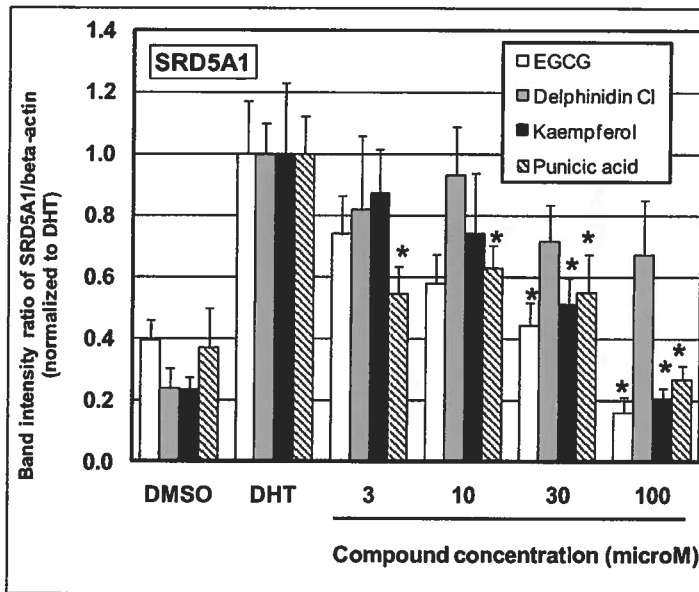
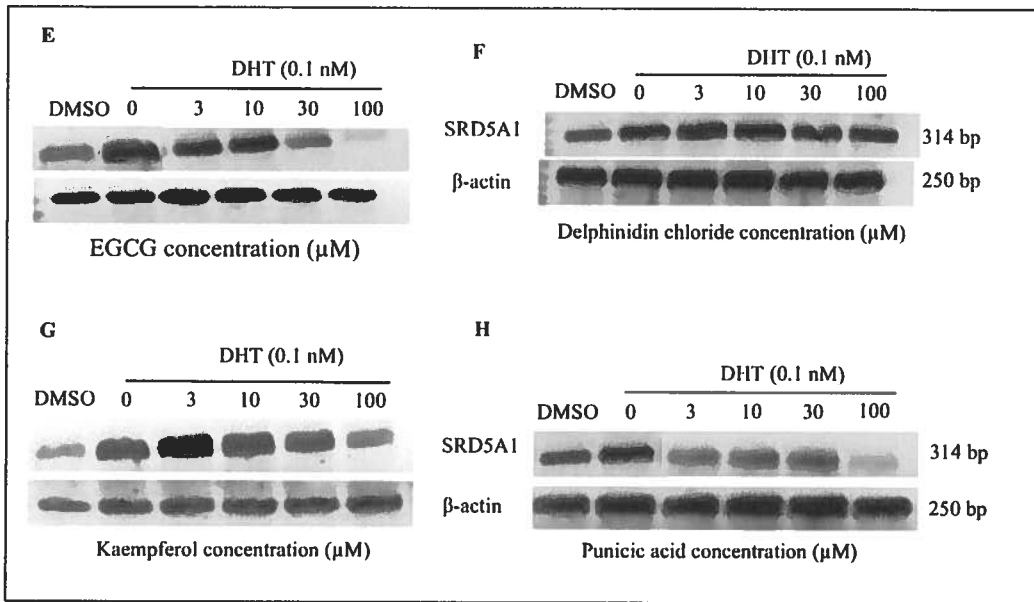


Fig 3 (suite)

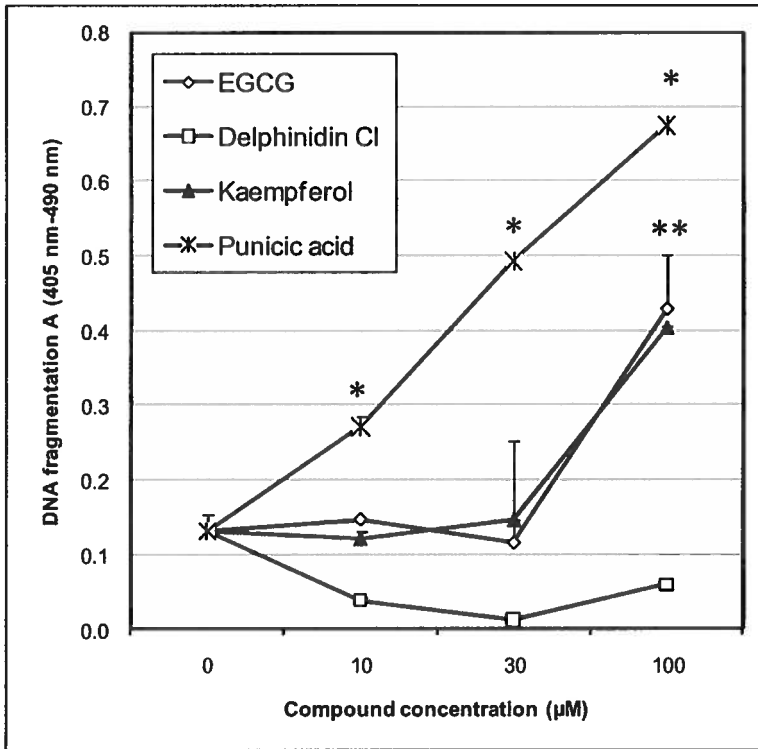


Fig 4

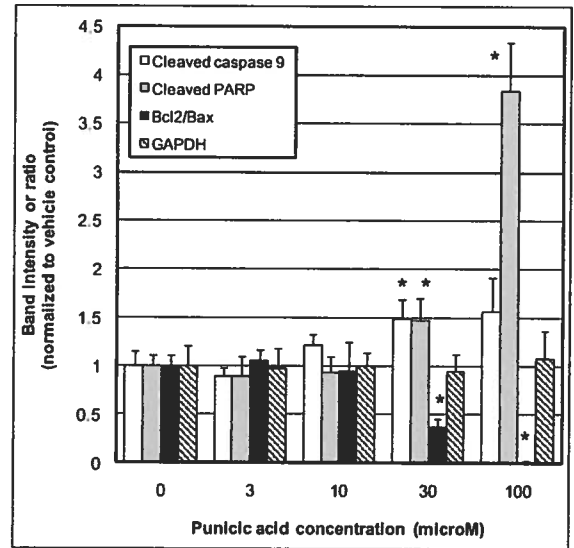
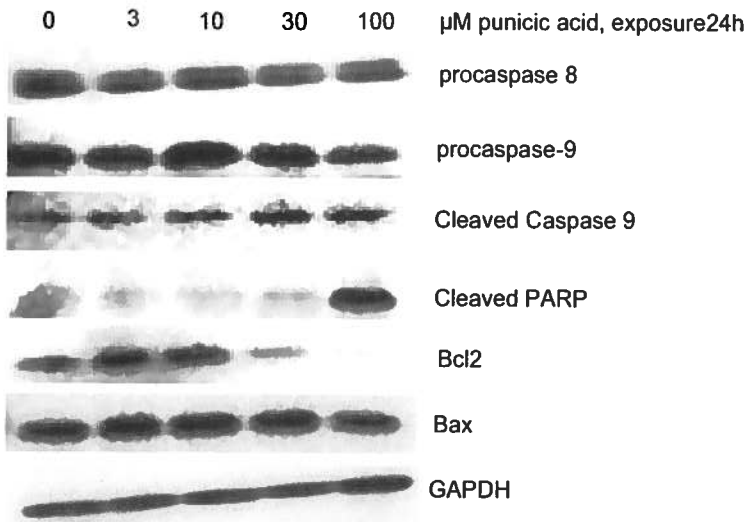


Fig 5

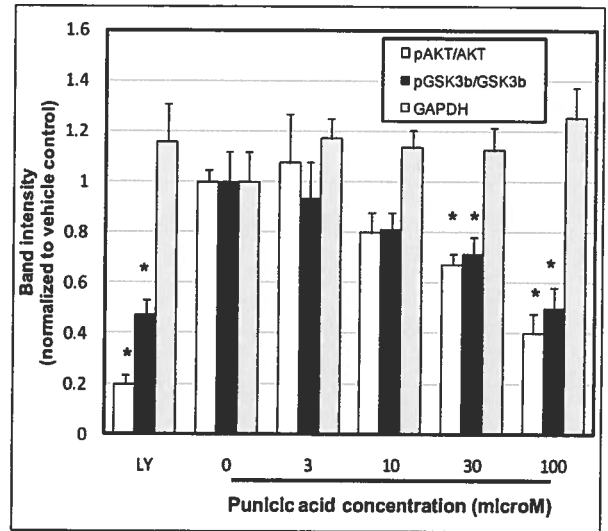
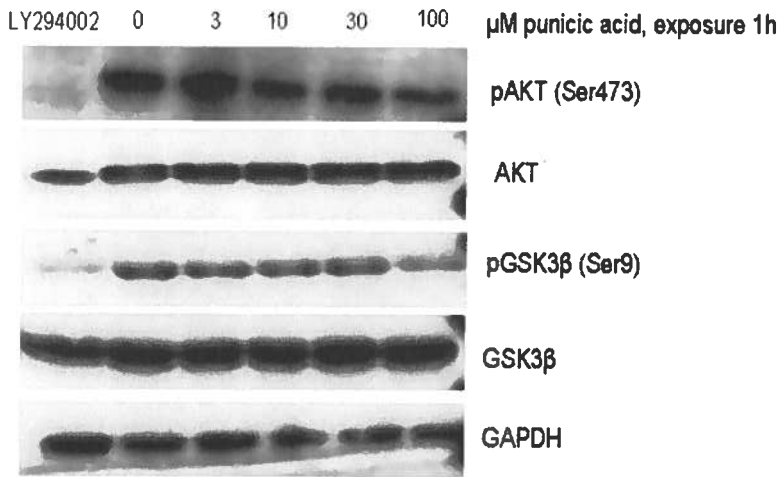


Fig 6

Figures legends

Figure 1. The effect of EGCG, delphinidin chloride, kaempferol and punicic acid on growth and survival of LNCaP cells. Cells were cultured with increasing concentrations of pomegranate compounds for 4 days (with a re-dosing after 48h, see section 2.3) in phenol red- and steroid-free medium in the presence of 0.1 nM of DHT and cell viability was determined by WST-1 assay. Negative control cells received 1 μ L of DMSO (and demonstrated negligible cell growth; about 2% of that of 0.1 nM DHT) and positive control cells were exposed to 1 μ L of DHT (0.1 nM) to stimulate cell growth. The average \pm SD of three independent experiments is shown. IC₅₀ values were calculated as described in section 2.7 and are listed in section 3.1.

Figure 2. Nuclear levels of AR protein. LNCaP cells were incubated with increasing concentrations of (A) EGCG, (B) delphinidin chloride (C) kaempferol or (D) punicic acid in phenol-red and steroid-free medium for 24h in the presence of 10 nM of DHT. Protein levels of AR in the nucleus were determined by immunoblot analysis. Equal loading of proteins was verified by stripping and reprobing the blots with β -actin antibodies. Negative control cells received 0.1 % DMSO and positive control cells were exposed to 10 nM of DHT in 0.1% DMSO to induce nuclear accumulation of AR. All treatments were normalized to the DHT control. The densitometric analyses to the right represent the mean \pm SD of three independent experiments, where an (*) indicates a statistically significant decrease in nuclear AR levels (one-way ANOVA, $p < 0.05$). An (*) above a bracket indicates all four treatments were significantly different from the DHT control.

Figure 3. RT-PCR analysis of the expression of androgen-dependent prostate marker genes (PSA and SRD5A1 respectively) in LNCaP cells treated with increasing concentration of EGCG (A, E) delphinidin chloride (B, F), kaempferol (C, G) or punicic acid (D, H) in phenol red- and steroid-free medium in the presence of DHT (0.1 nM) for 24h. Total RNA was extracted and levels of PSA and β -actin mRNA were determined by RT-PCR. Negative control cells received 0.1 % DMSO and positive control cells were exposed to 10 nM of DHT in 0.1% DMSO to induce nuclear accumulation of AR. All treatments were normalized to the DHT control. The densitometric analyses to the right each represent the mean \pm SD of three independent

experiments, where an (*) indicates a statistically significant decrease in either PSA or SRD5A1 expression levels (one-way ANOVA, $p < 0.05$). An (*) above a bracket indicates all four treatments were significantly different from the DHT control.

Figure 4. Apoptotic effects of EGCG, delphinidin chloride, kaempferol and punicic acid in LNCaP cells. Cells in complete culture medium were exposed to the four compounds for 24h. Apoptosis was determined by Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit. The combination of three independent experiences is shown. (*) Indicates statistically significant difference from vehicle control (one-way ANOVA, $p < 0.05$).

Figure 5. Punicic acid activates caspase-9 and mitochondrial apoptosis in prostate cancer cells. Concentration-dependent caspase-9 processing and cleavage of the caspase-3 substrate PARP after 24h treatment in LNCaP cells. One of three experiments is shown. The densitometric analyses to the right reflect the normalized average band intensities of all three experiments. (*) Significantly different from DMSO control, one-way ANOVA, $p < 0.05$.

Figure 6. Punicic acid decreased phosphorylation of Akt at Ser473 (active form) above 10 μM and that of GSK-3 β at Ser9 (inactive form) at 100 μM in LNCaP cells after a 1h exposure. The PI-3-kinase inhibitor LY294002 (30 μM) was used as positive control. One of three experiments is shown. The densitometric analyses reflect the normalized average band intensities of all three experiments. (*) Significantly different from DMSO control, one-way ANOVA, $p < 0.05$.

Table 1. The thirteen pomegranate compounds used in this study, their predominant localisation in the fruit and approximate concentrations.

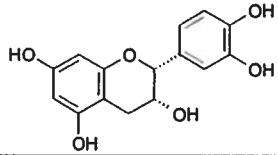
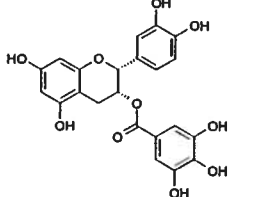
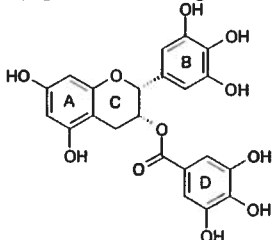
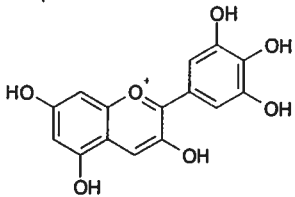
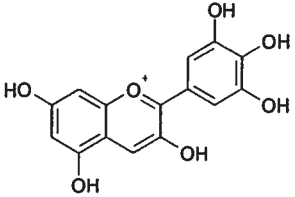
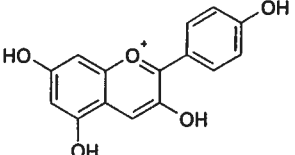
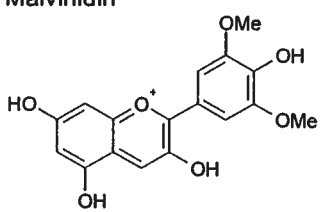
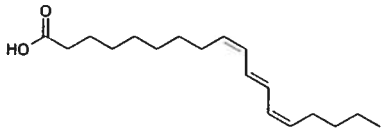
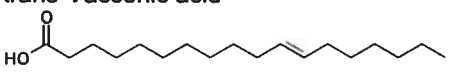
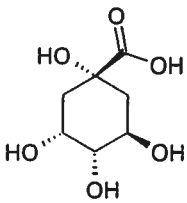
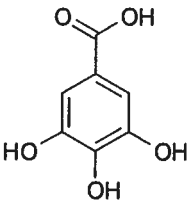
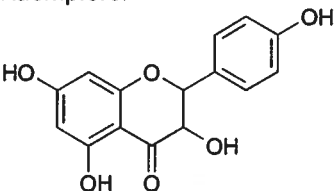
Pomegranate compound	Approximate concentrations	Source (12)	Reference
<p>Epicatechin</p> 	0.8 mg/L	Juice with peel	(49)
<p>Epicatechin gallate</p> 	1.6 mg/L	Juice with peel	(49)
<p>Epigallocatechin gallate</p> 	Quantitative data not available	Juice with peel, leaf	
<p>Delphinidin</p> 	237.8 mg/L (as glucosides)	Juice with peel	(47)
<p>Pelargonidin</p> 	5.9 mg/L (as glucosides)	Juice with peel	(47)
<p>Cyanidin</p> 	181.3 mg/L (as glucosides)	Juice with peel	(47)

Table 1 continued

<p>Malvinidin</p> 	Quantitative data not available	Juice with peel	
<p>Punicic acid</p> 	67-80% of all fatty acids	Seed oil	(50)
<p>cis-Vaccenic acid</p>	Quantitative data not available	Seed oil	
<p>trans-Vaccenic acid</p> 	Quantitative data not available	Seed oil	
<p>Quinic acid</p> 	0.02–6.72 g/L	Juice with peel	(51)
<p>Gallic acid</p> 	Quantitative data not available	Juice, peel flower	
<p>Kaempferol</p> 	Quantitative data not available	Juice, leaf	

3.2 CHAPITRE II: L'acide jacarique et ses géoisomères octadécatriénoïques induisent l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate humaine, une étude mécanistique de la relation structure/activité en 3-D

3.2.1 Traduction du résumé de l'article

Les acides gras non-essentiels provenant des plantes sont des nutriments alimentaires importants. Certains ont été identifiés comme ayant des propriétés chimopréventives contre différents cancers comprenant le cancer de la prostate. Dans cette étude, nous avons déterminé l'effet cytotoxique et apoptotique de sept acides gras C-18 sur différents types de cellules cancéreuses humaines. Ces acides gras comprennent l'acide jacarique et punique présents dans le jacaranda et l'huile des graines de la grenade, respectivement, trois géoisomères octadécatriénoïques (l'acide *alpha*- et *bé*ta-calendique et l'acide catalpique) et deux acides gras C-18 mono-insaturés (l'acide *trans*- et *cis*-vaccenique). L'acide jacarique et quatre de ces géoisomères octadécatriénoïques induisent sélectivement l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate hormono-dépendantes (LNCaP) et hormono-indépendantes (PC-3). En revanche, ils n'affectent pas la viabilité des cellules épithéliales normales de la prostate (RWPE-1). L'acide jacarique induit la mort des cellules LNCaP de façon concentration- et temps-dépendants, en activant la voie apoptotique intrinsèque et extrinsèque. Il en résulte le clivage de PARP-1, la modulation de la famille de protéines pro- et anti-apoptotique Bcl-2 et une augmentation du clivage de la caspase-3, -8 et -9. De plus une activation de la voie de signalisation de la mort cellulaire impliquant le récepteur de mort cellulaire 5 a été observée. En revanche, l'acide jacarique induit l'apoptose dans les cellules PC-3 via l'activation de la voie intrinsèque seulement. La conformation spatiale *cis*, *trans*, *cis* de l'acide jacarique et de l'acide punique joue un rôle clé dans l'augmentation de l'efficacité de ces deux acides gras en comparaison aux cinq autres acides gras C-18 testés. Des analyses conformationnelles et tridimensionnelles utilisant la base de données PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) montrent que la capacité cytotoxique des acides gras C-18 est liée à leur degré de similarité conformationnelle vis-à-vis du composé cytotoxique de référence, l'acide punique. Ces similarités sont basées sur une forme optimisée (ST) et des scores de similarité (CT).

L'acide jacarique étant le plus proche biologiquement de l'acide punique (STST-opt = 0.81; CTCT-opt = 0.45). Cette analyse 3-D de la similarité entre les structures nous a permis de classer les acides gras géo-isomériques en fonction de leur potentiel cytotoxique. Contrairement à une évaluation 2-D de la position de la structure *cis/trans* qui ne le permet pas. Nos résultats mécanistiques montrent que les acides gras non-essentiels provenant de l'alimentation, ont des propriétés biologiques et chémopréventives. De plus, ils présentent une relation structure-activité en 3-D qui peut être exploitée afin de développer de nouvelles stratégies pour la prévention et le traitement du cancer de la prostate et cela indépendamment de la sensibilité aux hormones.

3.2.2 Contribution de l'étudiante

Toutes les expériences ainsi que la rédaction du manuscrit ont été réalisées par le premier auteur de l'article. L'analyse 3-D a été réalisée par le Dr Thomas Sanderson.

3.2.3 Jacaric acid and its octadecatrienoic acid geoisomers induce apoptosis selectively in cancerous human prostate cells: a mechanistic and 3-D structure-activity study

Jihane Gasmi and J. Thomas Sanderson

Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Institut Armand-Frappier, Université du Québec,

Laval, Québec, Canada

Corresponding author:

J. Thomas Sanderson, PhD

INRS-Institut Armand-Frappier

531 blv des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Phone: (450) 687-5010 ext 8819 / Fax: (450) 686-5309

E-mail: thomas.sanderson@iaf.inrs.ca

Phytomedicine 2013 Feb 27.

Abstract

Plant-derived non-essential fatty acids are important dietary nutrients, and some are purported to have chemopreventive properties against various cancers, including that of the prostate. In this study, we determined the ability of seven dietary C-18 fatty acids to cause cytotoxicity and induce apoptosis in various types of human prostate cancer cells. These fatty acids included jacaric and punicic acid found in jacaranda and pomegranate seed oil, respectively, three octadecatrienoic geometric isomers (*alpha*- and *beta*-calendic and catalpic acid) and two mono-unsaturated C-18 fatty acids (*trans*- and *cis*-vaccenic acid). Jacaric acid and four of its octadecatrienoic geoisomers selectively induced apoptosis in hormone-dependent (LNCaP) and -independent (PC-3) human prostate cancer cells, whilst not affecting the viability of normal human prostate epithelial cells (RWPE-1). Jacaric acid induced concentration- and time-dependent LNCaP cell death through activation of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways resulting in cleavage of PARP-1, modulation of pro- and antiapoptotic Bcl-2 family of proteins and increased cleavage of caspase-3, -8 and -9. Moreover, activation of a cell death-inducing signalling cascade involving death receptor 5 was observed. Jacaric acid induced apoptosis in PC-3 cells by activation of the intrinsic pathway only. The spatial conformation *cis*, *trans*, *cis* of jacaric and punicic acid was shown to play a key role in the increased potency and efficacy of these two fatty acids in comparison to the five other C-18 fatty acids tested. Three-dimensional conformational analysis using the PubChem Database (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) showed that the cytotoxic potency of the C-18 fatty acids was related to their degree of conformational similarity to our cytotoxic reference compound, punicic acid, based on optimized shape (ST) and feature (CT) similarity scores, with jacaric acid being most 'biosimilar' ($ST^{ST-opt} = 0.81$; $CT^{CT-opt} = 0.45$). This 3-D analysis of structural similarity enabled us to rank geoisomeric fatty acids according to cytotoxic potency, whereas a 2-D positional assessment of *cis/trans* structure did not. Our findings provide mechanistic evidence that nutrition-derived non-essential fatty acids have chemopreventive biological activities and exhibit 3-D structure-activity relationships that could be exploited to develop new strategies for the prevention or treatment of prostate cancer regardless of hormone dependency.

Keywords

Prostate cancer; jacaric acid; punicic acid; geoisomers; 3-D conformation; structure-activity; apoptosis; intrinsic; extrinsic; death receptor; PubChem Compound Database.

Background

Prostate cancer has become the most frequently diagnosed and the second leading cause of cancer-related deaths among men in western countries. It is estimated that in the year 2012, over 241 thousand new cases will be diagnosed and more than 28 thousand men will die from prostate cancer in the United States alone (Siegel et al., 2012). Early stage prostate cancer is often androgen-dependent but if not successfully treated may progress to a hormone-independent form that is difficult to treat and results in increased mortality. Thus developing novel treatment options for prostate cancer at various stages has become an important medical need. Particularly the use of safe and effective chemopreventive agents could significantly reduce disease-related mortality. The focus of much research has been on discovery of natural compounds that may be used in the prevention of prostate cancer.

It has been shown that apoptosis may be induced or inhibited by a variety of nutritional compounds known to have health benefits including fatty acids (Yasui et al., 2006a; Yasui et al., 2006b; Yasui et al., 2005). Many plant seed oils contain conjugated trienoic fatty acids in the form of conjugated linolenic acids (Liu et al., 1997). Most conjugated fatty acids are 18-carbon compounds originating from oleic, linoleic, linolenic and stearidonic acids. They occur in terrestrial plant lipids, especially seed oils, and include dienes, trienes and tetraenes.

The fact that high amounts of naturally occurring conjugated fatty acids such as conjugated linolenic acids, which are geometric and positional isomers of linolenic acid, are present in certain plant seed oils (Chisholm and Hopkins, 1967) indicates these fatty acids are far more available for dietary purposes than previously thought. For example, *alpha*-calendic and jacaric acid are contained in relatively high amounts in pot marigold seed oil (62.2%) and blue jacaranda seed oil (36%), respectively (Takagi and Itabashi, 1981).

In this study we examined the ability of seven dietary C-18 fatty acids to induce apoptosis in human hormone-dependent LNCaP and hormone-independent PC-3 prostate cancer cells, as well as immortalized normal prostate epithelial cells (RWPE-1). We choose two isomers of oleic acid (*trans*-vaccenic and *cis*-vaccenic acid) and five isomers of linolenic acid (jacaric, puniic, *alpha*-calendic, *beta*-calendic and catalpic acid), to determine possible (geo)isomeric differences in induction of cytotoxicity of prostate cancer cells.

Materials and methods

Reagents

Jacaric, punicic, *alpha*-calendic, *beta*-calendic, catalpic, and *trans*- and *cis*-vaccenic acid were purchased from Larodan Fine Chemicals AB (Malmö, Sweden) (Table 1). All compounds were dissolved in DMSO as 1000-fold concentrated stock solutions. Punicic acid was used as positive control since we previously showed it to induce apoptosis in LNCaP cells (Gasmi and Sanderson, 2010).

Antibodies against Bcl-2, Bax, cleaved caspase 8 (Asp 391), caspase 9, caspase 3, cleaved PARP (Asp 214), Bad, phospho Bad (Ser136), Bid, FasL, Fas and FADD were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Antibodies against death receptors DR4 and DR5 were purchased from Millipore (Billerica, MA). Anti- β -actin was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Cell culture

LNCaP, PC3 and RWPE-1 (immortalized normal adult prostate epithelial cells) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, United States). LNCaP and RWPE-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% HEPES, 1% sodium pyruvate and penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. PC-3 cells were grown in 1:1 (v/v) Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F-12 nutrient mix (DMEM/F12) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin.

Cell viability

LNCaP, PC-3 and RWPE-1 cells were seeded in 96-well plates (Fisher Scientific, Ottawa, ON) at a concentration of 1×10^4 cells/well in 100 μ l of their respective complete culture medium for 24h. Cells were then exposed to the fatty acids (1, 3, 10, 30 and 100 μ M) for 24h; DMSO solvent (0.1%) was used as negative control (0 μ M). A WST-1 cell viability assay (Roche Diagnostics, Laval, QC) was performed according to the manufacturer's instruction. Absorbance was measured at 440 nm using a Spectramax M5 multifunctional spectrometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). LDH leakage as a measure of cell membrane integrity and possible indicator of necrosis, was also assessed using a Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics).

Measurement of apoptosis

LNCaP and PC-3 cells were seeded at a concentration of 0.5×10^4 cells/well in 100 μ l of complete culture medium in 96-well plates for 24h. The fatty acids (0, 3, 10, 30 and 100 μ M) were added and the cells were incubated for an additional 24h. A Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics) was used following the manufacturer's instructions. The assay is a quantitative immunoassay that detects the histone-associated DNA fragments produced during apoptosis.

Western blot analysis

Western blot analysis was carried out according to a previous study (Gasmi and Sanderson). Cells were seeded in 6-well CellBind plates (Fisher Scientific) in complete culture medium for 24h. Cells were then exposed to fatty acids (0, 1, 3 and 10 μ M) for 24h. Adherent cells were collected using a cell scraper, then rinsed in cold phosphate-buffered saline (PBS) three times followed by centrifugation at 700 g for 5 min. After removing the PBS, the cell pellets were lysed in RIPA buffer containing 1 \times protease and phosphatase inhibitor cocktail. Then, cell lysates were centrifuged at 4°C, 15000 rpm for 15 min and protein concentrations (from the supernatant) were determined using a BCA protein assay kit (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL). Proteins (50 μ g) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and then transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad, Mississauga, ON). After blocking with 5% non-fat dry milk reconstituted in Tris-buffered saline (TBS), the membranes were incubated with appropriate primary antibodies at 1:250 to 1:1000 dilutions in TBS overnight at 4°C. Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase at 1:5000 dilution in TBS were added for 1h at room temperature. Antibody-antigen complexes were visualized by Immobilon Western Chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore) using a Versadoc imaging system (BioRad). *Beta-actin* was used as protein loading control.

Fluorescence microscopy

LNCaP and PC-3 cells were seeded in 24-well CellBind plates (Fisher Scientific) in complete culture medium for 24h. Cells were then exposed to jacaric acid (0, 3, 10, 30 and 100 μ M) for 0, 4, 6, 8 and 24h. Propidium iodide and Hoechst 33342 were added to each well (1 μ g/well) and cells were incubated at 37°C for 10 min and then inspected by fluorescence microscopy. Images were collected with a Nikon Eclipse TE2000 inverted fluorescence microscope under 20 \times magnification. A filter cube with an excitation wavelength range of 330-380 nm was used to visualize Hoechst-stained cells. Cells

stained with propidium iodide were visualized using a filter cube with an excitation wavelength of 532-587 nm.

Statistical analyses

All treatments were performed in triplicate per experiment and each experiment was performed three times independently. Statistically significant differences (* $p < 0.05$) were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey *posterior* test. Correlation coefficients were calculated by the method of Pearson (Zar, 1999). The concentrations at which 50% inhibition of cell viability occurred (IC_{50} values) were calculated using non-linear curve-fit analysis and presented as means \pm 95% confidence intervals of three independent experiments. The relationship between optimized similarity values and IC_{50} values were evaluated by one-phase exponential decay curve fitting (commonly used to describe the process of dissociation of a compound from a biological target). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Structure conformational analyses

Structure conformational analyses were performed using the three-dimensional (3-D) analysis capabilities of the PubChem Compound Database developed by the U.S. National Institutes of Health (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Bolton et al., 2011a). The first ten most diverse conformations (of which the first is the theoretically most energy-minimized conformation in a vacuum) (Bolton et al., 2011b; Hawkins et al., 2010) of each fatty acid were compared to those ten of punicic acid, which was chosen as reference molecule (Gasmi and Sanderson, 2010). The two types of resultant similarity scores (we use the terminology of (Bolton et al.) throughout), ST (shape-Tanimoto) and CT (color-Tanimoto), representing ‘shape-similarity’ based on overlap of molecular volume and ‘feature-similarity’ based on alignment of ‘compatible’ functional groups, respectively, were used to evaluate the degree of similarity of the fatty acids to punicic acid. The ST and CT values obtained for all conformational pairs of each pair-wise fatty acid comparison were evaluated for highest ST score (ST-optimized or ST^{ST-opt}), highest CT score (CT-optimized or CT^{CT-opt}) or highest combined score ($ComboT^{(ST+CT)opt}$) which is simply the highest ranking sum of ST and CT values. Two other possible comboT scores are the sum of ST^{ST-opt} and CT^{ST-opt} ($ComboT^{ST-opt}$) or the sum of CT^{CT-opt} and ST^{CT-opt} ($ComboT^{CT-opt}$). In our analyses, the $ComboT^{(ST+CT)opt}$ value obtained for each pair-wise fatty acid comparison was the same as the $ComboT^{ST-opt}$ value and this latter term is used throughout.

Conformation-specific intra- and intermolecular distances (Å) between atoms were determined using PubChem 3D Viewer (Bolton et al., 2011a).

Results

Octadecatrienoic acids decrease viability of prostate cancer cells but not of normal cells

Five conjugated octadecatrienoic acids caused a concentration-dependent decrease in the viability of LNCaP and PC-3 cells, but not of RWPE-1 immortalized normal epithelial cells. These were, in order of decreasing potency, puniic, jacaric, *beta*-calendic, catalpic and *alpha*-calendic acid (Fig. 1), with IC₅₀ values (mean ± SEM) of 9.0 ± 1.2, 11.8 ± 1.0, 14.8 ± 1.1, 25.7 ± 1.9 and 36.3 ± 3.9 μM, respectively in LNCaP cells. In PC-3 cells, puniic, jacaric, *beta*-calendic, catalpic and *alpha*-calendic acid had IC₅₀ values of 1.6 ± 0.3, 2.2 ± 0.4, 3.5 ± 0.6, 5.2 ± 0.9 and 8.8 ± 1.2 μM, respectively. These IC₅₀ values were strongly linearly correlated between LNCaP and PC-3 cells ($r = 0.990$, $n = 5$; $p < 0.01$) with a slope of 0.25 ± 0.021 indicating a 4-fold difference in sensitivity between the cell types to octadecatrienoic fatty acid-induced cell death. Jacaric acid, together with puniic acid as we had previously shown (Gasmi and Sanderson, 2010), were the most cytotoxic octadecatrienoic acids in LNCaP and PC-3 cells, whereas the mono-unsaturated *cis*- and *trans*-vaccenic acid did not affect cell viability in any of the cell lines.

Jacaric acid induces time- and concentration-dependent apoptosis and necrosis of LNCaP and PC-3 cells

To assess whether the octadecatrienoic acid-mediated decrease in cell viability was due to induction of apoptosis as we had shown previously for puniic acid (Gasmi and Sanderson, 2010), DNA fragmentation in LNCaP and PC-3 cells was measured after a 24h exposure to jacaric, puniic, *alpha*-calendic, *beta*-calendic and catalpic acid in complete culture medium. A significant increase of DNA fragmentation was caused by jacaric acid (and our positive control, puniic acid) in LNCaP and PC-3 cells at concentrations above 10 μM (Fig. 2). Although an observed increase in DNA fragmentation is an indication of apoptotic cell death it does not preclude necrosis as a contributing mechanism. We found that puniic acid at 10 and 30 μM caused a significant increase of LDH leakage from LNCaP and PC-3 cells into culture medium (not shown), a measure of cell membrane integrity and indicator of necrosis, whereas jacaric acid did not. To avoid the influence of necrotic cell death, jacaric acid was selected for further analysis of octadecatrienoic acid-mediated apoptotic cell death. Jacaric acid caused a concentration- and time- dependent increase of condensed nuclei observed by Hoechst33342 staining in LNCaP and PC-3 cells, resulting in about 50% apoptotic cell death after a 24h exposure to 10 μM in each cell line (Fig. 3). Detailed morphological analysis by fluoroscopy showed

that at concentrations of jacaric acid of 30 μM or above, more necrosis than apoptosis was observed with each cell line, as determined by propidium iodide staining (Fig. 4). Based on these observations, we decided to continue our investigations of the activation of the apoptotic machinery by jacaric acid using concentrations of 10 μM and below and an exposure time of 24h, to avoid influence of necrotic effects.

Jacaric acid induces intrinsic apoptosis of PC-3 cells and intrinsic and extrinsic apoptosis of LNCaP cells

A reduction of Bcl-2 expression by jacaric acid was seen at 10 μM indicating that disintegration of mitochondrial structures had occurred resulting in initiation of the apoptotic pathway in LNCaP cells. Jacaric acid (1-10 μM) increased poly ADP ribose polymerase-(PARP)-1 cleavage concentration-dependently in both LNCaP and PC-3 prostate cancer cells after a 24h exposure. Jacaric acid also caused a strong concentration-dependent increase in cleaved caspase-9 in both LNCaP and PC-3 cells. Jacaric acid concentration-dependently increased levels of cleaved caspase-8 in LNCaP cells indicating involvement of the extrinsic apoptotic pathway in this prostate cancer cell line (Fig. 5). Activation of FADD and p15 Bid at 3 and 10 μM (Fig. 6) and involvement of caspase-8 prompted us to examine whether death receptors played a role in jacaric acid-induced LNCaP cell death. Indeed, jacaric acid increased protein expression of DR5 at 1, 3 and 10 μM but did not influence steady-state levels of other TNF receptors such as DR4 and Fas (Fig. 6).

Structure-activity analysis

In structure-activity analysis the aim is to relate the biological activity of compounds to their molecular structural properties. The five geoisomeric octadecatrienoic fatty acids in our study differed 3- to 5-fold in cytotoxic potency yet have identical physico-chemical properties such as hydrophobicity ($X\log P_3 = 6.6 \pm 0.22$), acid dissociation constant ($\text{pK}_a = 4.78 \pm 0.1$) and polar surface area (37.3 \AA), as well as identical measures of flexibility such as thirteen rotatable bonds. However, a key difference among geoisomers is their three-dimensional orientation and the differential influence this would have on a putative 3-D interaction with a cellular target macromolecule, thus potentially explaining differences in cytotoxic potencies. We used this pharmacophore hypothesis to suggest that it is the orientations of carboxylic acid group and hydrophobic carbon chain that are key to the biological activities of the C-18 fatty acids. We performed a 3-D conformational analysis using the 3-D tools provided by the PubChem Compound Database to obtain quantitative measures of overlap of structural shape and features among our seven C-18 fatty acids (Table 2). Punicic acid, being the most cytotoxic compound, was used as reference to which the degree of 3-D similarity of the other 6 fatty acids was

determined. This analysis showed that jacaric and punicic acid were able to attain 3-D conformations with the closest structural and functional resemblance to each other (Fig. 7A), whereas the structure of *cis*-vaccenic acid was most divergent from that of punicic acid (Fig. 7B). A correlation existed between the IC₅₀ values of the octadecatrienoic acids and the optimal combined structural similarity values (ComboT^{ST-opt}) for shape (ST) and feature (CT) overlap with punicic acid (Table 2) in LNCaP cells ($r = -0.870$; $n = 4$; $p = 0.08$) and PC-3 cells ($r = -0.854$; $n = 4$; $p = 0.12$). As there is no reason to suppose that cytotoxic potency is linearly dependent on optimized similarity scores, we performed a statistically more informative non-linear correlation analysis and determined that cytotoxic potency was lost exponentially with decreasing ComboT^{ST-opt}, ST^{ST-opt} or CT^{CT-opt} value in either cell line and that lower plateau values for ComboT^{ST-opt}, ST^{ST-opt} and CT^{CT-opt} were approximated to be 0.97, 0.74 and 0.28, respectively ($r^2 > 0.998$; $n = 5$; each cell line).

Discussion

It has become increasingly clear that altered apoptotic signalling plays an important role during tumour development and resistance to prostate cancer therapies. Thus, the search for possible therapeutic strategies involving the modulation of various apoptotic pathways has attracted considerable interest in recent years. Natural compounds have received increasing attention as possible leads for the development of chemopreventive agents for treatment of prostate cancer. Indeed, some naturally occurring conjugated fatty acids act as growth inhibitors and inducers of apoptosis of breast and colon cancer cells (Suzuki et al., 2006; Yasui et al., 2006a; Yasui et al., 2006b; Yasui et al., 2005).

Octadecatrienoic acid-induced apoptosis in prostate cancer cells

We are the first to show that five octadecatrienoic fatty acids, jacaric, punicic, *alpha*-calendic, *beta*-calendic and catalpic, but not two octadecaenoic (*trans* and *cis*-vaccenic) fatty acids (Table 1), have growth inhibitory effects (Fig.1) in androgen-dependent LNCaP and androgen-independent PC-3 human prostate cancer cells. Furthermore, these fatty acids were selective for tumorigenic cells, as they did not affect the viability of immortalized, proliferating normal prostate epithelial RWPE-1 cells.

Jacaric acid, a natural fatty acid derived from jacaranda seed oil, is a potent and selective inducer of apoptosis in hormone sensitive and hormone refractory prostate cancer cells. Decreased cell viability by jacaric acid (Fig. 1 and 3) was associated with significantly increased DNA fragmentation (Fig. 2), chromatin condensation (Fig. 4) and cleavage of PARP-1 (Fig. 5), indicating that apoptosis is an important part of the mechanism by which jacaric acid inhibits the growth of both types of prostate cancer cells, in the absence of necrotic cell death, particularly at concentrations of 10 μ M and below.

Furthermore, by performing detailed concentration- and time-response experiments (Fig. 3 and 4), we could differentiate between apoptotic and necrotic cell death induced by jacaric acid. This allowed us to evaluate, specifically, the early-stage apoptotic mechanisms of jacaric acid-induced prostate cancer cell death within a concentration and time range that avoided non-selective necrosis of cells caused by concentrations that would be both mechanistically and dietarily irrelevant. Although little is known about dietary blood concentrations and fate of jacaric acid and its geometric isomers, a few investigations of the absorption and metabolism of *alpha*-eleostearic (9Z,11E,13E-octadecatrienoic) and punicic acid have been done in rats (Tsuzuki et al., 2006; Tsuzuki et al., 2004; Yuan et al., 2009). Those studies found that the majority of these two fatty acids was slowly absorbed in an unchanged state in rat intestine and that part of each absorbed fatty acid was converted into 9Z, 11E-octadecadienoic acid, although this conversion was slower for punicic acid (Tsuzuki et al., 2006). In the case of *alpha*-eleostearic acid, which was administered as the major constituent (68.9%) of 1 g of tung oil, both intact and converted product were found in blood plasma and liver 6 h after administration, with *alpha*-eleostearic acid levels reaching about 500 and 900 μ M, respectively (Tsuzuki et al., 2004).

The present study reports for the first time, sensitivity of LNCaP cells to TRAIL receptor DR5-mediated extrinsic apoptosis by jacaric acid (Fig. 6). LNCaP cells are considered to be relatively resistant to TRAIL-induced extrinsic apoptosis (Chen et al., 2001) but may be sensitized by combined exposure to TRAIL and certain chemotherapeutic agents (Voelkel-Johnson et al., 2002) or natural compounds (Shankar et al., 2007). The mechanisms by which TRAIL-resistance may be overcome include inhibition of mRNA synthesis (Chen et al., 2001), Akt signalling (Chen et al., 2001) and proteasome function (Christian et al., 2009). Possible mechanisms by which jacaric acid increases DR5-mediated apoptosis are currently under investigation.

Interestingly, we show that PC-3 cells, which are considered to be more sensitive to TRAIL-induced extrinsic apoptosis than LNCaP cells (Chen et al., 2001), are also more sensitive to jacaric acid-induced apoptotic cell death, although not via the extrinsic pathway. One possibility is that jacaric acid acts on a target to overcome resistance to DR5-mediated apoptosis in LNCaP cells that does not (or to a lesser extent) play a role in PC-3 cells. This target could be the unique mechanism of cross-talk between the Akt and androgen receptor (AR) signalling pathways, which conveys a certain degree of resistance to LNCaP cell apoptosis by maintaining levels of survival-related signaling molecules, importantly those of p21 (Gartel, 2009; Gorospe et al., 1997), which is AR-regulated (Kadowaki et al., 2011). This cross-talk mechanism does not exist in AR negative PC-3 cells. Akt is known to be

constitutively active in LNCaP cells and we found it to be inhibited by puniic acid (Gasmi and Sanderson, 2010), although whether this led to caspase 8 activation was not determined. Another important protein lacking in PC-3 cells is p53, which is expressed functionally in LNCaP cells. However, we did not find jacaric or puniic acid to increase p53 activity or its phosphorylation at serine-15 in LNCaP cells (not shown); nor did they increase Bax or Fas in LNCaP cells (Fig. 5) as would be expected (Li et al., 2003). It is possible that the increased sensitivity of PC-3 cells to our fatty acids is in part due to absence of p53 expression, whereas in LNCaP cells functional p53 protein may give those cells more opportunity for repair, thus rendering them more resistant to apoptosis, (Scott et al., 2003). RWPE-1 cells also contain wild type p53 yet were not susceptible to jacaric acid-induced apoptotic cell death, suggesting in line with other studies (Skjoth and Issinger, 2006) that p53 status is not the major determinant of sensitivity to chemical-induced cell death. The exact criteria that influence p53 to stimulate cell cycle arrest and DNA repair or apoptosis (extrinsic or intrinsic) are still not well understood and whether p53 plays a permissive or restrictive role (or any role) in jacaric acid-induced apoptosis in our prostate cancer cell lines warrants further studies.

In any case, the greater sensitivity of PC-3 cells to jacaric acid-induced apoptosis, where extrinsic apoptosis does not play a role, is clearly related to the ability of this fatty acid to disrupt mitochondrial function. How the relative balance of prosurvival and proapoptotic signals ultimately contributes to the sensitivity or resistance of LNCaP and PC-3 cells to undergo apoptosis by either extrinsic or intrinsic apoptosis is a complex and not fully understood process.

The ability of jacaric acid to activate intrinsic apoptosis in both LNCaP and PC-3 prostate cancer cells may be related to increased lipid peroxidation as observed by Shinohara and coworkers in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells (Shinohara et al., 2012), alteration of cellular fatty acid composition or altered regulation of expression of certain genes (Hockenbery et al., 1990). It has been reported that overexpression of Bcl-2 in transgenic models leads to protection of many cell types against apoptosis induced by a variety of oxidative stresses, including lipid peroxidation (Hague et al., 1997; Pourzand et al., 1997; Reed, 1994). Studies have also shown an elevated expression of Bcl-2 in neoplastic human prostate tissues (Colombel et al., 1993) and since jacaric acid, as well as puniic acid (Gasmi and Sanderson, 2010), inhibit Bcl-2 expression in LNCaP cells (Fig. 6), they act as antineoplastic agents in these prostate cancer cells.

Structure-activity relationships of octadecatrienoic acids

Jacaric and puniic acid stand out from the other linolenic acid isomers as the most potent cytotoxic agents and their effectiveness is evidently related to certain similarities in 3-D molecular

structure. Although all five studied octadecatrienoic acids have three conjugated double-bonds, only jacaric and punicic acid each have these double bonds in a *cis-trans-cis* conformation. Our 3-D conformational analyses using the PubChem Compound Database confirm that jacaric acid resembled the most cytotoxic reference compound punicic acid more than the other octadecatrienoic fatty acids based on various similarity scores (Fig 7 and Table 2). This observation is consistent and not consistent with an earlier study of conjugated octadecatrienoic acids that concluded that 9, 11, 13 fatty acids were systematically more cytotoxic than 8, 10, 12 geoisomers in human monocytic leukemia cells (Suzuki et al., 2001). They did not include the 8, 10, 12 geoisomer jacaric acid in their study and we found jacaric acid to be more cytotoxic than the 9, 11, 13 geoisomer catalpic acid, and that this could be predicted from the ranking of their optimized 3-D similarity scores relative to punicic acid. Another study reported that, among seven geoisomeric octadecatrienoic fatty acid, jacaric acid was the most cytotoxic compound ($IC_{50} = 3.4 \mu\text{M}$) and punicic acid the weakest ($IC_{50} = 7.9 \mu\text{M}$) (Shinohara et al., 2012). As the IC_{50} values of all other geoisomers fell between these two values and no variability in these values were reported it is unclear if any statistically significant differences in potency were observed in DLD-1 cells. The investigators concluded that they could not find a clear relationship between structural differences of the conjugated triene system and cytotoxic effects. In our present study, we have addressed this question and our findings provide strong evidence that 3-D molecular structure is a far more useful predictor of biological activity than a 2-D assessment of structure based on *cis/trans* comparisons.

We should keep in mind that similarity scores are meaningful only with intimate knowledge of the nature of the molecules under study and caution should be taken in interpreting their values. *Trans*-vaccenic acid exhibited no cytotoxicity in our human prostate cancer cells yet had reasonably high shape ($ST^{ST-opt} = 0.72$) and feature ($CT^{CT-opt} = 0.36$) overlap with punicic acid (Table 2) and had a $comboT^{ST-opt}$ score of 1.01, which was greater than that of, for example, *alpha*-calendic acid ($comboT^{ST-opt} = 0.97$). Other physico-chemical differences between *trans*-vaccenic acid and the octadecatrienoic acids such as hydrophobicity ($XlogP3 = 6.4 \pm 0.1$) and acid dissociation constant ($pK_a = 4.77 \pm 0.1$) are not significantly different. However, a visual examination using PubChem Compound of the 3-D conformations of *trans*-vaccenic acid that resulted in optimal similarity values when superposed on punicic acid clearly showed that either the superposed carboxylic acid groups had opposite orientations (when shape-optimized; Fig 8B) or the C-18 carbon chains were divergent (when feature-optimized; Fig 8C), thus forming wedge shaped superpositions. Such deviations from the structural orientation of punicic acid were not observed with the octadecatrienoic acids, which had

superpositions with aligned carboxylic acid groups and tightly convergent C-18 chains (e.g. *alpha*-calendic acid in Fig 8A). In fact, the CT-optimized intermolecular distance between the C-18 atoms of punicic acid and *trans*- or *cis*-vaccenic acid were 6.19 Å (Fig 7C) and 6.89 Å (not shown), respectively, whereas it was on average 1.09 ± 0.20 Å (n=4) for the octadecatrienoic acids (distance indicated for *alpha*-calendic acid in Fig 8A).

It is also apparent that even among structurally highly similar compounds the relationship between optimized similarity scores and biological activity is not linear and that activity decreases rapidly with decreased ST or CT score. The calculated plateau values of ST^{ST-opt} (0.74), CT^{CT-opt} (0.28) and $comboT^{ST-opt}$ (0.97) suggest that scores at or below these values have little relevance in assessing biological activity, at least of this series of octadecatrienoic acids. In this context it is interesting to note that a conformational analysis of the overlap of punicic acid with itself produced an ST^{ST-opt} value of 0.73 and CT^{CT-opt} value of 0.23 for the closest two different diverse conformations within the same molecule. These values are below the empirically determined plateau values and below those obtained when punicic acid is superimposed on the other octadecatrienoic fatty acids. Taken together, when similarity scores are interpreted sensibly, it is clear that the PubChem Compound Database provides numerous 3-D tools and a wealth of information useful for the detailed assessment of 3-D molecular structure and its relation to experimentally determined biological activities. We demonstrate in the present study that these tools are extremely useful in evaluating relationships between 3-D molecular structure and cytotoxic potency of a series of naturally occurring, plant-derived C-18 fatty acids, by being able to discriminate among molecules with otherwise (almost) identical physico-chemical properties.

Competing interests

The authors declare to have no competing interests.

Acknowledgements

We would like to thank Alexander Goldberg for his technical assistance with the experiments. We would like to thank Mohamed Touaibia (University of Moncton, NB) for his calculations of physico-chemical constants. This work was supported financially by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada grant (No 313313) to JTS.

References

- Bolton, E.E., Chen, J., Kim, S., Han, L., He, S., Shi, W., Simonyan, V., Sun, Y., Thiessen, P.A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., Bryant, S.H., 2011a. PubChem3D: a new resource for scientists. *Journal of cheminformatics* 3, 32.
- Bolton, E.E., Kim, S., Bryant, S.H., 2011b. PubChem3D: Conformer generation. *Journal of cheminformatics* 3, 4.
- Bolton, E.E., Kim, S., Bryant, S.H., 2011c. PubChem3D: Diversity of shape. *Journal of cheminformatics* 3, 9.
- Bolton, E.E., Kim, S., Bryant, S.H., 2011d. PubChem3D: Similar conformers. *Journal of cheminformatics* 3, 13.
- Chen, X., Thakkar, H., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S.K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N., Srivastava, R.K., 2001. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* 20, 6073-6083.
- Chisholm, M.J., Hopkins, C.Y., 1967. Conjugated fatty acids in some curcubitaceae seed oils *Can. J. Biochem* 45, 1081-1086.
- Christian, P.A., Thorpe, J.A., Schwarze, S.R., 2009. Velcade sensitizes prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis and suppresses tumor growth in vivo. *Cancer Biol Ther* 8, 73-80.
- Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K.M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C.A., Korsmeyer, S., Buttyan, R., 1993. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *The American journal of pathology* 143, 390-400.
- Destailats, F., Buyukpamukcu, E., Golay, P.A., Dionisi, F., Giuffrida, F., 2005. Vaccenic and rumenic acids, a distinct feature of ruminant fats. *J Dairy Sci* 88, 449.
- El-Shaarawy, M.I., Nahapetian, A., 1983. Studies of pomegranate seed oil. *Fette Seifen Austrichmittel* 85, 123-126.
- Gartel, A.L., 2009. p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors* 35, 161-164.
- Gasmi, J., Sanderson, J.T., 2010. Growth inhibitory, antiandrogenic, and pro-apoptotic effects of punicic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *J Agric Food Chem* 58, 12149-12156.
- Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M.C., Holbrook, N.J., 1997. p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14, 929-935.
- Hague, A., Diaz, G.D., Hicks, D.J., Krajewski, S., Reed, J.C., Paraskeva, C., 1997. bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int J Cancer* 72, 898-905.
- Hawkins, P.C., Skillman, A.G., Warren, G.L., Ellingson, B.A., Stahl, M.T., 2010. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *Journal of chemical information and modeling* 50, 572-584.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J., 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.
- Kadowaki, Y., Chari, N.S., Teo, A.E., Hashi, A., Spurgers, K.B., McDonnell, T.J., 2011. PI3 Kinase inhibition on TRAIL-induced apoptosis correlates with androgen-sensitivity and p21 expression in prostate cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 16, 627-635.
- Li, Y., Raffo, A.J., Drew, L., Mao, Y., Tran, A., Petrylak, D.P., Fine, R.L., 2003. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. *Cancer Res* 63, 1527-1533.
- Liu, L., Hammond, E.G., Nikolau, B.J., 1997. In Vivo Studies of the Biosynthesis of [alpha]-Eleostearic Acid in the Seed of *Momordica charantia* L. *Plant Physiol* 113, 1343-1349.

Ozgul-Yucel, S., 2005. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *J Am Oil Chem Soc* 82, 893-897.

Pourzand, C., Rossier, G., Reelfs, O., Borner, C., Tyrrell, R.M., 1997. Overexpression of Bcl-2 inhibits UVA-mediated immediate apoptosis in rat 6 fibroblasts: evidence for the involvement of Bcl-2 as an antioxidant. *Cancer Res* 57, 1405-1411.

Reed, J.C., 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124, 1-6.

Scott, S.L., Earle, J.D., Gumerlock, P.H., 2003. Functional p53 increases prostate cancer cell survival after exposure to fractionated doses of ionizing radiation. *Cancer Res* 63, 7190-7196.

Shankar, S., Chen, Q., Siddiqui, I., Sarva, K., Srivastava, R.K., 2007. Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential. *J Mol Signal* 2, 7.

Shinohara, N., Tsuduki, T., Ito, J., Honma, T., Kijima, R., Sugawara, S., Arai, T., Yamasaki, M., Ikezaki, A., Yokoyama, M., Nishiyama, K., Nakagawa, K., Miyazawa, T., Ikeda, I., 2012. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 980-988.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 62, 10-29.

Skjoth, I.H., Issinger, O.G., 2006. Profiling of signaling molecules in four different human prostate carcinoma cell lines before and after induction of apoptosis. *Int J Oncol* 28, 217-229.

Suzuki, R., Noguchi, R., Ota, T., Abe, M., Miyashita, K., Kawada, T., 2001. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids* 36, 477-482.

Suzuki, R., Yasui, Y., Kohno, H., Miyamoto, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., Tanaka, T., 2006. Catalpa seed oil rich in 9t,11t,13c-conjugated linolenic acid suppresses the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rats. *Oncology reports* 16, 989-996.

Takagi, T., Itabashi, Y., 1981. Occurrence of mixture of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography *Lipids* 16, 546-551.

Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Abe, R., Nakagawa, K., Koba, K., Imamura, J., Iwata, T., Ikeda, I., Miyazawa, T., 2006. Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J Nutr* 136, 2153-2159.

Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M., Nakagawa, K., Ohsaki, Y., Komai, M., Miyazawa, T., 2004. Alpha-eleostearic acid (9Z11E13E-18:3) is quickly converted to conjugated linoleic acid (9Z11E-18:2) in rats. *J Nutr* 134, 2634-2639.

Voelkel-Johnson, C., King, D.L., Norris, J.S., 2002. Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL. *Cancer gene therapy* 9, 164-172.

Yang, B., Kallio, H., 2006. Analysis of triacylglycerols of seeds and berries of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) of different origins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Lipids* 41, 381-392.

Yasui, Y., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K., 2006a. Growth Inhibition and Apoptosis Induction by All-trans-conjugated Linolenic Acids on Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Research* 26, 1855-1860.

Yasui, Y., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K., 2006b. Troglitazone and 9-cis,11-trans,13-trans-Conjugated Linolenic Acid: Comparison of Their Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Effects on Different Colon Cancer Cell Lines. *Chemotherapy* 52, 220-225.

Yasui, Y., Hosokawa, M., Sahara, T., Suzuki, R., Ohgiya, S., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K., 2005. Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-

regulates the GADD45, p53 and PPAR α in human colon cancer Caco-2 cells. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 73, 113-119.

Yuan, G.F., Yuan, J.Q., Li, D., 2009. Punicic acid from *Trichosanthes kirilowii* seed oil is rapidly metabolized to conjugated linoleic acid in rats. *J Med Food* 12, 416-422.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edition ed. Prentice-Hall, N.J

Table 1. Seven naturally occurring C-18 fatty acids used in this study with their sources of high accumulation.

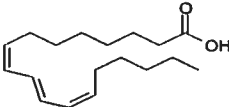
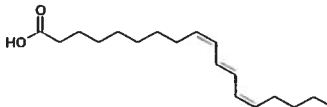
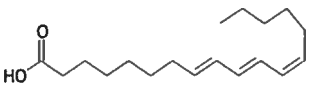
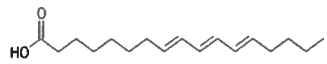
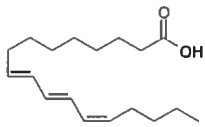
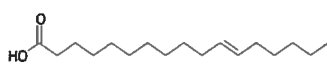
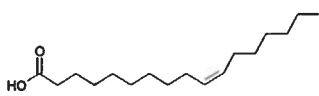
Fatty acid	IUPAC name	Molecular structure	High accumulator
Jacaric	(8Z,10E,12Z)-octadeca-8,10,12-trienoic acid		<i>Jacaranda mimosifolia</i> seed oil (62%) (Takagi and Itabashi, 1981)
Punicic	(9Z,11E,13Z)-octadeca-9,11,13-trienoic acid		<i>Punica granatum</i> seed oil (67-80 %) (El-Shaarawy and Nahapetian, 1983)
<i>alpha</i> -Calendic	(8E,10E,12Z)-octadeca-8,10,12-trienoic acid		<i>Calendula officinalis</i> seed oil (60 %) (Chisholm and Hopkins, 1967)
<i>beta</i> -Calendic	(8E,10E,12E)-octadeca-8,10,12-trienoic acid		<i>Calendula officinalis</i> seed oil (minor) (Chisholm and Hopkins, 1967)
Catalpic	(9E,11E,13Z)-octadeca-9,11,13-trienoic acid		<i>Catalpa bignonioides</i> seed oil (25.5 %) (Ozgul-Yucel, 2005)
<i>trans</i> -Vaccenic	(E)-octadec-11-enoic acid		Milk fat (data unavailable) (Destailats et al., 2005)
<i>cis</i> -Vaccenic	(Z)-octadec-11-enoic acid		Sea buckthorn berries (data unavailable) (Yang and Kallio, 2006)

Table 2. Optimized similarity scores obtained using the PubChem Compound Database for the 3-D structural comparison of six C-18 fatty acids with punicic acid (see Materials and Methods).

PubChem CID	Fatty acid	ST ^{ST-opt} a)	CT ^{CT-opt} a)	ComboT ^{ST-opt} b)	ComboT ^{CT-opt}
5281126	Punicic	1	1	2	2
5282817	Jacaric	0.81	0.45	1.18	1.07
5282818	<i>alpha</i> -Calendic	0.74	0.23	0.97	0.97
5282819	<i>beta</i> -Calendic	0.76	0.31	1.06	1.01
5385589	Catalpic	0.74	0.34	0.99	0.92
5281127	<i>trans</i> -Vaccenic	0.72	0.36	1.01	1.01
5282761	<i>cis</i> -Vaccenic	0.67	0.16	0.73	0.52

a) The underlying calculations, assumptions and meaningfulness of optimized similarity scores shape-tanimoto (ST^{ST-opt}) and color-tanimoto (CT^{CT-opt}) are reviewed (Bolton et al., 2011a; Bolton et al., 2011b, c, d)

b) The obtained ComboT^{ST-opt} scores had the same values as ComboT^{(ST+CT)opt} scores.

Figure 1.

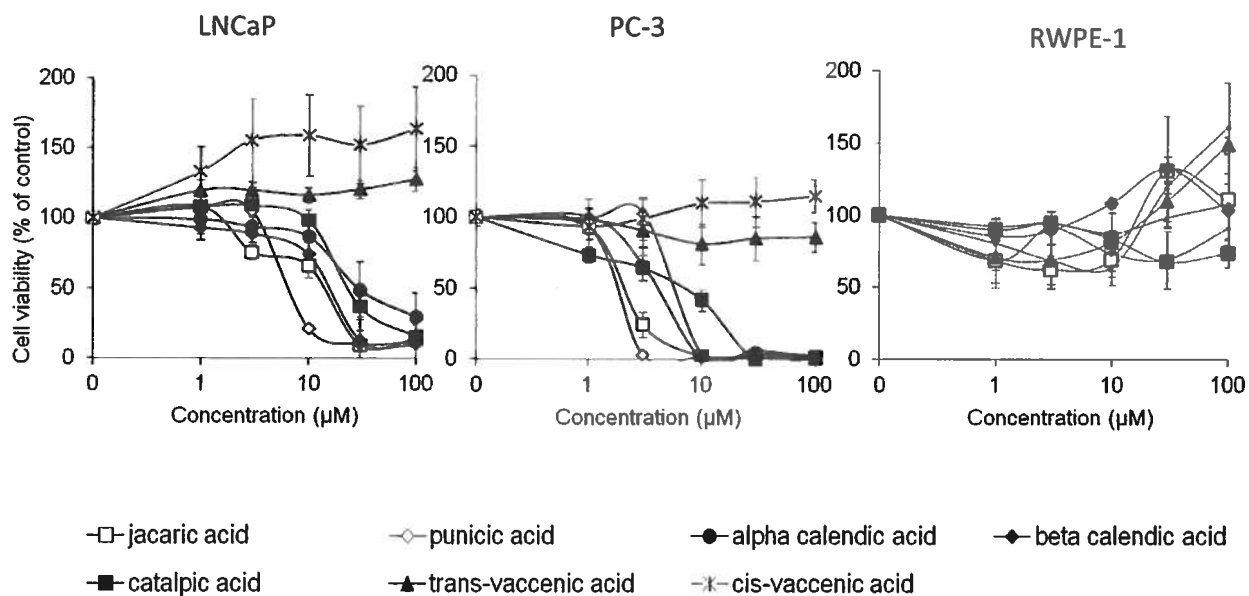


Figure 2.

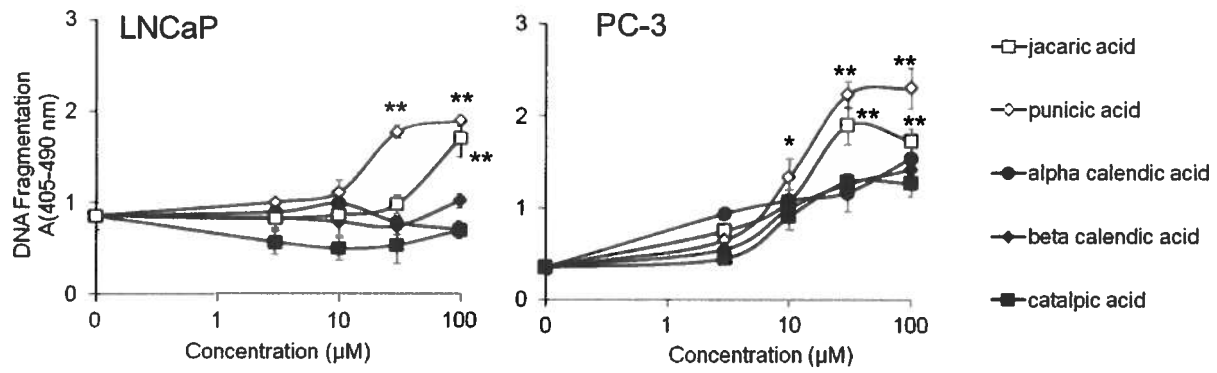


Figure 3.

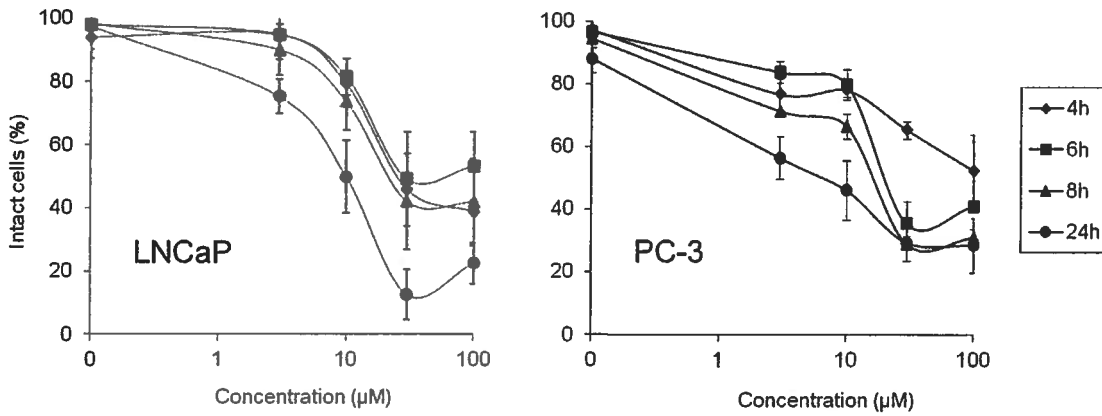


Figure 4.

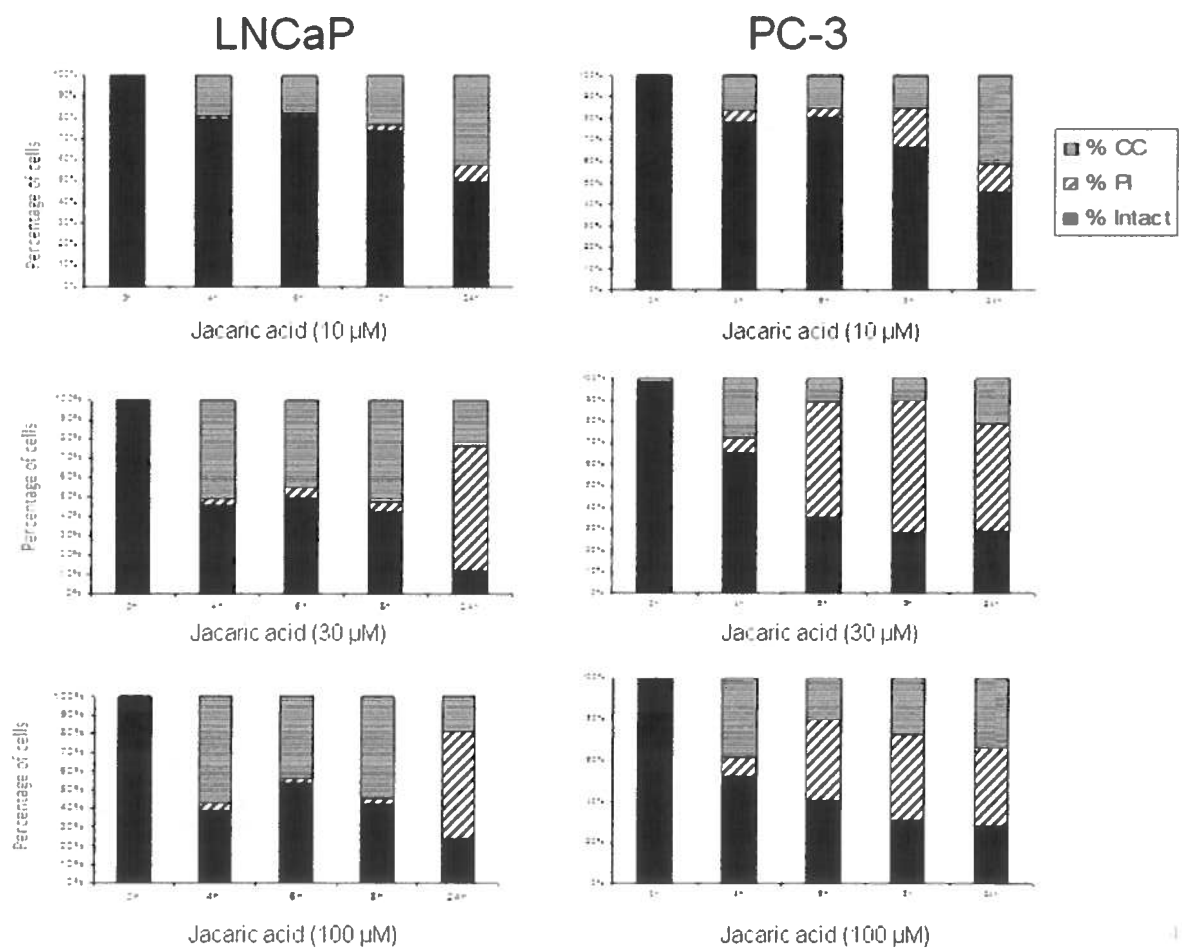


Figure 5.

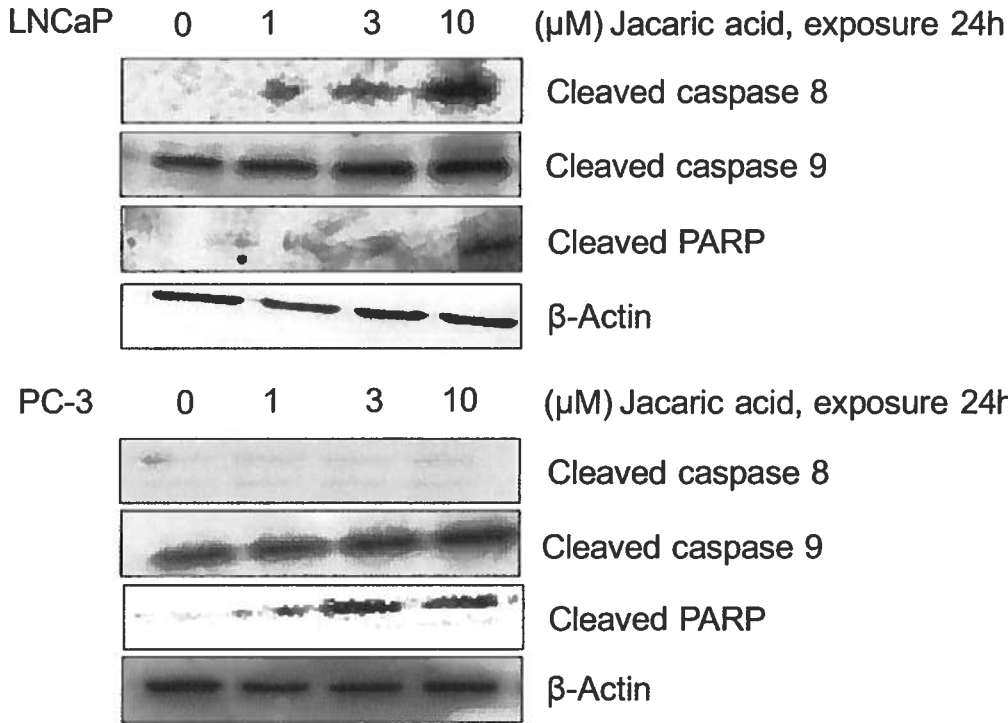


Figure 6.

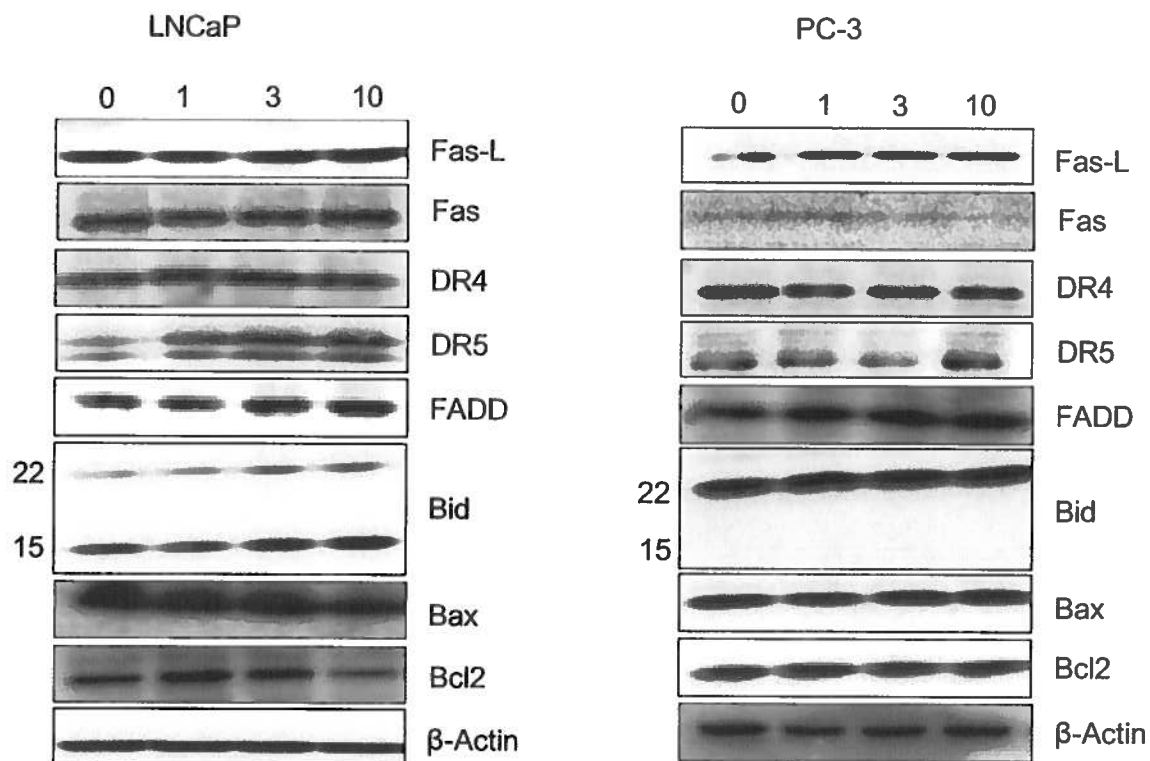


Figure 7.

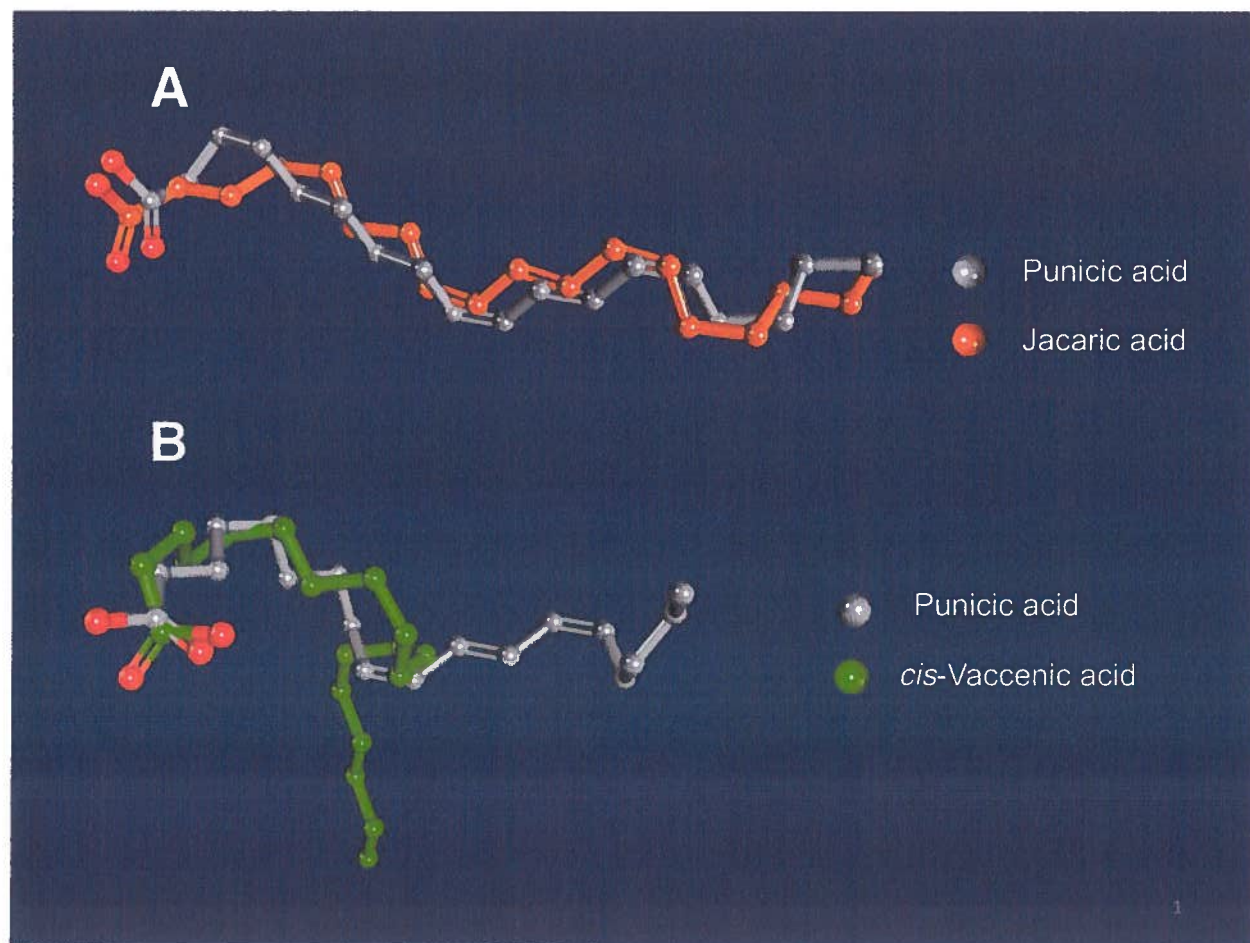
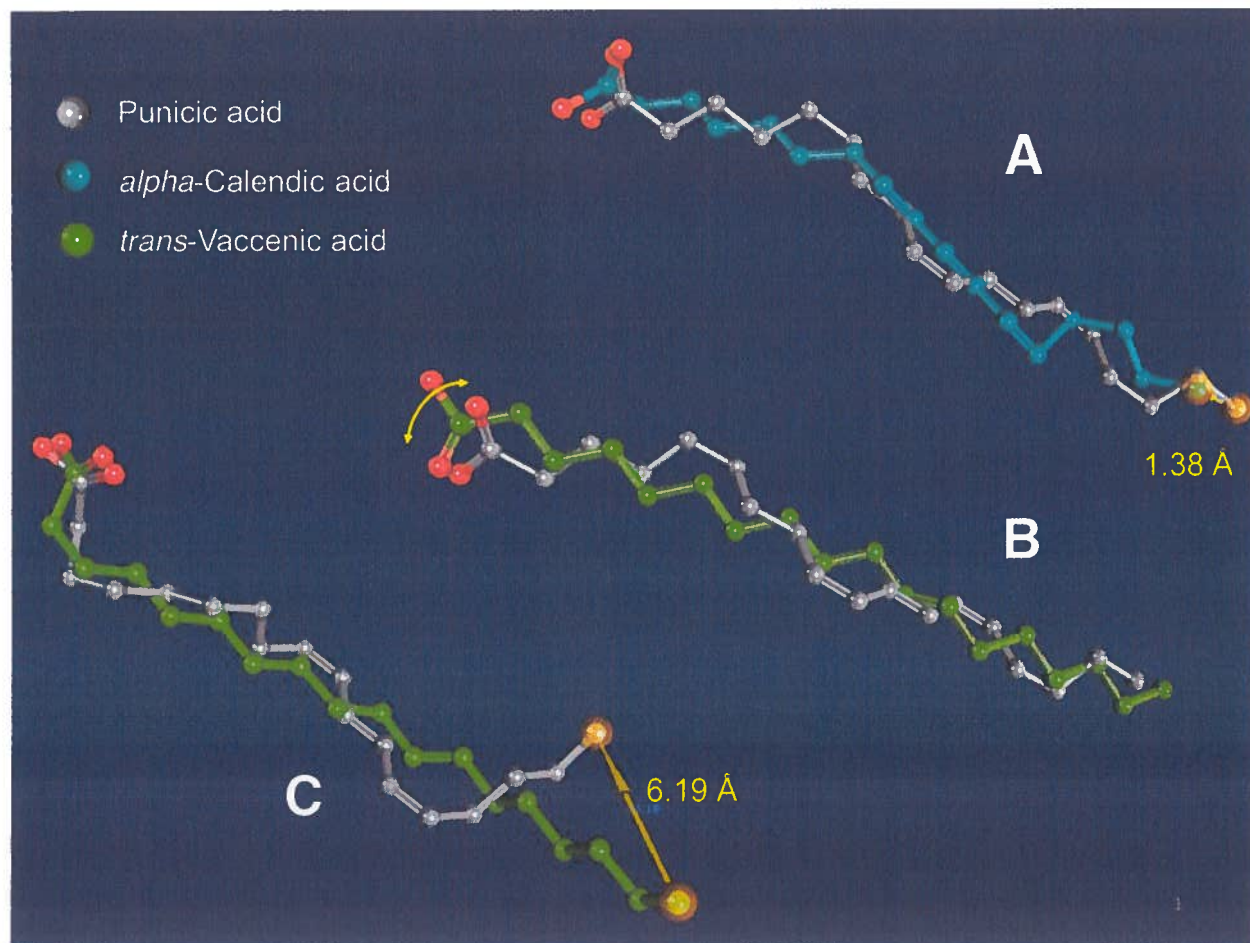


Figure 8.



Figures legends

Figure 1. Effect of seven C-18 fatty acids on the viability of (from left to right) LNCaP and PC-3 human prostate cancer cells and RWPE-1 immortalized human prostate epithelial cells, after a 24h exposure. Negative control cells received 0.1% DMSO. The average \pm SD of three independent experiments is shown; each experiment was performed in triplicate. IC₅₀ values were calculated by GraphPad Prism and are listed in section 3.1.

Figure 2. DNA fragmentation induced by five octadecatrienoic acids in LNCaP (left) and PC-3 (right) human prostate cancer cells (24h exposure). Negative control cells received 0.1% DMSO. The average \pm SD of three independent experiments is shown; each experiment was performed in triplicate. Responses marked with an asterisk were significantly different from control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figure 3. Jacaric acid-mediated concentration- and time-dependent loss of intact LNCaP (left) and PC-3 (right) cells. Intact cell morphology was assessed quantitatively by fluorescence microscopy as described in Materials and Methods. Negative control cells received 0.1% DMSO. The average \pm SD of three independent experiments is shown; each experiment was performed in triplicate.

Figure 4. Jacaric acid-mediated concentration- and time-dependent increase in apoptotic and necrotic LNCaP (left) and PC-3 (right) cells. Apoptotic nuclear morphology (chromatin condensed nuclei, CC) was observed after Hoechst 33258 staining using fluorescence microscopy. Cells were also stained with propidium iodide (PI) to distinguish apoptotic from necrotic cells and determine the percentage of each cell population.

Figure 5. Jacaric acid induces caspase-8, -9 and PARP cleavage in LNCaP (top) and PC-3 (bottom) cells. Cells were exposed, in complete culture medium, to 1, 3 and 10 μ M jacaric acid for 24h. Cleaved PARP, caspase-8 and -9 were detected by western blotting. One representative experiment of three is shown.

Figure 6. Jacaric acid activates extrinsic apoptosis via death receptor 5 in LNCaP cells. One representative experiment of three is shown.

Figure 7. Conformational superposition of punicic acid on (A) jacaric acid ($ST^{ST-opt} = 0.81$) or (B) *cis*-vaccenic acid ($ST^{ST-opt} = 0.67$) demonstrating the importance of 3-D structural orientation in the cytotoxic activity of C-18 fatty acids. Jacaric acid was able to align its carboxylic acid group and C-18 carbon chain closely to those of punicic acid (A), whereas *cis*-vaccenic acid (B) was not.

Figure 8. Optimized conformational superpositions of punicic acid on (A) *alpha*-calendic acid ($ST^{ST-opt} = ST^{CT-opt} = 0.74$; $CT^{CT-opt} = CT^{ST-opt} = 0.23$), (B) *trans*-vaccenic acid ($ST^{ST-opt} = 0.72$; $CT^{ST-opt} = 0.29$) or (C) *trans*-vaccenic acid ($CT^{CT-opt} = 0.36$; $ST^{CT-opt} = 0.65$), demonstrating the necessity of visual evaluation of 3-D structural superpositions, despite relatively high similarity scores. Although conformational superposition of punicic acid on non-cytotoxic *trans*-vaccenic acid (B & C) resulted in combined similarity scores that were greater than those resulting from superposition of punicic acid on the cytotoxic *alpha*-calendic acid (A), the orientation of the paired carboxylic acid groups were either opposite to each other (when ST-optimized; see B) or the paired C-18 atoms were significantly further apart from each other (when CT-optimized; see C).

4 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les facteurs environnementaux, et plus particulièrement, le régime alimentaire, jouent un rôle important dans le développement du cancer de la prostate. Les traitements actuellement proposés présentent des effets secondaires indésirables en plus d'induire une résistance des cellules cancéreuses au bout de quelques années de traitement. La prévention alimentaire est donc une alternative intéressante. En effet, l'identification de molécules potentiellement bioactives aux propriétés préventives et anti-cancéreuses devient fondamentale.

Nous avons étudié l'effet antiprolifératif de composés naturels extraits de la grenade sur les cellules cancéreuses de la prostate. Afin de réaliser nos travaux, nous avons choisi de privilégier différents modèles cellulaires et des expériences *in vitro*. En effet, le modèle animal ne répond pas à toutes les conditions nécessaires à cette étude. Il devrait présenter les mêmes situations cliniques que celles rencontrées chez l'homme c'est-à-dire que la tumeur devrait être d'origine humaine, avoir un temps de doublement relativement lent mais suffisamment rapide pour permettre des études dans des délais raisonnables, être androgène-dépendante, produire le PSA, créer des métastases ganglionnaires et osseuses, et progresser vers un état androgéno-indépendant après castration [325]. De plus, il faut savoir que le cancer de la prostate varie chez l'homme d'une tumeur à une autre et cela en terme d'agressivité, de sensibilité aux androgènes et d'aspect histologique. Il n'est donc pas réaliste de créer un modèle d'étude chez l'animal qui puisse répondre à toutes ces conditions. De plus, le cancer de la prostate est très fréquent chez l'homme. Cependant, il apparaît rarement de manière spontanée chez l'animal. Il existe néanmoins plusieurs modèles de cancer de la prostate chez le rongeur qui ont permis d'identifier l'hétérogénéité cellulaire tumorale, les mécanismes d'hormono-résistance et le pouvoir métastatique. Néanmoins, tout principe oncologique découvert sur une tumeur chez l'animal doit être étendu et validé sur des tumeurs humaines. C'est pourquoi nous avons réalisé la majorité de nos expériences sur la lignée tumorale prostatique humaine LNCaP. Cette lignée fait partie des rares lignées cellulaires du cancer de la prostate androgéno-sensibles disponibles à l'heure actuelle. Il existe d'autres lignées cellulaires androgène-dépendantes comme la ALVA-31 [326] et la ALVA-41 [327] qui sont moins répandues.

Les LNCaP ont été isolées d'un ganglion sous-claviculaire métastatique d'un homme de 50 ans ayant un adénocarcinome prostatique [328]. Les cellules LNCaP expriment le récepteur aux androgènes et aux oestrogènes. Le AR présente une mutation (Thr⁸⁶⁸ est remplacée par une Ala⁸⁶⁸) dans le domaine de liaison au ligand, ce qui lui confère une plus grande affinité pour les

androgènes, les anti-androgènes et les oestrogènes [329]. La prolifération des cellules LNCaP est importante en présence d'androgènes de même que l'expression du PSA [330]. De plus, toutes les enzymes clés impliquées dans le métabolisme des androgènes sont présentes à l'exception de la 5 α -réductase de type II. Enfin, ces cellules peuvent croître facilement en culture [331, 332]. Toutes ces caractéristiques font des LNCaP la lignée cellulaire la plus étudiée et la mieux caractérisée en termes de cellules cancéreuses de la prostate AR positive [333].

Nous avons également travaillé sur la lignée cellulaire PC-3 afin d'identifier les effets des composés naturels à un stade plus évolué du cancer de la prostate. En effet, ces cellules ont été établies à partir d'une métastase osseuse d'un homme de 62 ans ayant un adénocarcinome prostatique de grade IV et ayant suivi une hormonothérapie [334]. Ces cellules ne répondent pas aux androgènes, aux glucocorticoïdes, ou aux facteurs de croissances. Elles n'expriment pas le AR et le PSA et ont une faible activité de la SRD5A [334]. Pour cette raison elles ont été utilisées pour déterminer les changements biochimiques advenant dans les cellules cancéreuses de la prostate à un stade avancé et étudier leur réponse suite à un traitement chimiothérapeutique.

La lignée PC-3 est l'une des lignées les plus utilisées en recherche en plus de la lignée DU145. Cependant, il existe d'autres lignées cancéreuses androgène-indépendantes, moins bien caractérisées, telles que les EB-33 [335], PC-93 [336], TSU-PR1 [337], JCA-1 [338], ND-1 [339], PPC1 [340], et DuPro-1 [341].

Les lignées PC-3 et DU-145 peuvent être cultivées facilement *in vitro* et peuvent produire des carcinomes peu différenciés après inoculation sous cutanée chez la souris immunodéficiente. Cependant, aucune de ces lignées cellulaires ne répond aux déprivations androgéniques et aucune n'exprime le AR, ne présente d'activité 5 α -réductase ni ne produit de PSA. Ces lignées ont permis de créer des sous-lignées cellulaires à pouvoir métastatique vers des organes sélectifs chez la souris immunodéficiente [342-344]. Elles sont donc plus adaptées à une étude qui privilégie les mécanismes moléculaires liés au pouvoir métastatique des cellules du cancer de la prostate [344].

Les cellules RWPE-1 ont été utilisées afin de déterminer l'effet cytotoxique des composés naturels testés sur les cellules épithéliales normales de la prostate. En effet, ces cellules proviennent de la zone périphérique d'une prostate adulte histologiquement normale transfectée avec un papilloma virus humain 18 (HPV-18) et exprimant le PSA et le AR. Nous

avons choisi ces cellules parce qu'elles ont les caractéristiques des cellules normales et représentent un bon modèle pour étudier la régulation de la croissance prostatique et la carcinogenèse. De plus, ce sont les cellules normales les mieux caractérisées disponibles actuellement [345].

Est-ce que l'effet chimiopréventif des composés naturels extraits de la grenade, capables d'inhiber la croissance des cellules androgènes-dépendantes, se traduit par un effet antiandrogénique ?

Les androgènes, et plus particulièrement la DHT, sont indispensables à la croissance et au développement du cancer de la prostate. En effet, dans la prostate, la testostérone est convertie en DHT par la SRD5A1 et 2 et a une grande affinité pour le AR [16]. Lorsque la DHT se lie au AR, le complexe pénètre dans le noyau de la cellule et se fixe sur l'ADN de certains gènes cibles, ce qui en modifie l'expression [20-22]. Les gènes ainsi régulés codent pour des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, et en particulier la division cellulaire et l'expression du gène codant pour le PSA [23-27].

Pour déterminer l'effet chimiopréventif des composés naturels extraits de la grenade sur les cellules cancéreuses de la prostate, nous avons tout d'abord déterminé leurs effets sur les cellules cancéreuses androgènes-dépendantes LNCaP qui ont les caractéristiques du cancer de la prostate à ses débuts. En effet, nous avons testé différents composés purs extraits de différentes parties du fruit et appartenant à différentes classes chimiques (acides hydroxybenzoïque, anthocyanidines, acides gras conjugués et non conjugués, flavan-3-ols et flavonol glycoside) et avons identifié 4 composés, l'épigallocatechine gallate (EGCG), le delphinidine chlorure, le kaempférol et l'acide punicique, capables d'induire un effet antiprolifératif dans les cellules androgènes-dépendantes LNCaP stimulées par la DHT. Ces composés inhibent l'expression du AR nucléaire de façon dose-dépendante et diminuent l'expression des gènes codant pour la SRD5A1 et le PSA.

Les cellules LNCaP ont besoin d'androgènes pour leur croissance ainsi que pour l'activation du AR. De plus, la testostérone doit être convertie en DHT par la SRD5A1 [346]

pour permettre la transcription du gène codant pour le PSA. Nous avons montré que quatre composés de la grenade étaient capables d'inhiber l'expression des gènes cibles du AR dans les cellules LNCaP en induisant une diminution de la quantité de AR nucléaire. Ces composés influencent non seulement la croissance cellulaire AR dépendante, mais aussi la conversion de la testostérone en DHT. De plus, nos résultats confirment des travaux qui ont montré que les catéchines (EGCG) présentes dans le thé vert, ainsi que certains acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique, les ellagitannins, les flavonoides et les lignines sont aussi des inhibiteurs de la 5 α -réductase [347-349]. Les travaux de Iguchi et al. (2012) ont également mis en évidence les effets antiandrogéniques d'analogues du resveratrol sur les cellules LNCaP [350]. Cet effet antiandrogénique se traduit par une inhibition du Akt. Ils expliquent cette inhibition par une surexpression de PTEN qui est un inhibiteur de Akt ou par une inhibition de la voie PI3K/Akt via le facteur de croissance EGF. Cependant, ni le resveratrol ni ses analogues ne présentent des effets sur l'expression protéique du AR. Les auteurs expliquent cela par la faible concentration du composé utilisé (10 μ M). Cependant, nous avons montré une diminution de l'expression du AR à la même concentration avec l'EGCG. D'autres travaux montrent une inhibition de la phosphorylation du AR par Akt suite à l'exposition des cellules LNCaP à des extraits de champignon comestible, le *Coprinus comatus* [351]. En effet, le AR subit des modifications post-traductionnelles. Il est phosphorylé par Akt sur la Ser 210/213 et la Ser 790 ce qui le stabilise et le protège de la dégradation protéolytique. Lorsque Akt est inhibé, la dégradation du AR par le protéosome est favorisée. De plus, la voie PI3K/Akt permet la survie des cellules cancéreuses de la prostate lorsqu'elles sont déprivées en androgènes [352]. Cela pourrait expliquer la diminution de l'expression du AR et du Akt observée dans notre étude.

Les travaux de Chuu et al. (2009) montrent des effets antiprolifératifs de l'EGCG sur les cellules LNCaP à partir de 80 μ M [353]. Ils montrent également une inhibition de la croissance tumorale et de l'expression du PSA suite à une injection intrapéritonéale de l'EGCG dans des souris TRAMP. Nous avons montré que quatre composés de la grenade, EGCG, delphinidine chlorure, acide punicique et kaempferol, présentaient des effets antiprolifératifs sur les cellules LNCaP avec un IC₅₀ inférieur à 40 μ M. Cette concentration est plus faible et plus pertinente que celle utilisée par l'équipe de Chuu dans le cas d'une étude *in vivo*.

Est-ce que l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses hormono-dépendantes et -indépendantes, par les acides gras conjugués, fait intervenir d'autres voies cellulaires indépendantes de la voie androgénique ?

La voie PI3K/Akt joue un rôle important dans la croissance cellulaire, la survie, l'adhésion et la migration dans différents types de cellules. Elle est constitutivement activée dans les cellules cancéreuses de la prostate androgène-dépendantes LNCaP [354]. Elle permet aux cellules de survivre lorsqu'elles sont déprivées en androgènes. C'est également l'une des voies de signalisation qui permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose. La GSK-3 β , une protéine-sérine/thréonine kinase constitutivement active dans la cellule, est le substrat préférentiel de Akt. Elle est impliquée dans la régulation de la voie Wnt et dans la promotion de l'apoptose mitochondriale via la phosphorylation de Bax et sa translocation dans la membrane de la mitochondrie [355]. Son activité est inhibée par la phosphorylation de Akt suite à une stimulation par des facteurs de croissance. Nous avons montré que l'acide punique inhibait la phosphorylation de Akt et bloquait son activation. De plus, nous avons montré que GSK-3 β était également impliquée dans la régulation de l'apoptose puisqu'elle constitue un facteur important dans la voie de survie cellulaire gérée par la voie PI3K/Akt. Nous nous sommes alors intéressé aux voies de signalisation apoptotiques induites par l'acide punique.

Il existe plusieurs protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose comme les caspases, les protéines de la famille des Bcl-2 et les PARP [356, 357]. Bcl-2 est une protéine effectrice dans la voie apoptotique extrinsèque, elle a été identifiée comme étant un suppresseur de l'apoptose. Elle est souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses de la prostate [358, 359] ce qui leur permet d'échapper au mécanisme apoptotique. En effet, Bcl-2 bloque l'action de la protéine pro-apoptotique Bax en formant un hétérodimère avec cette dernière. Nous avons montré que l'acide punique, acide gras polyinsaturés présent en grande quantité dans l'huile des graines de grenade, induisait l'effet antiprolifératif le plus important dans les cellules LNCaP et que cet effet antiprolifératif se traduit également par un effet apoptotique dans les cellules LNCaP. En effet, il induit une diminution de l'expression des protéines Bcl-2 dans les cellules LNCaP sans influencer l'expression protéique de Bax. Il en résulte une diminution du ratio Bcl-

2/Bax qui est un facteur décisif de l'évolution de la cellule vers l'apoptose et une cascade de réactions qui permettent la libération du cytochrome c et l'activation des caspases effectrices.

Les travaux de Grossmann et al. (2010) ont mis en évidence les effets antiprolifératifs et apoptotiques de l'acide punique sur le cancer du sein. Dans cette étude, les auteurs montrent que cet acide gras en formant du diacylglycérol, induit une peroxydation lipidique à l'origine de l'activation de la voie des PKC et de la cascade apoptotique [360]. Ils mettent en évidence l'inhibition de la peroxydation lipidique, induite par l'acide punique, par une exposition des cellules cancéreuses du sein à l' α -tocotrienol. Cependant, une autre étude réalisée sur un groupe de 80 hommes sains montre que la peroxydation lipidique induite suite à la consommation d'acides gras oméga-3 n'est pas inhibée par une supplémentation en vitamine E [361]. La peroxydation lipidique ayant lieu in vitro ne répond donc pas de la même manière que celle mise en jeu in vivo [306]. Il est donc difficile de prédire l'effet apoptotique induit via la peroxydation lipidique, c'est pourquoi nous nous sommes d'avantages intéressés aux voies de signalisation apoptotiques.

Nos résultats confirment les effets protecteurs identifiés chez d'autres composés naturels comme l'EGCG, le delphinidine chloride et le kaempférol sur les cellules cancéreuses de la prostate [223, 233, 234, 362-367]. De plus, nous avons montré, pour la première fois, l'effet apoptotique de l'acide punique qui est bien plus élevé que celui de l'EGCG, du kaempférol ou encore du delphinidine chloride. En effet, d'après les travaux de Hafeez et al. (2008) l'activation de la voie de signalisation du NF-kB induit l'inflammation et provoque la carcinogenèse [368]. Une inhibition de l'activité du NF-kB dans les cellules PC-3 exposés au delphinidine chloride a été mise en évidence ainsi qu'une induction de l'apoptose intrinsèque, il faut savoir, qu'une inhibition prolongée du NF-kB n'est pas favorable à la prévention du cancer. Un effet préventif consisterait d'avantage à inhiber la cause initiale de l'activation constitutive de la voie NF-kB dans les cellules cancéreuses et non pas à une inhibition prolongée. C'est pourquoi l'utilisation d'inhibiteurs de NF-kB dans le traitement du cancer doit éviter l'immunosuppression associée à une inhibition prolongée de ce dernier [369].

Les travaux de Hastak et al. (2003) ont mis en évidence l'effet apoptotique induit par EGCG dans les cellules LNCaP. Cette apoptose fait intervenir deux facteurs de transcription importants, le NF-kB et le p53. En effet, l'EGCG induit une augmentation de l'expression du

p53 qui favorise l'apoptose en augmentant l'expression de Bax et de p21. Il inhibe également la protéine MDM2 impliquée dans la dégradation du p53. EGCG inhibe le NF- κ B ce qui induit une diminution de l'expression de Bcl2 et de Bcl-xL et favorise ainsi l'apoptose [370]. Ces travaux ont été réalisés sur les cellules LNCaP dont le p53 est sauvage, mais ces résultats ne peuvent pas s'appliquer aux cellules PC-3 dont le p53 est muté [371]. Notre but est d'identifier un composé capable d'induire l'apoptose dans les deux lignées cellulaires.

La dérégulation des voies apoptotiques joue un rôle important dans le développement des tumeurs cancéreuses de la prostate et dans la résistance aux traitements. C'est pourquoi un intérêt croissant pour la modulation des voies apoptotiques est apparu dernièrement dans les stratégies thérapeutiques contre le cancer de la prostate. Nous avons montré que l'acide punique faisait intervenir différents mécanismes d'action permettant d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses LNCaP. Nous avons donc testé ses effets sur les cellules cancéreuses androgène-indépendantes PC-3 et avons testé quatre de ses stéréoisomères.

Les composés naturels comme les acides gras polyinsaturés sont capables d'inhiber la croissance cellulaire et d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein et du colon [372-375]. Nous sommes les premiers à avoir identifié l'effet antiprolifératif de cinq acides gras octadécatriénoïques (acide punique, jacarique, *alpha*-calendique, *bé*ta-calendique et catalpique) dans les cellules LNCaP et PC-3. Nous avons également montré que ces acides gras n'affectaient pas la viabilité des cellules normales RWPE-1.

Parmi ces acides gras, l'acide jacarique provenant des graines de l'arbre *jacaranda mimosifolia*, s'est distingué par son effet inducteur efficace et sélectif de l'apoptose dans les cellules du cancer de la prostate hormono-sensibles et hormono-résistantes. En effet, la diminution de la viabilité des cellules exposées à l'acide jacarique a été associée à une augmentation de la fragmentation de l'ADN, de la condensation de la chromatine et du clivage de PARP. Cela indique que l'apoptose induite par l'acide jacarique, joue un rôle important dans l'effet antiprolifératif observé dans les deux lignées cellulaires. De plus il induit une mort cellulaire que nous avons réussi à différencier de la nécrose grâce aux observations réalisées au microscope à fluorescence.

Les cellules LNCaP surexpriment Akt en raison d'une faible expression de la phosphatase à lipides PTEN qui est une inhibitrice de la PI3K. Les LNCaP sont normalement résistantes à

l'apoptose extrinsèque induite par les récepteurs TRAIL [376]. Elles peuvent cependant être sensibilisées à cette voie suite à une exposition combinée de TRAIL et d'agents chimiothérapeutiques [377] ou de composés naturels [378]. Nous avons identifié, pour la première fois, l'induction de l'apoptose par l'acide jacarique via le récepteur de mort cellulaire TRAIL-R2 ou DR5 dans les cellules LNCaP. Cependant, le mécanisme par lequel il induit une sensibilisation des cellules LNCaP au TRAIL reste à identifier. D'après la littérature, afin de surmonter la résistance au TRAIL, plusieurs mécanismes sont possibles comme l'inhibition de Akt. En effet, Akt est constitutivement activée dans les cellules LNCaP, elle intervient dans la régulation de la sensibilité au TRAIL et bloque la cascade apoptotique en inhibant l'activité de Bid [376]. Un autre moyen permettant de contourner la résistance au TRAIL dans les cellules LNCaP consiste à inhiber la fonction du protéosome 26S, ce qui retarde la dégradation de la caspase 8 et favorise l'apoptose extrinsèque induite par TRAIL [379].

Les cellules PC-3, sont normalement plus sensibles que les cellules LNCaP à l'apoptose extrinsèque induite par TRAIL [376]. Cependant, nous avons montré que les cellules PC-3 étaient plus sensibles à l'apoptose induite par l'acide jacarique, mais que cette apoptose ne faisait pas intervenir la voie extrinsèque. Une explication possible est que l'acide jacarique agit au niveau d'une cible qui bloque la résistance à l'apoptose induite par DR5 dans les cellules LNCaP et que cette cible n'est pas active dans les cellules PC-3. Cette cible ferait intervenir une interaction entre la voie Akt, faiblement active dans les cellules PC-3 et le AR. Les cellules LNCaP sont alors plus résistantes face à l'apoptose grâce aux molécules de survie cellulaire et plus particulièrement les p21 [380, 381] qui sont régulées par le AR [382]. Ce mécanisme d'interaction n'est pas présent dans les cellules PC-3 puisqu'elles n'expriment pas le AR. Nous savons également que Akt est constitutivement activée dans les cellules LNCaP et que cette voie est inhibée par l'acide punicique [383]. L'implication d'une interaction entre la voie Akt et AR expliquerait l'activation de la voie apoptotique extrinsèque induite par l'acide jacarique dans les cellules LNCaP.

La capacité de l'acide jacarique à induire une apoptose intrinsèque dans les deux lignées cellulaires LNCaP et PC-3 peut être due à la peroxydation lipidique, à la dégradation en acides gras de la composition cellulaire ou encore à un déséquilibre dans la régulation de certains gènes [384-387]. Des études ont mis en évidence une surexpression de Bcl-2 dans des tissus néoplastiques de la prostate humaine [120]. Puisque l'acide jacarique et punicique [383] inhibent

l'expression de Bcl-2 dans les cellules LNCaP, ils pourraient agir comme des agents antinéoplastiques dans les cellules cancéreuses de la prostate.

Est-ce qu'il existe un lien entre la structure et l'activité des composés naturels actifs ?

Les isomères possèdent une formule brute identique, mais des formules développées ou semi-développées différentes qui leur confèrent des propriétés physiques et chimiques différentes. L'acide punique, jacarique, alpha-calendique, bêta-calendique et catalpique sont des isomères à 18 atomes de carbones et trois doubles liaisons conjuguées dont la structure spatiale est différente. L'acide punique et jacarique se distinguent des trois autres isomères d'acides linoléiques étudiés. Ce sont les composés les plus actifs et les plus cytotoxiques et leur efficacité est reliée à une similarité dans leur structure moléculaire 3-D. En effet, seul l'acide punique et jacarique ont une conformation *cis-trans-cis*.

Notre analyse conformationnelle en 3-D réalisée grâce à la base de données des composés de Pubmed, confirme que l'acide jacarique est le composé le plus proche du composé cytotoxique de référence, l'acide punique. Cette analyse est basée sur différents scores de similitudes. Cependant, une précédente étude réalisée sur des acides gras conjugués octadécatriénoïques confirme que les acides gras 9, 11, 13 sont plus toxiques que les isomères 8, 10, 12 dans les cellules de leucémie monocyttaire humaine [263]. Cependant, cette étude n'a pas inclut l'acide jacarique, un isomère 8, 10, 12 dans son analyse.

Nous avons également montré que l'acide jacarique était plus cytotoxique que l'acide catalpique, un isomère 9, 11, 13 et avons confirmé cela par une analyse 3-D en leur attribuant un classement. Ce classement est déterminé par un score de similarité relatif à l'acide punique. Nos résultats mettent en évidence l'importance de la structure moléculaire 3-D dans la prédiction de l'activité biologique en comparaison à une évaluation basée sur la structure 2-D. Cependant, il est important, de connaître la nature de la molécule étudiée et d'être vigilant quant à l'interprétation de ces valeurs.

L'acide trans-vaccénique n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses de la prostate. En effet, il ne présente pas de similarité avec le composé de référence, l'acide punique

suite à une analyse 3-D. En revanche, lorsque d'autres facteurs physico-chimiques comme l'hydrophobicité et la constante de dissociation sont pris en compte, aucune différence significative n'apparaît entre l'acide trans-vaccénique et l'acide punique. Une analyse visuelle en 3-D réalisée grâce au logiciel PubChem Compound montre une valeur optimale de similarité entre l'acide trans-vaccénique et l'acide punique lorsqu'ils sont superposés. En revanche, la superposition des groupements d'acide carboxylique des deux acides gras montre une orientation opposée (lorsque la forme est optimisée) ou une divergence de la chaîne de carbones C-18 (lorsque les caractéristiques de chevauchement sont optimisées) ce qui forme des superpositions en forme de coin. Ce type de déviation structurelle de l'acide punique n'est pas observée avec les acides octadécatriénoïques dont les groupements d'acide carboxylique se superposent et dont la chaîne C-18 converge, comme c'est le cas pour l'acide alpha-calendique. De plus, la distance intermoléculaire CT optimisée entre les atomes C-18 de l'acide punique et l'acide trans- ou cis-vaccénique est plus grande que celle des acides octadécatriénoïques.

Nous avons également montré qu'entre les composés similaires structurellement, la relation entre les scores de similarité optimisés et l'activité biologique n'est pas toujours linéaire. Nous avons aussi déterminé la valeur limite permettant d'évaluer l'activité biologique de cette série d'acides octadécatriénoïques.

Il est certain que la base de données PubChem Compound offre plusieurs outils d'analyse 3-D ainsi que plusieurs informations permettant une évaluation détaillée de la structure moléculaire et de sa relation avec l'activité biologique déterminée expérimentalement. Nous avons montré que ces outils étaient très utiles dans l'évaluation de la relation entre la structure moléculaire 3-D et la puissance cytotoxique d'une série d'acides gras C-18 provenant de certaines plantes. De plus, elle a permis de faire la différence entre des molécules ayant des propriétés physico-chimiques presque identiques.

Et le stress oxydatif dans tout cela?

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires

irréversibles. Il se traduit par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont font partie les radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'ADN avec pour conséquence une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés.

En situation normale, les ERO sont produites en permanence par notre organisme mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Cependant, plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence que de faibles taux sanguins en antioxydants ou en oligoéléments (vitamines C et E, sélénium) sont étroitement associés avec une incidence plus élevée de cancers.

L'équipe de Shinohara et al. (2012) a comparé les effets cytotoxiques, *in vitro*, de huit isomères de l'acide linoléique sur des cellules cancéreuses coloréctales humaines, DLD-1 [388]. Ils ont conclu que l'acide jacarique et l'acide catalpique étaient les plus cytotoxiques et qu'ils induisaient l'apoptose dans les cellules DLD-1 via la peroxydation lipidique sans expliquer le lien entre l'activation de l'apoptose et la peroxydation lipidique. Ils ont également montré une diminution de la taille des tumeurs chez des souris transplantées avec des cellules DLD-1 et nourries au préalable avec de l'acide jacarique pendant une semaine.

Les chercheurs ont mesuré la peroxydation lipidique dans les cellules DLD-1 exposées aux acides gras cytotoxiques les plus puissants. Ils ont utilisé tout d'abord le test TBARS afin de mesurer la quantité de malondialdéhyde, produit final de la peroxydation lipidique. Ensuite, ils ont mesuré la quantité de lipide hydroperoxyde, premier produit issu de la peroxydation lipidique, avec le test LOOH. Enfin, ils ont réalisé un test antioxydant en présence d' α -tocophérol ou de butylhydroxytoluène (BHT) pour quantifier le malondialdéhyde à nouveau.

La peroxydation lipidique est un processus qui fait intervenir les acides gras polyinsaturés, cibles privilégiées des radicaux libres. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH). Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), ils se décomposent en une série de sous-produits dont font partie les aldéhydes.

La malonedialdéhyde (MDA) se mesure de façon fiable par une méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Toutefois, son estimation reste un indice peu représentatif de la présence d'une peroxydation lipidique puisqu'elle ne représente qu'un pourcent des produits de décomposition des peroxydes lipidiques. En revanche, plus sensible et beaucoup plus spécifique est la mesure d'un autre aldéhyde, le 4-hydroxynonéal (HNE) provenant de la dégradation des peroxydes d'acides gras de la famille ω -6.

De plus, pour déterminer l'effet réel d'une peroxydation lipidique sur l'intégrité cellulaire, il faudrait mesurer également la contre-balance des antioxydants. En effet, le plasma humain est riche en antioxydants de petite taille de type hydrophile (acide urique, acide ascorbique (Vit C), glutathion, bilirubine) et lipophile (α -tocophérol (Vit E), rétinol (Vit A), β -carotène, ubiquinone). De plus, les globules rouges sont très riches en enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Dans le cas d'un stress oxydatif, chaque antioxydant est affecté à des degrés divers. Il est dès lors nécessaire d'évaluer de manière plus globale la capacité antioxydante globale d'un échantillon biologique face à un stress oxydant pour conclure à un effet réel.

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés à l'origine de l'apoptose des cellules cancéreuses DLD-1 mise en évidence dans cet article, doit être confirmée par la mesure du potentiel rédox du tissu qui est plus représentatif du stress oxydant total.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les solutions actuellement disponibles pour traiter le cancer de la prostate, présentent des effets secondaires indésirables en plus d'augmenter les risques de développer une résistance aux traitements. L'identification de l'impact majeur, que les conditions de vie peuvent avoir sur le risque de développer un cancer de la prostate a eu pour conséquence le vif intérêt, durant les dernières décennies, pour l'alimentation. Plusieurs études ont mis en évidence l'effet préventif de différents composés naturels extraits des plantes sur le cancer de la prostate. Plus particulièrement, la grenade, fruit au riche passé ethnométrical, figure parmi les fruits les plus intéressants.

La grenade comporte des composés appartenant à différentes classes chimiques dont les effets préventifs, sur le cancer de la prostate, ont été testés, précédemment, sur un système de culture cellulaire, sur un modèle animal et sur une étude clinique humaine de phase II. Différentes préparations de grenade ont été utilisées (huile, jus, péricarpe) [238, 255, 257, 262, 349, 389-391]. Ces travaux ont montré que les extraits de grenade inhibent la croissance des cellules LNCaP, PC-3 et DU 145 sans affecter les cellules épithéliales normales [389]. Ces effets font intervenir des changements dans le cycle cellulaire et induisent l'apoptose.

Nos résultats ont permis d'identifier parmi treize composés extraits de la grenade, un composé particulièrement puissant, l'acide punique. Il induit des effets antiprolifératifs et antiandrogéniques dans les cellules LNCaP, en plus d'induire l'apoptose via la voie PI3K/Akt. Cette voie est constitutivement active dans les cellules LNCaP et représente une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer de la prostate car elle intervient, entre autre, dans l'évolution du cancer vers un état hormono-résistant.

L'acide jacarique, un isomère de l'acide punique provenant de l'arbre *Jacaranda mimosifolia* est un acide gras polyinsaturé qui présente trois doubles liaisons conjuguées et une structure cis, trans, cis comme celle de l'acide punique. Il induit l'apoptose dans les lignées cellulaires cancéreuses de la prostate androgène-dépendantes et -indépendantes. Il active la voie apoptotique extrinsèque et intrinsèque dans les cellules LNCaP et induit l'apoptose intrinsèque dans les cellules PC-3. C'est le composé le plus cytotoxique pour les cellules cancéreuses de la prostate après l'acide punique. Une analyse 3-D a permis de constater que la structure cis, trans, cis des deux isomères était associée à un effet cytotoxique plus puissant sur les cellules cancéreuses.

Une étude plus approfondies reste cependant nécessaire pour identifier la structure spécifique susceptible d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate ainsi que les facteurs induisant l'activation d'une voie apoptotique au détriment de l'autre ou des deux à la fois. Il s'agit également de comprendre le mécanisme de fonctionnement activé en fonction de la lignée cellulaire dans laquelle s'opère l'apoptose.

L'acide punique et jacarique sont les composés les plus actifs identifiés. Ils induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate et peuvent être utilisés pour prévenir le cancer de la prostate. Cependant, leurs propriétés pharmacocinétiques doivent être déterminées pour permettre leur utilisation. En effet, il est important de connaître leur absorption par les cellules intestinales, leur distribution cellulaire chez l'homme ainsi que les quantités efficaces *in vivo*.

Les travaux de Di Silverio et al. (2003) réalisées sur des souris nudes athymiques transplantées avec des cellules CWR22Rv1 androgènes-dépendantes montrent que la taille des tumeurs chez les souris nourries avec des extraits de grenade a significativement diminuée d'une façon dose dépendante de même que leur taux de PSA [256]. Les souris ont été nourries avec 0.1 % et 0.2 % (poids/vol) d'extraits de grenade. Les doses ont été calculées suivant l'hypothèse selon laquelle un individu en bonne santé pesant approximativement 70 kg peut boire 250 à 500 ml de jus de grenade provenant d'un ou de deux fruits, respectivement. De plus, une étude clinique récente, réalisée par Paller et al. (2012), sur des hommes souffrant d'un cancer de la prostate localisé montre une diminution du taux de PSA chez 13 % des patients ayant reçu les comprimés POMx contenant les extraits de grenade [392]. Ils reçoivent 1 à 3 g de polyphénols extraits de la grenade, correspondant au contenu de 8 oz de jus de grenade pur. Ces comprimés contiennent une quantité plus importante de punicalagin et de ses isomères. Cette étude comporte cependant plusieurs points faibles comme l'absence d'un groupe placebo, l'absence d'un lien dose réponse évident et enfin l'absence d'une étude *in vivo* sur des tissus de prostate pour confirmer le changement dans le taux de PSA .

Les travaux de Tsuzuki et al. (2003) mettent en évidence l'absorption de l'acide punique administré aux rats, en majorité sous sa forme initiale le rendant ainsi plus actif au niveau des cellules cancéreuses contrairement à l'acide α -éléostéarique dont une partie est convertie en acide linoléique moins actif [393]. Cependant, l'absorption de l'acide punique par

les intestins des rats est lente en raison de ses propriétés lipophiles. Les travaux de Cassidy et al. (1996) ont montré que les isoflavones daidzeine et génistéine sont plus facilement absorbés par les intestins et atteignent un pic dans le plasma plus rapidement lorsqu'ils sont liés à un groupement β -glucoside [394]. L'acide punique pourrait être conjugué à une fibre alimentaire hydrosoluble comme l'inuline pour raccourcir son temps d'absorption. De plus, pour augmenter sa biodisponibilité, des techniques tels que les self-microemulsifying drug delivery system (ou SMEDDS) qui forment une microémulsion d'huile dans de l'eau après agitation dans la phase aqueuse pourraient être utilisées. Cette technique favorise la solubilisation d'une substance hydrophobe en formant spontanément des microgouttes avec une surface interfaciale plus large qui a pour conséquence d'augmenter l'absorption du composé hydrophobe dans le tractus digestif. La complexation avec une cyclodextrine peut également être utilisée pour conserver les propriétés structurales et physico-chimiques d'un composé hydrophobe et faciliter son action dans les tissus cibles comme la prostate [395, 396].

Aucune étude ne spécifie les propriétés pharmacocinétiques de l'acide jacarique. De plus la différence structurale entre l'acide jacarique et l'acide punique pouvant favoriser l'absorption de l'un ou de l'autre de ces acides gras doit être déterminée.

Des études récentes ont mis en évidence l'existence d'un lien entre le stress oxydant dans le réticulum endoplasmique et la surexpression de DR5 induisant l'apoptose dans les cellules cancéreuses humaines du foie exposées au guggulstérone (stéroïde naturel présent dans la plante Guggul). L'acide jacarique induit une apoptose extrinsèque dans les cellules LNCaP et surexpime le récepteur de mort cellulaire DR5. Il serait donc intéressant de déterminer le stress oxydant du réticulum endoplasmique suite à l'exposition des cellules LNCaP à l'acide jacarique ainsi que de déterminer son effet sur le facteur de transcription CHOP qui joue un rôle important dans la régulation du DR5.

6 RÉFÉRENCES

1. Tindall, D.J. & Rittmaster, R.S., *The Rationale for Inhibiting 5 alpha-Reductase Isoenzymes in the Prevention and Treatment of Prostate Cancer*. The Journal of Urology, 2008. **179**(4): p. 1235-1242.
2. Giuseppe, C., *Estrogen and prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **102**(4): p. 899-911.
3. Albrecht, M., Jiang, W., Kumi-Diaka, J., Lansky, E.P., Gommersall, L.M., Patel, A., Mansel, R.E., Neeman, I., Geldof, A.A. & Campbell, M.J., *Pomegranate Extracts Potently Suppress Proliferation, Xenograft Growth, and Invasion of Human Prostate Cancer Cells*. Journal of Medicinal Food, 2004. **7**(3): p. 274-283.
4. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P., *Global Cancer Statistics, 2002*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2005. **55**(2): p. 74-108.
5. Giovannucci, E., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Chute, C.C. & Willett, W.C., *A Prospective Study of Dietary Fat and Risk of Prostate Cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 1993. **85**(19): p. 1571-1579.
6. Pienta, K.J. & Esper, P.S., *Is Dietary Fat a Risk Factor for Prostate Cancer?* Journal of the National Cancer Institute, 1993. **85**(19): p. 1538-1541.
7. Lansky, E.P. & Newman, R.A., *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*. Journal of Ethnopharmacology, 2007. **109**(2): p. 177-206.
8. Shukla, S. & Gupta, S., *Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells*. Molecular Carcinogenesis, 2004. **39**(2): p. 114-26.
9. Mehta, R. & Lansky, E.P., *Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (Punica granatum) fruit extracts in a mouse mammary organ culture*. European Journal of Cancer Prevention, 2004. **13**(4): p. 345-8.
10. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A., *Cancer statistics, 2012*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012. **62**(1): p. 10-29.
11. Huggins, C. & Hodges, C.V., *The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland* Archives of Surgery, 1941: p. 209-23.
12. Labrie, F., Cusan, L., Gomez, J.L., Candas, B., Belanger, A., Luu-The, V., Labrie, C. & Simard, J., *From the gene to the clinic: prostate cancer death can now be an exception?* Médecine Sciences, 2003. **19**(10): p. 910-9.
13. Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z. & Ricke, W.A., *Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate*. International Journal of Cancer, 2003. **107**(1): p. 1-10.
14. Per-Anders, A., *Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma*. The Prostate, 1999. **39**(2): p. 135-148.

15. Bonkhoff, H. & Remberger, K., *Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: A stem cell model*. Prostate, 1996. **28**: p. 98-106.
16. Zhou, Z.X., Lane, M.V., Kempainen, J.A., French, F.S. & Wilson, E.M., *Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability*. Molecular Endocrinology, 1995. **9**(2): p. 208-18.
17. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
18. Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R.M., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
19. Shand, R.L. & Gelmann, E.P., *Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis*. Curr Opin Urol, 2006. **16**(3): p. 123-31.
20. Trapman, J. & Brinkmann, A.O., *The androgen receptor in prostate cancer*. Pathology, Research and Practice, 1996. **192**(7): p. 752-60.
21. Gelmann, E.P., *Molecular biology of the androgen receptor*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(13): p. 3001-15.
22. Marivoet, S., Van Dijck, P., Verhoeven, G. & Heyns, W., *Interaction of the 90-kDa heat shock protein with native and in vitro translated androgen receptor and receptor fragments*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1992. **88**(1-3): p. 165-74.
23. Heinlein, C.A. & Chang, C., *Androgen receptor (AR) coregulators: an overview*. Endocrine Reviews, 2002. **23**(2): p. 175-200.
24. Gnanapragasam, V.J., Robson, C.N., Leung, H.Y. & Neal, D.E., *Androgen receptor signalling in the prostate*. BJU International, 2000. **86**(9): p. 1001-13.
25. Heinlein, C.A. & Chang, C., *Androgen receptor in prostate cancer*. Endocrine Reviews, 2004. **25**(2): p. 276-308.
26. Cabrespine, A., Guy, L., Chollet, P., Debiton, E. & Bay, J.O., *Molecular mechanisms involved in hormone resistance of prostate cancer*. Bull Cancer. , 2004. **91**(10): p. 747-57.
27. Debes, J.D. & Tindall, D.J., *The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer*. Cancer Letters, 2002. **187**(1-2): p. 1-7.
28. Sanderson, J.T., *The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals*. Toxicological Sciences, 2006. **94**(1): p. 3-21.
29. Ghayee, H. & Auchus, R., *Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis*. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, 2007. **8**(4): p. 289-300.
30. Bruno, R.D. & Njar, V.C., *Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007. **15**(15): p. 5047-5060.

31. Murray, G.I., *The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy*. Journal of Pathology, 2000. **192**(4): p. 419-26.
32. Ghayee, H.K. & Auchus, R.J., *Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis*. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, 2007. **8**(4): p. 289-300.
33. Hum, D.W., Belanger, A., Levesque, E., Barbier, O., Beaulieu, M., Albert, C., Vallee, M., Guillemette, C., Tchernof, A., Turgeon, D. & Dubois, S., *Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1999. **69**(1-6): p. 413-23.
34. Chouinard, S., Yueh, M.F., Tukey, R.H., Giton, F., Fiet, J., Pelletier, G., Barbier, O. & Belanger, A., *Inactivation by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: the end of androgen signaling*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2008. **109**(3-5): p. 247-53.
35. You, L., *Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes*. Chemico-Biological Interactions, 2004. **147**(3): p. 233-246.
36. Lieberman, S., Bandy, L., Lippman, V. & Roberts, K.D., *Sterol intermediates in the conversion of cholesterol into pregnenolone*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1969. **34**(4): p. 367-71.
37. Chung, B.C., Matteson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K. & Miller, W.L., *Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(23): p. 8962-6.
38. Voutilainen, R. & Miller, W.L., *Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-desmolase), P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1986. **63**(5): p. 1145-50.
39. Voutilainen, R., Tapanainen, J., Chung, B.C., Matteson, K.J. & Miller, W.L., *Hormonal regulation of P450scc (20,22-desmolase) and P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1986. **63**(1): p. 202-7.
40. Akwa, Y., Young, J., Kabbadj, K., Sancho, M.J., Zucman, D., Vourc'h, C., Jung-Testas, I., Hu, Z.Y., Le Goascogne, C., Jo, D.H. & et al., *Neurosteroids: biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1991. **40**(1-3): p. 71-81.
41. Thiboutot, D., Jabara, S., McAllister, J.M., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z. & Clawson, G., *Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1)*. Journal of Investigative Dermatology, 2003. **120**(6): p. 905-14.
42. Luu The, V., Lachance, Y., Labrie, C., Leblanc, G., Thomas, J.L., Strickler, R.C. & Labrie, F., *Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase*. Molecular Endocrinology, 1989. **3**(8): p. 1310-2.

43. Takikawa, H., Fujiyoshi, M., Nishikawa, K. & Yamanaka, M., *Purification of 3 alpha-hydroxysteroid and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenases from human liver cytosol*. *Hepatology*, 1992. **16**(2): p. 365-71.
44. Dumont, M., Luu-The, V., Dupont, E., Pelletier, G. & Labrie, F., *Characterization, expression, and immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase in human skin*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1992. **99**(4): p. 415-21.
45. El-Alfy, M., Luu-The, V., Huang, X.F., Berger, L., Labrie, F. & Pelletier, G., *Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry*. *Endocrinology*, 1999. **140**(3): p. 1481-91.
46. Rheaume, E., Lachance, Y., Zhao, H.F., Breton, N., Dumont, M., de Launoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J. & Labrie, F., *Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads*. *Molecular Endocrinology*, 1991. **5**(8): p. 1147-57.
47. Neville, A.M. & O'Hare, M.J., *Histopathology of the human adrenal cortex*. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 1985. **14**(4): p. 791-820.
48. Nakajin, S., Hall, P.F. & Onoda, M., *Testicular microsomal cytochrome P-450 for C21 steroid side chain cleavage. Spectral and binding studies*. *Journal of Biological Chemistry*, 1981. **256**(12): p. 6134-6139.
49. Cantón, R.F., Sanderson, J.T., Nijmeijer, S., Bergman, Å., Letcher, R.J. & van den Berg, M., *In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: A novel mechanism of action?* *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006. **216**(2): p. 274-281.
50. Havelock, J.C., Auchus, R.J. & Rainey, W.E., *The Rise in Adrenal Androgen Biosynthesis: Adrenarche*. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2004(04): p. 337-347.
51. Peltoketo, H., Isomaa, V., Maentausta, O. & Vihko, R., *Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA*. *FEBS Letters*, 1988. **239**(1): p. 73-7.
52. Lukacik, P., Kavanagh, K.L. & Oppermann, U., *Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006. **248**(1-2): p. 61-71.
53. Luu-The, V., *Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2001. **76**(1-5): p. 143-51.
54. Penning, T.M., Jin, Y., Heredia, V.V. & Lewis, M., *Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003. **85**(2-5): p. 247-55.

55. Rizner, T.L., Lin, H.K., Peehl, D.M., Steckelbroeck, S., Bauman, D.R. & Penning, T.M., *Human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells*. *Endocrinology*, 2003. **144**(7): p. 2922-32.
56. Martel, C., Melner, M.H., Gagne, D., Simard, J. & Labrie, F., *Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1994. **104**(1): p. 103-11.
57. Lephart, E.D. & Simpson, E.R., *Assay of aromatase activity*. *Methods in Enzymology*, 1991. **206**: p. 477-83.
58. Thompson, E.A., Jr. & Siiteri, P.K., *Utilization of Oxygen and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate by Human Placental Microsomes during Aromatization of Androstenedione*. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. **249**(17): p. 5364-5372.
59. Bulun, S.E., Chen, D., Lu, M., Zhao, H., Cheng, Y., Demura, M., Yilmaz, B., Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Su, E., Marsh, E., Hakim, A., Yin, P., Ishikawa, H., Amin, S., Imir, G., Gurates, B., Attar, E., Reierstad, S., Innes, J. & Lin, Z., *Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007. **106**(1-5): p. 81-96.
60. Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B. & Bourguiba, S., *Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003. **1**(1): p. 35.
61. You, L. & Sar, M., *Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal sprague-dawley rats*. *Endocrine*, 1998. **9**(3): p. 253-261.
62. Wright, A.S., Thomas, L.N., Douglas, R.C., Lazier, C.B. & Rittmaster, R.S., *Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat*. *Journal of Clinical Investigation*, 1996. **98**(11): p. 2558-63.
63. Evangelou, A.I., Winter, S.F., Huss, W.J., Bok, R.A. & Greenberg, N.M., *Steroid hormones, polypeptide growth factors, hormone refractory prostate cancer, and the neuroendocrine phenotype*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004. **91**(4): p. 671-683.
64. Gittes, R., *Carcinoma of the prostate*. *N Engl J Med.*, 1991. **24**(324(4)): p. 236-45.
65. Laufer, M., Denmeade, S.R., Sinibaldi, V.J., Carducci, M.A. & Eisenberger, M.A., *Complete androgen blockade for prostate cancer : what went wrong?* *The Journal of Urology*, 2000. **164**(1): p. 3-9.
66. Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G. & Sawyers, C.L., *Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy*. *Nature Medicine*, 2004. **10**(1): p. 33-39.
67. Cheng, H., Snoek, R., Ghaidi, F., Cox, M.E. & Rennie, P.S., *Short hairpin RNA knockdown of the androgen receptor attenuates ligand-independent activation and delays tumor progression*. *Cancer Research*, 2006. **66**(21): p. 10613-20.
68. Yuan, X., Li, T., Wang, H., Zhang, T., Barua, M., Borgesi, R.A., Bublely, G.J., Lu, M.L. & Balk, S.P., *Androgen receptor remains critical for cell-cycle progression in androgen-*

- independent CWR22 prostate cancer cells*. American Journal of Pathology, 2006. **169**(2): p. 682-96.
69. Chodak, G.W., *Maximum androgen blockade: a clinical update*. Rev Urol, 2005. **7 Suppl 5**: p. S13-7.
 70. Klotz, L., *Combined androgen blockade: an update*. Urologic Clinics of North America, 2006. **33**(2): p. 161-6, v-vi.
 71. Shang, Y., Myers, M. & Brown, M., *Formation of the androgen receptor transcription complex*. Molecular Cell, 2002. **9**(3): p. 601-10.
 72. Agus, D.B., Cordon-Cardo, C., Fox, W., Drobnjak, M., Koff, A., Golde, D.W. & Scher, H.I., *Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence*. Journal of the National Cancer Institute, 1999. **91**(21): p. 1869-76.
 73. Denmeade, S.R., Lin, X.S. & Isaacs, J.T., *Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer*. Prostate, 1996. **28**(4): p. 251-65.
 74. Huggins, C. & Hodges, C.V., *Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 1972. **22**(4): p. 232-40.
 75. Isaacs, J.T., *Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death*. Prostate, 1984. **5**(5): p. 545-57.
 76. Knudsen, K.E., Arden, K.C. & Cavenee, W.K., *Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(32): p. 20213-22.
 77. Kyprianou, N. & Isaacs, J.T., *Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration*. Endocrinology, 1988. **122**(2): p. 552-62.
 78. Fitzpatrick, J.M., Anderson, J., Sternberg, C.N., Fleshner, N., Fizazi, K., Rebillard, X., Dogliotti, L., Conti, G., Turesson, I., James, N., Heidenreich, A., Solsona, E., Guillem, V., Herchenhorn, D., Moul, J., van Moorselaar, J., Coetzee, L.J., Wilson, A., Bamias, A., De Wit, R. & Chrisofos, M., *Optimizing treatment for men with advanced prostate cancer: expert recommendations and the multidisciplinary approach*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2008. **68 Suppl 1**: p. S9-S22.
 79. Balk, S.P., *Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer*. Urology, 2002. **60**(3 Suppl 1): p. 132-8; discussion 138-9.
 80. Feldman, B.J. & Feldman, D., *The development of androgen-independent prostate cancer*. Nature Reviews: Cancer, 2001. **1**(1): p. 34-45.
 81. Leewansangtong, S. & Soontrapa, S., *Hormonal ablation therapy for metastatic prostatic carcinoma: a review*. Journal of the Medical Association of Thailand, 1999. **82**(2): p. 192-205.
 82. Klotz, L., *Hormone therapy for patients with prostate carcinoma*. Cancer, 2000. **88**(12 Suppl): p. 3009-14.

83. Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T. & Kallioniemi, O.P., *Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer*. *Cancer Research*, 1997. **57**(2): p. 314-9.
84. Brown, R.S., Edwards, J., Dogan, A., Payne, H., Harland, S.J., Bartlett, J.M. & Masters, J.R., *Amplification of the androgen receptor gene in bone metastases from hormone-refractory prostate cancer*. *Journal of Pathology*, 2002. **198**(2): p. 237-44.
85. Edwards, J., Krishna, N.S., Grigor, K.M. & Bartlett, J.M., *Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer*. *British Journal of Cancer*, 2003. **89**(3): p. 552-6.
86. Waltering, K.K., Helenius, M.A., Sahu, B., Manni, V., Linja, M.J., Janne, O.A. & Visakorpi, T., *Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens*. *Cancer Research*, 2009. **69**(20): p. 8141-9.
87. Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, F.S. & Wilson, E.M., *A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy*. *Cancer Research*, 2001. **61**(11): p. 4315-9.
88. Mellado, B., Codony, J., Ribal, M.J., Visa, L. & Gascon, P., *Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: the role of the androgen receptor pathway*. *Clinical & Translational Oncology*, 2009. **11**(1): p. 5-10.
89. Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., St-Arnaud, R., Giguere, M., Lacourciere, Y., Emond, J. & Monfette, G., *Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists*. *Endocrine Reviews*, 1986. **7**(1): p. 67-74.
90. Makridakis, N., Ross, R.K., Pike, M.C., Chang, L., Stanczyk, F.Z., Kolonel, L.N., Shi, C.Y., Yu, M.C., Henderson, B.E. & Reichardt, J.K., *A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase*. *Cancer Research*, 1997. **57**(6): p. 1020-2.
91. Taplin, M.E., Bubley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N. & Balk, S.P., *Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer*. *New England Journal of Medicine*, 1995. **332**(21): p. 1393-8.
92. Heemers, H.V. & Tindall, D.J., *Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex*. *Endocrine Reviews*, 2007. **28**(7): p. 778-808.
93. Wu, J.D., Haugk, K., Woodke, L., Nelson, P., Coleman, I. & Plymate, S.R., *Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006. **99**(2): p. 392-401.
94. Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G. & Klocker, H., *Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor*. *Cancer Research*, 1994. **54**(20): p. 5474-8.

95. Wallner, L., Dai, J., Escara-Wilke, J., Zhang, J., Yao, Z., Lu, Y., Trikha, M., Nemeth, J.A., Zaki, M.H. & Keller, E.T., *Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchietomized mice*. *Cancer Research*, 2006. **66**(6): p. 3087-3095.
96. Hobisch, A., Eder, I.E., Putz, T., Horninger, W., Bartsch, G., Klocker, H. & Culig, Z., *Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor*. *Cancer Research*, 1998. **58**(20): p. 4640-4645.
97. Lee, E.C. & Tenniswood, M., *Programmed cell death and survival pathways in prostate cancer cells*. *Archives of Andrology*, 2004. **50**(1): p. 27-32.
98. Lee, Y., Jin, Y., Lim, W., Ji, S., Choi, S., Jang, S. & Lee, S., *A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003. **84**(4): p. 463-8.
99. Ueda, T., Bruchovsky, N. & Sadar, M.D., *Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(9): p. 7076-7085.
100. Lee, L.F., Hellendall, R.P., Wang, Y., Haskill, J.S., Mukaida, N., Matsushima, K. & Ting, J.P., *IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration*. *Journal of Immunology*, 2000. **164**(5): p. 2769-75.
101. Araki, S., Omori, Y., Lyn, D., Singh, R.K., Meinbach, D.M., Sandman, Y., Lokeshwar, V.B. & Lokeshwar, B.L., *Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer*. *Cancer Research*, 2007. **67**(14): p. 6854-62.
102. Craft, N., Shostak, Y., Carey, M., Sawyers, C. L. , *A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase*. *nature medecine*, 1999. **5**: p. 280 - 285.
103. Yeh, S., Lin, H.K., Kang, H.Y., Thin, T.H., Lin, M.F. & Chang, C., *From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: A novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(10): p. 5458-5463.
104. Wen, Y., Hu, M.C., Makino, K., Spohn, B., Bartholomeusz, G., Yan, D.H. & Hung, M.C., *HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway*. *Cancer Research*, 2000. **60**(24): p. 6841-5.
105. Zhou, B.P., Hu, M.C., Miller, S.A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S.Y. & Hung, M.C., *HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(11): p. 8027-31.
106. Hall, C.L., Kang, S., MacDougald, O.A. & Keller, E.T., *Role of wnts in prostate cancer bone metastases*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006. **97**(4): p. 661-672.

107. Logan, C.Y. & Nusse, R., *The wnt signaling pathway in development and disease*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2004. **20**(1): p. 781-810.
108. Fanto, M. & McNeill, H., *Planar polarity from flies to vertebrates*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(4): p. 527-533.
109. Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon, A.P. & Jones, S., *A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo*. Development, 1999. **126**(6): p. 1211-1223.
110. Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J. & Ben-Ze'ev, A., *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **109**(8): p. 987-91.
111. Datta, S.R., Brunet, A. & Greenberg, M.E., *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes and Development, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
112. Yardy, G.W. & Brewster, S.F., *Wnt signalling and prostate cancer*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2005. **8**(2): p. 119-126.
113. Emami, K.H. & Corey, E., *When prostate cancer meets bone: Control by wnts*. Cancer Letters, 2007. **253**(2): p. 170-179.
114. Edwards, J. & Bartlett, J.M., *The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways*. BJU International, 2005. **95**(9): p. 1327-35.
115. Ittmann, M.M., *Chromosome 10 alterations in prostate adenocarcinoma (review)*. Oncology Reports, 1998. **5**(6): p. 1329-1335.
116. Stambolic, V., Suzuki, A., De la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P. & Mak, T.W., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
117. Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E. & Sawyers, C.L., *The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(26): p. 15587-15591.
118. Maehama, T. & Dixon, J.E., *PTEN: A tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**(4): p. 125-128.
119. Sun, M., Yang, L., Feldman, R.I., Sun, X.M., Bhalla, K.N., Jove, R., Nicosia, S.V. & Cheng, J.Q., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(44): p. 42992-3000.
120. Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K.M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C.A., Korsmeyer, S. & Buttyan, R., *Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers*. American Journal of Pathology, 1993. **143**(2): p. 390-400.

121. Hobisch, A., Culig, Z., Radmayr, C., Bartsch, G., Klocker, H. & Hittmair, A., *Androgen receptor status of lymph node metastases from prostate cancer*. Prostate, 1996. **28**(2): p. 129-35.
122. Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Meisner, L.F., Chang, C., Choon, A., Reznikoff, C.R., Bova, G.S., Friedl, A. & Jarrard, D.F., *Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer*. Cancer Research, 2000. **60**(13): p. 3623-30.
123. Li, L.C., Carroll, P.R. & Dahiya, R., *Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment*. Journal of the National Cancer Institute, 2005. **97**(2): p. 103-15.
124. Li, L.C., Okino, S.T. & Dahiya, R., *DNA methylation in prostate cancer*. Biochimica et Biophysica Acta, 2004. **1704**(2): p. 87-102.
125. Coppola, V., De Maria, R. & Bonci, D., *MicroRNAs and prostate cancer*. Endocrine-Related Cancer, 2010. **17**(1): p. F1-17.
126. Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., Ittmann, M. & Ozen, M., *The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2010. **13**(3): p. 208-17.
127. Isaacs, J.T., *The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?* Urologic Clinics of North America, 1999. **26**(2): p. 263-73.
128. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(16): p. 1655-64.
129. Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. & Mantovani, A., *The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2008. **66**(1): p. 1-9.
130. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
131. Blood, C.H. & Zetter, B.R., *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1990. **1032**(1): p. 89-118.
132. Yilmaz, M., Celen, Z., Sevinc, A. & Karakok, M., *Widespread metastases in small cell carcinoma of the prostate on FDG PET/CT*. Clinical Nuclear Medicine, 2009. **34**(9): p. 598-600.
133. Rodenhiser, D.I., *Epigenetic contributions to cancer metastasis*. Clinical and Experimental Metastasis, 2009. **26**(1): p. 5-18.
134. Igney, F.H. & Krammer, P.H., *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nature Reviews: Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
135. Woods, N.T., Yamaguchi, H., Lee, F.Y., Bhalla, K.N. & Wang, H.G., *Anoikis, initiated by Mcl-1 degradation and Bim induction, is deregulated during oncogenesis*. Cancer Research, 2007. **67**(22): p. 10744-52.
136. Mawji, I.A., Simpson, C.D., Gronda, M., Williams, M.A., Hurren, R., Henderson, C.J., Datti, A., Wrana, J.L. & Schimmer, A.D., *A chemical screen identifies anisomycin as an*

- anoikis sensitizer that functions by decreasing FLIP protein synthesis.* Cancer Research, 2007. **67**(17): p. 8307-8315.
137. He, W., Kularatne, S.A., Kalli, K.R., Prendergast, F.G., Amato, R.J., Klee, G.G., Hartmann, L.C. & Low, P.S., *Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands.* International Journal of Cancer, 2008. **123**(8): p. 1968-73.
 138. Ewing, J., *The General Pathological Conception of Cancer.* Canadian Medical Association Journal, 1935. **33**(2): p. 125-35.
 139. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889.* Cancer and Metastasis Reviews, 1989. **8**(2): p. 98-101.
 140. Taichman, R.S., Cooper, C., Keller, E.T., Pienta, K.J., Taichman, N.S. & McCauley, L.K., *Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone.* Cancer Research, 2002. **62**(6): p. 1832-1837.
 141. Janni, W., Vogl, F.D., Wiedswang, G., Synnestvedt, M., Fehm, T., Jückstock, J., Borgen, E., Rack, B., Braun, S., Sommer, H., Solomayer, E., Pantel, K., Nesland, J., Friese, K. & Naume, B., *Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse - A European pooled analysis.* Clinical Cancer Research, 2011. **17**(9): p. 2967-2976.
 142. Morgan, C. & Wagstaff, J., *Is there a role for ibandronate in the treatment of prostate cancer patients with bony metastases?* Acta Oncologica, 2009. **48**(6): p. 882-889.
 143. Vessella, R.L., Pantel, K. & Mohla, S., *Tumor cell dormancy: an NCI workshop report.* Cancer Biology & Therapy, 2007. **6**(9): p. 1496-504.
 144. Wikman, H., Vessella, R. & Pantel, K., *Cancer micrometastasis and tumour dormancy.* APMIS, 2008. **116**(7-8): p. 754-770.
 145. Holcomb, I.N., Grove, D.I., Kinnunen, M., Friedman, C.L., Gallaher, I.S., Morgan, T.M., Sather, C.L., Delrow, J.J., Nelson, P.S., Lange, P.H., Ellis, W.J., True, L.D., Young, J.M., Hsu, L., Trask, B.J. & Vessella, R.L., *Genomic alterations indicate tumor origin and varied metastatic potential of disseminated cells from prostate cancer patients.* Cancer Research, 2008. **68**(14): p. 5599-608.
 146. Visvader, J.E. & Lindeman, G.J., *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.* Nature Reviews: Cancer, 2008. **8**(10): p. 755-68.
 147. Paller, C.J., Carducci, M.A. & Philips, G.K., *Management of bone metastases in refractory prostate cancer--role of denosumab.* Clinical Interventions in Aging, 2012. **7**: p. 363-72.
 148. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death.* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
 149. Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. & Takahashi, R., *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.* Molecular Cell, 2001. **8**(3): p. 613-21.

150. Martins, L.M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N.F., Lemoine, N.R., Savopoulos, J., Gray, C.W., Creasy, C.L., Dingwall, C. & Downward, J., *The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(1): p. 439-44.
151. van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. & Vandenabeele, P., *The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity*. Cell Death and Differentiation, 2002. **9**(1): p. 20-6.
152. Suzuki, Y., Takahashi-Niki, K., Akagi, T., Hashikawa, T. & Takahashi, R., *Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways*. Cell Death and Differentiation, 2004. **11**(2): p. 208-16.
153. Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M. & Kroemer, G., *AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis*. Oncogene, 2004. **23**(8): p. 1514-21.
154. Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J. & Ameisen, J.C., *Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli*. Journal of Cell Biology, 2002. **159**(6): p. 923-9.
155. Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L. & De Maria, R., *Apoptosis in normal and cancer stem cells*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2008. **66**(1): p. 42-51.
156. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M., *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
157. Green, D.R., *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. Cell, 2000. **102**(1): p. 1-4.
158. Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J., *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
159. Reed, J.C., *Apoptosis-based therapies*. Nature Reviews: Drug Discovery, 2002. **1**(2): p. 111-21.
160. Goodin, S., Rao, K.V. & DiPaola, R.S., *State-of-the-art treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer*. Oncologist, 2002. **7**(4): p. 360-70.
161. DiPaola, R.S., Patel, J. & Rafi, M.M., *Targeting apoptosis in prostate cancer*. Hematology/Oncology Clinics of North America, 2001. **15**(3): p. 509-24.
162. Ponder, B.A., *Cancer genetics*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 336-41.
163. Reed, J.C., *Apoptosis-targeted therapies for cancer*. Cancer Cell, 2003. **3**(1): p. 17-22.
164. Xu, L., Frederik, P., Pirollo, K.F., Tang, W.H., Rait, A., Xiang, L.M., Huang, W., Cruz, I., Yin, Y. & Chang, E.H., *Self-assembly of a virus-mimicking nanostructure system for efficient tumor-targeted gene delivery*. Human Gene Therapy, 2002. **13**(3): p. 469-81.

165. Gjertsen, B.T., Logothetis, C.J. & McDonnell, T.J., *Molecular regulation of cell death and therapeutic strategies for cell death induction in prostate carcinoma*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1998. **17**(4): p. 345-51.
166. Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J., *BCL-2 family: regulators of cell death*. *Annual Review of Immunology*, 1998. **16**: p. 395-419.
167. Reed, J.C., *Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies*. *Seminars in Hematology*, 1997. **34**(4 Suppl 5): p. 9-19.
168. Makin, G. & Dive, C., *Apoptosis and cancer chemotherapy*. *Trends in Cell Biology*, 2001. **11**(11): p. S22-6.
169. Konopleva, M., Zhao, S., Hu, W., Jiang, S., Snell, V., Weidner, D., Jackson, C.E., Zhang, X., Champlin, R., Estey, E., Reed, J.C. & Andreeff, M., *The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells*. *British Journal of Haematology*, 2002. **118**(2): p. 521-34.
170. Furuya, Y., Krajewski, S., Epstein, J.I., Reed, J.C. & Isaacs, J.T., *Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers*. *Clinical Cancer Research*, 1996. **2**(2): p. 389-98.
171. Beale, P.J., Rogers, P., Boxall, F., Sharp, S.Y. & Kelland, L.R., *BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma*. *British Journal of Cancer*, 2000. **82**(2): p. 436-40.
172. Del Bufalo, D., Biroccio, A., Trisciuoglio, D., Bruno, T., Floridi, A., Aquino, A. & Zupi, G., *Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used*. *European Journal of Cancer*, 2002. **38**(18): p. 2455-62.
173. DiPaola, R.S. & Aisner, J., *Overcoming bcl-2- and p53-mediated resistance in prostate cancer*. *Seminars in Oncology*, 1999. **26**(1 Suppl 2): p. 112-6.
174. Ferlini, C., Raspaglio, G., Mozzetti, S., Distefano, M., Filippetti, F., Martinelli, E., Ferrandina, G., Gallo, D., Ranelletti, F.O. & Scambia, G., *Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance*. *Molecular Pharmacology*, 2003. **64**(1): p. 51-8.
175. Reed, J.C., *Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer*. *Advances in Pharmacology*, 1997. **41**: p. 501-32.
176. Grad, J.M., Zeng, X.R. & Boise, L.H., *Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT*. *Current Opinion in Oncology*, 2000. **12**(6): p. 543-9.
177. Lebedeva, I., Rando, R., Ojwang, J., Cossum, P. & Stein, C.A., *Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity*. *Cancer Research*, 2000. **60**(21): p. 6052-60.
178. Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. & Fesik, S.W., *X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death*. *Nature*, 1996. **381**(6580): p. 335-41.

179. Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J.I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S. & Reed, J.C., *Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers*. American Journal of Pathology, 1996. **148**(5): p. 1567-76.
180. Gleave, M., Nelson, C. & Chi, K., *Antisense targets to enhance hormone and cytotoxic therapies in advanced prostate cancer*. Current Drug Targets, 2003. **4**(3): p. 209-21.
181. Reed, J.C., *Bcl-2 family proteins and the hormonal control of cell life and death in normalcy and neoplasia*. Vitamins and Hormones, 1997. **53**: p. 99-138.
182. Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A. & Rabinowich, H., *Disruption of Mcl-1.Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(16): p. 16383-92.
183. O'Driscoll, L., Cronin, D., Kennedy, S.M., Purcell, R., Linehan, R., Glynn, S., Larkin, A., Scanlon, K., McDermott, E.W., Hill, A.D., O'Higgins, N.J., Parkinson, M. & Clynes, M., *Expression and prognostic relevance of Mcl-1 in breast cancer*. Anticancer Research, 2004. **24**(2A): p. 473-82.
184. Amirghofran, Z., Monabati, A. & Gholijani, N., *Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer*. Pathology Oncology Research, 2004. **10**(1): p. 37-41.
185. Huang, Z., *Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6627-31.
186. Simonian, P.L., Grillot, D.A. & Nunez, G., *Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1208-16.
187. Reed, J.C., *Double identity for proteins of the Bcl-2 family*. Nature, 1997. **387**(6635): p. 773-6.
188. Reed, J.C., Jurgensmeier, J.M. & Matsuyama, S., *Bcl-2 family proteins and mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 127-37.
189. Korsmeyer, S.J., *BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death*. Cancer Research, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1693s-1700s.
190. Ni Chonghaile, T. & Letai, A., *Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells*. Oncogene, 2008. **27** Suppl 1: p. S149-57.
191. Chan, S.L. & Yu, V.C., *Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2004. **31**(3): p. 119-28.
192. Giam, M., Huang, D.C. & Bouillet, P., *BH3-only proteins and their roles in programmed cell death*. Oncogene, 2008. **27** Suppl 1: p. S128-36.
193. Van Poppel, H. & Tombal, B., *Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements*. Cancer Management and Research, 2011. **3**: p. 91-100.
194. Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B.E. & Mack, T.M., *Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County*. British Journal of Cancer, 1991. **63**(6): p. 963-6.

195. Moradi, T., Delfino, R.J., Bergstrom, S.R., Yu, E.S., Adami, H.O. & Yuen, J., *Cancer risk among Scandinavian immigrants in the US and Scandinavian residents compared with US whites, 1973-89*. *European Journal of Cancer Prevention*, 1998. 7(2): p. 117-25.
196. Blair, A. & Fraumeni, J.F., *Geographic patterns of prostate cancer in the United States*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1978. 61(6): p. 1379-84.
197. Rose, D.P., Boyar, A.P. & Wynder, E.L., *International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption*. *Cancer*, 1986. 58(11): p. 2363-71.
198. Lee, M.M., Wang, R.T., Hsing, A.W., Gu, F.L., Wang, T. & Spitz, M., *Case-control study of diet and prostate cancer in China*. *Cancer Causes and Control*, 1998. 9(6): p. 545-52.
199. Augustsson, K., Michaud, D.S., Rimm, E.B., Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J., Willett, W.C. & Giovannucci, E., *A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2003. 12(1): p. 64-7.
200. Huncharek, M., Muscat, J. & Kupelnick, B., *Dairy products, dietary calcium and vitamin D intake as risk factors for prostate cancer: a meta-analysis of 26,769 cases from 45 observational studies*. *Nutrition and Cancer*, 2008. 60(4): p. 421-41.
201. Gao, X., LaValley, M.P. & Tucker, K.L., *Prospective studies of dairy product and calcium intakes and prostate cancer risk: a meta-analysis*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005. 97(23): p. 1768-77.
202. Qin, L.Q., Xu, J.Y., Wang, P.Y., Tong, J. & Hoshi, K., *Milk consumption is a risk factor for prostate cancer in Western countries: evidence from cohort studies*. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2007. 16(3): p. 467-76.
203. Giovannucci, E., Rimm, E.B., Wolk, A., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. & Willett, W.C., *Calcium and fructose intake in relation to risk of prostate cancer*. *Cancer Research*, 1998. 58(3): p. 442-7.
204. Chan, J.M., Stampfer, M.J., Ma, J., Gann, P., Gaziano, J.M., Pollak, M. & Giovannucci, E., *Insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002. 94(14): p. 1099-106.
205. Pollak, M.N., Schernhammer, E.S. & Hankinson, S.E., *Insulin-like growth factors and neoplasia*. *Nature Reviews: Cancer*, 2004. 4(7): p. 505-18.
206. Gunnell, D., Oliver, S.E., Peters, T.J., Donovan, J.L., Persad, R., Maynard, M., Gillatt, D., Pearce, A., Hamdy, F.C., Neal, D.E. & Holly, J.M., *Are diet-prostate cancer associations mediated by the IGF axis? A cross-sectional analysis of diet, IGF-I and IGFBP-3 in healthy middle-aged men*. *British Journal of Cancer*, 2003. 88(11): p. 1682-6.
207. Carmody, J., Olendzki, B., Reed, G., Andersen, V. & Rosenzweig, P., *A dietary intervention for recurrent prostate cancer after definitive primary treatment: results of a randomized pilot trial*. *Urology*, 2008. 72(6): p. 1324-8.
208. Ghosh, J. & Myers, C.E., Jr., *Arachidonic acid metabolism and cancer of the prostate*. *Nutrition*, 1998. 14(1): p. 48-9.

209. Colli, J.L. & Colli, A., *International comparisons of prostate cancer mortality rates with dietary practices and sunlight levels*. Urologic Oncology, 2006. **24**(3): p. 184-94.
210. Colli, J.L. & Colli, A., *Comparisons of prostate cancer mortality rates with dietary practices in the United States*. Urologic Oncology, 2005. **23**(6): p. 390-8.
211. Perabo, F.G., Von Low, E.C., Ellinger, J., von Rucker, A., Muller, S.C. & Bastian, P.J., *Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2008. **11**(1): p. 6-12.
212. Aronson, W.J., Tymchuk, C.N., Elashoff, R.M., McBride, W.H., McLean, C., Wang, H. & Heber, D., *Decreased growth of human prostate LNCaP tumors in SCID mice fed a low-fat, soy protein diet with isoflavones*. Nutrition and Cancer, 1999. **35**(2): p. 130-6.
213. Klein, E.A., *Chemoprevention of prostate cancer*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2005. **54**(1): p. 1-10.
214. Hedlund, T.E., Johannes, W.U. & Miller, G.J., *Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro*. Prostate, 2003. **54**(1): p. 68-78.
215. Zhao, R., Xiang, N., Domann, F.E. & Zhong, W., *Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells*. Nutrition and Cancer, 2009. **61**(3): p. 397-407.
216. Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z. & Sarkar, F.H., *Multi-targeted therapy of cancer by genistein*. Cancer Letters, 2008. **269**(2): p. 226-42.
217. Etminan, M., Takkouche, B. & Caamano-Isorna, F., *The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 2004. **13**(3): p. 340-5.
218. Haseen, F., Cantwell, M.M., O'Sullivan, J.M. & Murray, L.J., *Is there a benefit from lycopene supplementation in men with prostate cancer? A systematic review*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2009. **12**(4): p. 325-32.
219. Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiahu, T., Levy, J. & Sharoni, Y., *Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells*. Nutrition and Cancer, 1999. **33**(1): p. 105-12.
220. Karas, M., Amir, H., Fishman, D., Danilenko, M., Segal, S., Nahum, A., Koifmann, A., Giat, Y., Levy, J. & Sharoni, Y., *Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells*. Nutrition and Cancer, 2000. **36**(1): p. 101-11.
221. Kirsh, V.A., Mayne, S.T., Peters, U., Chatterjee, N., Leitzmann, M.F., Dixon, L.B., Urban, D.A., Crawford, E.D. & Hayes, R.B., *A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 2006. **15**(1): p. 92-8.
222. Afaq, F., Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.H., Khan, N., Zaid, M.A. & Mukhtar, H., *Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables*,

- protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis.* Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(1): p. 222-32.
223. Hafeez, B.B., Siddiqui, I.A., Asim, M., Malik, A., Afaq, F., Adhami, V.M., Saleem, M., Din, M. & Mukhtar, H., *A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor-kappaB signaling.* Cancer Research, 2008. **68**(20): p. 8564-72.
224. Yun, J.M., Afaq, F. & Mukhtar, H., *Dietary anthocyanidin delphinidin modulates β -catenin signaling pathway in human prostate cancer PC-3 cells.* Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; San Diego, CA, U.S.A., 2008: p. p. 08-AB-5381-AACR.
225. Mukhtar, H., Adhami, V.M., Afaq, F., Saleem, M., Sarfaraz, S. & Khan, N., *Delphinidin induces apoptosis and growth inhibition of prostate cancer PC-3 cells via inhibition of Notch-1 and NF- κ B/PI3K pathways.* The Centennial Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2007: p. 375.
226. Vijayababu, M.R., Kanagaraj, P., Arunkumar, A., Ilangovan, R., Dharmarajan, A. & Arunakaran, J., *Quercetin induces p53-independent apoptosis in human prostate cancer cells by modulating Bcl-2-related proteins: a possible mediation by IGFBP-3.* Oncology Research, 2006. **16**(2): p. 67-74.
227. Lee, D.H., Szczepanski, M. & Lee, Y.J., *Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells.* Biochemical Pharmacology, 2008. **75**(12): p. 2345-55.
228. Vijayababu, M.R., Kanagaraj, P., Arunkumar, A., Ilangovan, R., Aruldas, M.M. & Arunakaran, J., *Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2005. **131**(11): p. 765-71.
229. Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Kanagaraj, P., Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G. & Arunakaran, J., *Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3).* Molecular and Cellular Biochemistry, 2006. **287**(1-2): p. 109-16.
230. Sarkar, F.H. & Li, Y., *Indole-3-carbinol and prostate cancer.* Journal of Nutrition, 2004. **134**(12 Suppl): p. 3493S-3498S.
231. Adhami, V.M., Siddiqui, I.A., Ahmad, N., Gupta, S. & Mukhtar, H., *Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer.* Cancer Research, 2004. **64**(23): p. 8715-22.
232. Kazi, A., Wang, Z., Kumar, N., Falsetti, S.C., Chan, T.H. & Dou, Q.P., *Structure-activity relationships of synthetic analogs of (-)-epigallocatechin-3-gallate as proteasome inhibitors.* Anticancer Research, 2004. **24**(2B): p. 943-54.
233. Siddiqui, I.A., Adhami, V.M., Afaq, F., Ahmad, N. & Mukhtar, H., *Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells.* Journal of Cellular Biochemistry, 2004. **91**(2): p. 232-42.

234. Hastak, K., Gupta, S., Ahmad, N., Agarwal, M.K., Agarwal, M.L. & Mukhtar, H., *Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(31): p. 4851-9.
235. Gupta, S., Hussain, T. & Mukhtar, H., *Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003. **410**(1): p. 177-85.
236. Johnson, J.J., Bailey, H.H. & Mukhtar, H., *Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective*. *Phytomedicine*, 2010. **17**(1): p. 3-13.
237. Adhami, V.M., Ahmad, N. & Mukhtar, H., *Molecular Targets for Green Tea in Prostate Cancer Prevention*. *Journal of Nutrition*, 2003. **133**(7): p. 2417S-2424.
238. Malik A, M.H., *Prostate cancer prevention through pomegranate fruit*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(4): p. 371-3.
239. Hopkins, C.Y. & Chisholm, M.J., *A survey of the conjugated fatty acids of seed oils*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1968. **45**(3): p. 176-82.
240. Hornung, E., Pernstich, C. & Feussner, I., *Formation of conjugated Delta11Delta13-double bonds by Delta12-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds*. *European Journal of Biochemistry*, 2002. **269**(19): p. 4852-4859.
241. Tsuyuki, H., Ito, S., and Nakatsukasa, Y., *Lipids in pomegranate seeds*. *Nihon Daigaku No-Juigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku*, 1981. **38**: p. 141-148.
242. Dalimov, D.N., Dalimova, G.N. & Bhatt, M., *Chemical Composition and Lignins of Tomato and Pomegranate Seeds*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2003. **39**(1): p. 37-40.
243. Wang, R.F., Xie, W.D., Zhang, Z., Xing, D.M., Ding, Y., Wang, W., Ma, C. & Du, L.J., *Bioactive Compounds from the Seeds of Punica granatum (Pomegranate)*. *Journal of Natural Products*, 2004. **67**(12): p. 2096-2098.
244. Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G. & Heber, D., *In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice*. *J Nutr Biochem*, 2005. **16**(6): p. 360-7.
245. Waheed, S., Siddique, N., Rahman, A., Zaidi, J. & Ahmad, S., *INAA for dietary assessment of essential and other trace elements in fourteen fruits harvested and consumed in Pakistan*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2004. **260**(3): p. 523-531.
246. Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y. & Vuorela, P.M., *Studies on the toxicity of Punica granatum L. (Punicaceae) whole fruit extracts*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. **89**(2-3): p. 295-300.
247. Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. & Kader, A.A., *Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. **48**(10): p. 4581-4589.

248. Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D. & Mukhtar, H., *Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice*. International Journal of Cancer, 2005. **113**(3): p. 423-33.
249. Kim, N.D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B. & Lansky, E., *Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (Punica granatum) for human breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 2002. **71**(3): p. 203-217.
250. Kawaii, S. & Lansky, E.P., *Differentiation-Promoting Activity of Pomegranate (Punica granatum) Fruit Extracts in HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells*. Journal of Medicinal Food, 2004. **7**(1): p. 13-18.
251. Toi, M., Bando, H., Ramachandran, C., Melnick, S., Imai, A., Fife, R., Carr, R., Oikawa, T. & Lansky, E., *Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo*. Angiogenesis, 2003. **6**(2): p. 121-128.
252. Hora, J.J., Maydew, E.R., Lansky, E.P. & Dwivedi, C., *Chemopreventive Effects of Pomegranate Seed Oil on Skin Tumor Development in CD1 Mice*. Journal of Medicinal Food, 2003. **6**(3): p. 157-161.
253. Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K. & Tanaka, T., *Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats*. Cancer Science, 2004. **95**(6): p. 481-486.
254. Schubert, S.Y., Neeman, I. & Resnick, N., *A novel mechanism for the inhibition of NFkB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants*. FASEB Journal, 2002: p. 02-0147fje.
255. Seeram, N.P., Aronson, W.J., Zhang, Y., Henning, S.M., Moro, A., Lee, R.-p., Sartippour, M., Harris, D.M., Rettig, M., Suchard, M.A., Pantuck, A.J., Belldegrun, A. & Heber, D., *Pomegranate Ellagitannin-Derived Metabolites Inhibit Prostate Cancer Growth and Localize to the Mouse Prostate Gland*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(19): p. 7732-7737.
256. Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Syed, D.N. & Mukhtar, H., *Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(41): p. 14813-8.
257. Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G. & Heber, D., *In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(6): p. 360-367.
258. Narayanan, B.A., Geoffroy, O., Willingham, M.C., Re, G.G. & Nixon, D.W., *p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells*. Cancer Letters, 1999. **136**(2): p. 215-221.
259. Heber, D., *Pomegranate Ellagitannins*, in *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, I.F.F. Benzie and S. Wachtel-Galor, Editors. 2011: Boca Raton (FL).

260. Schubert, S.Y., Neeman, I. & Resnick, N., *A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants*. FASEB Journal, 2002. **16**(14): p. 1931-3.
261. Lansky, E., Harrison, G., Froom, P. & Jiang, W., *Pomegranate (Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™*. Investigational New Drugs, 2005. **23**(2): p. 121-122.
262. Lansky, E.P., Jiang, W., Mo, H., Bravo, L., Froom, P., Yu, W., Harris, N.M., Neeman, I. & Campbell, M.J., *Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions*. Investigational New Drugs, 2005. **23**(1): p. 11-20.
263. Suzuki, R., Noguchi, R., Ota, T., Abe, M., Miyashita, K. & Kawada, T., *Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells*. Lipids, 2001. **36**(5): p. 477-82.
264. Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S. & Tonogai, Y., *High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits*. Journal of Chromatography A, 2000. **896**(1-2): p. 87-93.
265. Huang, T.H., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D. & Li, Y., *Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005. **207**(2): p. 160-9.
266. Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C. & Chung, J.G., *Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells*. Anticancer Research, 2005. **25**(2A): p. 971-9.
267. Veluri, R., Singh, R.P., Liu, Z., Thompson, J.A., Agarwal, R. & Agarwal, C., *Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells*. Carcinogenesis, 2006. **27**(7): p. 1445-53.
268. Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A. & Packer, L., *Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(1): p. 166-71.
269. Bagchi, D., Sen, C.K., Bagchi, M. & Atalay, M., *Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula*. Biochemistry (Mosc.), 2004. **69**(1): p. 75-80, 1 p preceding 75.
270. Hou, D.X., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terahara, N., Yoshimoto, M. & Fujii, M., *Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved*. International Journal of Oncology, 2003. **23**(3): p. 705-12.
271. Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N.C., Tavazzi, B. & Galvano, G., *Cyanidins: metabolism and biological properties*. J Nutr Biochem, 2004. **15**(1): p. 2-11.
272. van Elswijk, D.A., Schobel, U.P., Lansky, E.P., Irth, H. & van der Greef, J., *Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (Punica granatum) using on-line*

- biochemical detection coupled to mass spectrometry*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(2): p. 233-41.
273. Ackland, M.L., van de Waarsenburg, S. & Jones, R., *Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines*. *In Vivo*, 2005. **19**(1): p. 69-76.
274. Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G. & Swinnen, J.V., *Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(7): p. 5636-45.
275. Jin, U.H., Chung, T.W., Kang, S.K., Suh, S.J., Kim, J.K., Chung, K.H., Gu, Y.H., Suzuki, I. & Kim, C.H., *Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification*. *Clinica Chimica Acta*, 2005. **362**(1-2): p. 57-64.
276. Lansky, E.P. & Newman, R.A., *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*. *J Ethnopharmacol*, 2007. **109**(2): p. 177-206.
277. Kelavkar, U.P., Hutzley, J., Dhir, R., Kim, P., Allen, K.G. & McHugh, K., *Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6:omega-3 ratio in diet: athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy*. *Neoplasia*, 2006. **8**(2): p. 112-24.
278. Dorai, T., Dutcher, J.P., Dempster, D.W. & Wiernik, P.H., *Therapeutic potential of curcumin in prostate cancer--V: Interference with the osteomimetic properties of hormone refractory C4-2B prostate cancer cells*. *Prostate*, 2004. **60**(1): p. 1-17.
279. Khor, T.O., Keum, Y.S., Lin, W., Kim, J.H., Hu, R., Shen, G., Xu, C., Gopalakrishnan, A., Reddy, B., Zheng, X., Conney, A.H. & Kong, A.N., *Combined inhibitory effects of curcumin and phenethyl isothiocyanate on the growth of human PC-3 prostate xenografts in immunodeficient mice*. *Cancer Research*, 2006. **66**(2): p. 613-21.
280. Shukla, Y. & Singh, M., *Cancer preventive properties of ginger: a brief review*. *Food and Chemical Toxicology*, 2007. **45**(5): p. 683-90.
281. Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R. & Kim, A.L., *Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007. **224**(3): p. 274-83.
282. Ratan, H.L., Steward, W.P., Gescher, A.J. & Mellon, J.K., *Resveratrol--a prostate cancer chemopreventive agent?* *Urologic Oncology*, 2002. **7**(6): p. 223-7.
283. Shih, A., Zhang, S., Cao, H.J., Boswell, S., Wu, Y.H., Tang, H.Y., Lennartz, M.R., Davis, F.B., Davis, P.J. & Lin, H.Y., *Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C-alpha*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004. **3**(11): p. 1355-64.
284. Athar, M., Back, J.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R. & Kim, A.L., *Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009. **486**(2): p. 95-102.

285. Norrish, A.E., Jackson, R.T., Sharpe, S.J. & Skeaff, C.M., *Men who consume vegetable oils rich in monounsaturated fat: their dietary patterns and risk of prostate cancer (New Zealand)*. *Cancer Causes and Control*, 2000. **11**(7): p. 609-615.
286. Terry, P.D., Terry, J.B. & Rohan, T.E., *Long-Chain (n-3) Fatty Acid Intake and Risk of Cancers of the Breast and the Prostate: Recent Epidemiological Studies, Biological Mechanisms, and Directions for Future Research*. *Journal of Nutrition*, 2004. **134**(12): p. 3412S-3420.
287. Astorg, P., *Dietary n – 6 and n – 3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prostate Cancer Risk: A Review of Epidemiological and Experimental Evidence*. *Cancer Causes and Control*, 2004. **15**(4): p. 367-386.
288. Augustsson, K., Michaud, D.S., Rimm, E.B., Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J., Willett, W.C. & Giovannucci, E., *A Prospective Study of Intake of Fish and Marine Fatty Acids and Prostate Cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(1): p. 64-67.
289. Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S.H. & Young, C.Y., *Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(3): p. 409-14.
290. Yuan, H., Gong, A. & Young, C.Y., *Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(4): p. 793-801.
291. Mills, P.K., Beeson, W.L., Phillips, R.L. & Fraser, G.E., *Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men*. *Cancer*, 1989. **64**(3): p. 598-604.
292. Giovannucci, E., *A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer*. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 2002. **227**(10): p. 852-9.
293. Helzlsouer, K.J., Huang, H.Y., Alberg, A.J., Hoffman, S., Burke, A., Norkus, E.P., Morris, J.S. & Comstock, G.W., *Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000. **92**(24): p. 2018-23.
294. Marshall, J.R., Tangen, C.M., Sakr, W.A., Wood, D.P., Jr., Berry, D.L., Klein, E.A., Lippman, S.M., Parnes, H.L., Alberts, D.S., Jarrard, D.F., Lee, W.R., Gaziano, J.M., Crawford, E.D., Ely, B., Ray, M., Davis, W., Minasian, L.M. & Thompson, I.M., Jr., *Phase III trial of selenium to prevent prostate cancer in men with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: SWOG S9917*. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 2011. **4**(11): p. 1761-9.
295. Rodriguez, C., McCullough, M.L., Mondul, A.M., Jacobs, E.J., Fakhrabadi-Shokoohi, D., Giovannucci, E.L., Thun, M.J. & Calle, E.E., *Calcium, dairy products, and risk of prostate cancer in a prospective cohort of United States men*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2003. **12**(7): p. 597-603.
296. Ye, S.F., Ichimura, K., Wakame, K. & Ohe, M., *Suppressive effects of Active Hexose Correlated Compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress*. *Life Sciences*, 2003. **74**(5): p. 593-602.

297. Terakawa, N., Matsui, Y., Satoi, S., Yanagimoto, H., Takahashi, K., Yamamoto, T., Yamao, J., Takai, S., Kwon, A.H. & Kamiyama, Y., *Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled trial*. Nutrition and Cancer, 2008. **60**(5): p. 643-51.
298. Hisatake, J.I., Ikezoe, T., Carey, M., Holden, S., Tomoyasu, S. & Koeffler, H.P., *Down-regulation of prostate-specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ in human prostate cancer*. Cancer Research, 2000. **60**(19): p. 5494-5498.
299. Clark, L.C. & Marshall, J.R., *Randomized, controlled chemoprevention trials in populations at very high risk for prostate cancer: Elevated prostate-specific antigen and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*. Urology, 2001. **57**(4 Suppl 1): p. 185-7.
300. Clark, L.C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Witherington, R., Herlong, J.H., Janosko, E., Carpenter, D., Borosso, C., Falk, S. & Rounder, J., *Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial*. British Journal of Urology, 1998. **81**(5): p. 730-4.
301. Turner, J. & Chaudhary, U., *Dramatic prostate-specific antigen response with activated hemicellulose compound in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Anti-Cancer Drugs, 2009. **20**(3): p. 215-6.
302. Demark-Wahnefried, W., Aziz, N.M., Rowland, J.H. & Pinto, B.M., *Riding the crest of the teachable moment: promoting long-term health after the diagnosis of cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(24): p. 5814-30.
303. Fang, J.L., Vaca, C.E., Valsta, L.M. & Mutanen, M., *Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition*. Carcinogenesis, 1996. **17**(5): p. 1035-40.
304. Nair, J., Vaca, C.E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L.M. & Bartsch, H., *High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 1997. **6**(8): p. 597-601.
305. Cosgrove, J.P., Church, D.F. & Pryor, W.A., *The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids*. Lipids, 1987. **22**(5): p. 299-304.
306. Okuyama, H., Kobayashi, T. & Watanabe, S., *Dietary fatty acids--the N-6/N-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative N-3 deficiency syndrome seen in Japan*. Progress in Lipid Research, 1996. **35**(4): p. 409-57.
307. Takahashi, M., Tsuboyama-Kasaoka, N., Nakatani, T., Ishii, M., Tsutsumi, S., Aburatani, H. & Ezaki, O., *Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production*. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, 2002. **282**(2): p. G338-48.
308. Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Vidgen, E., Agarwal, S., Rao, A.V., Rosenberg, R.S., Diamandis, E.P., Novokmet, R., Mehling, C.C., Perera, T., Griffin, L.C. & Cunnane, S.C., *Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids*,

- oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial.* American Journal of Clinical Nutrition, 1999. **69**(3): p. 395-402.
309. Miano, L., [*Mediterranean diet, micronutrients and prostate carcinoma: a rationale approach to primary prevention of prostate cancer*]. Archivio Italiano di Urologia, Andrologia, 2003. **75**(3): p. 166-78.
 310. Virtamo, J., Pietinen, P., Huttunen, J.K., Korhonen, P., Malila, N., Virtanen, M.J., Albanes, D., Taylor, P.R. & Albert, P., *Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up.* JAMA, 2003. **290**(4): p. 476-85.
 311. Hayden, K.M., Welsh-Bohmer, K.A., Wengreen, H.J., Zandi, P.P., Lyketsos, C.G. & Breitner, J.C., *Risk of mortality with vitamin E supplements: the Cache County study.* American Journal of Medicine, 2007. **120**(2): p. 180-4.
 312. Fleshner, N.E., *Vitamin E and prostate cancer.* Urologic Clinics of North America, 2002. **29**(1): p. 107-13, ix.
 313. Venkateswaran, V., Fleshner, N.E. & Klotz, L.H., *Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines.* Journal of Urology, 2002. **168**(4 Pt 1): p. 1578-82.
 314. Redman, C., Scott, J.A., Baines, A.T., Basye, J.L., Clark, L.C., Calley, C., Roe, D., Payne, C.M. & Nelson, M.A., *Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines.* Cancer Letters, 1998. **125**(1-2): p. 103-10.
 315. Chan, J.M., Gann, P.H. & Giovannucci, E.L., *Role of diet in prostate cancer development and progression.* Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(32): p. 8152-60.
 316. Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., Parsons, J.K., Bearden, J.D., 3rd, Crawford, E.D., Goodman, G.E., Claudio, J., Winkquist, E., Cook, E.D., Karp, D.D., Walther, P., Lieber, M.M., Kristal, A.R., Darke, A.K., Arnold, K.B., Ganz, P.A., Santella, R.M., Albanes, D., Taylor, P.R., Probstfield, J.L., Jagpal, T.J., Crowley, J.J., Meyskens, F.L., Jr., Baker, L.H. & Coltman, C.A., Jr., *Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT).* JAMA, 2009. **301**(1): p. 39-51.
 317. Chan, J.M., Stampfer, M.J., Ma, J., Gann, P.H., Gaziano, J.M. & Giovannucci, E.L., *Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study.* American Journal of Clinical Nutrition, 2001. **74**(4): p. 549-54.
 318. Kubota, T., Koshizuka, K., Koike, M., Uskokovic, M., Miyoshi, I. & Koeffler, H.P., *19-nor-26,27-bishomo-vitamin D3 analogs: a unique class of potent inhibitors of proliferation of prostate, breast, and hematopoietic cancer cells.* Cancer Research, 1998. **58**(15): p. 3370-5.
 319. John, E.M., Koo, J. & Schwartz, G.G., *Sun exposure and prostate cancer risk: evidence for a protective effect of early-life exposure.* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 2007. **16**(6): p. 1283-6.

320. Schwartz, G.G. & Hanchette, C.L., *UV, latitude, and spatial trends in prostate cancer mortality: all sunlight is not the same (United States)*. *Cancer Causes and Control*, 2006. **17**(8): p. 1091-101.
321. Costello, L.C. & Franklin, R.B., *Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer*. *Prostate*, 1998. **35**(4): p. 285-96.
322. Costello, L.C., Feng, P., Milon, B., Tan, M. & Franklin, R.B., *Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve*. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2004. **7**(2): p. 111-7.
323. Kristal, A.R. & Lampe, J.W., *Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence*. *Nutrition and Cancer*, 2002. **42**(1): p. 1-9.
324. Wan XS, Z.Z., Steele V, Kopelovich L, Kennedy AR., *Establishment and characterization of sublines of LNCaP human prostate cancer cells*. *Oncol Rep*, 2003. **10**(5): p. 1569-75.
325. Coffey, D.S. & Isaacs, J.T., *Requirements for an idealized animal model of prostatic cancer*. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1980. **37**: p. 379-91.
326. Loop, S.M., Rozanski, T.A. & Ostenson, R.C., *Human primary prostate tumor cell line, ALVA-31: A new model for studying the hormonal regulation of prostate tumor cell growth*. *Prostate*, 1993. **22**(2): p. 93-108.
327. Nakhla, A.M. & Rosner, W., *Characterization of ALVA-41 cells, a new human prostatic cancer cell line*. *Steroids*, 1994. **59**(10): p. 586-589.
328. Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A. & Murphy, G.P., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. *Cancer Research*, 1983. **43**(4): p. 1809-1818.
329. Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G.J.M., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., Van Rooij, H.C.J., Trapman, J., Brinkmann, A.O. & Mulder, E., *A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990. **173**(2): p. 534-540.
330. Jana, N.R., Sarkar, S., Ishizuka, M., Yonemoto, J., Tohyama, C. & Sone, H., *Cross-Talk between 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Testosterone Signal Transduction Pathways in LNCaP Prostate Cancer Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **256**(3): p. 462-468.
331. Poletti, A., Negri-Cesi, P. & Martini, L., *Reflections on the diseases linked to mutations of the androgen receptor*. *Endocrine*, 2005. **28**(3): p. 243-62.
332. Bayne, C.W., Donnelly, F., Chapman, K., Bollina, P., Buck, C. & Habib, F.K., *A Novel Coculture Model for Benign Prostatic Hyperplasia Expressing Both Isoforms of 5{alpha}-Reductase*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998. **83**(1): p. 206-213.
333. Long, B.J., Grigoryev, D.N., Nnane, I.P., Liu, Y., Ling, Y.-Z. & Brodie, A.M., *Antiandrogenic Effects of Novel Androgen Synthesis Inhibitors on Hormone-dependent Prostate Cancer*. *Cancer Research*, 2000. **60**(23): p. 6630-6640.

334. Kaighn, M.E., *Culture of human prostatic cells*. Cancer Detection and Prevention, 1979. 2(4): p. 579-586.
335. Okada, K. & Schröder, F.H., *Human prostatic carcinoma in cell culture: Preliminary report on the development and characterization of an epithelial cell line (EB 33)*. Urological Research, 1974. 2(3): p. 111-121.
336. Claas, F.H.J. & Van Steenbrugge, G.J., *Expression of HLA-like structures on a permanent human tumor line PC-93*. Tissue Antigens, 1983. 21(3): p. 227-232.
337. Iizumi, T., Yazaki, T. & Kanoh, S., *Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-PR1)*. Journal of Urology, 1987. 137(6): p. 1304-1306.
338. Muraki, J., Addonizio, J.C., Choudhury, M.S., Fischer, J., Eshghi, M., Davidian, M.M., Shapiro, L.R., Wilmot, P.L., Nagamatsu, G.R. & Chiao, J.W., *Establishment of new human prostatic cancer cell line (JCA-1)*. Urology, 1990. 36(1): p. 79-84.
339. Narayan, S., Rajakumar, G., Prouix, H. & Singh, P., *Estradiol is trophic for colon cancer in mice: effect on ornithine decarboxylase and c-myc messenger RNA*. Gastroenterology, 1992. 103(6): p. 1823-32.
340. Brothman, A.R., Lesho, L.J., Somers, K.D., Wright Jr, G.L. & Merchant, D.J., *Phenotypic and cytogenetic characterization of a cell line derived from primary prostatic carcinoma*. International Journal of Cancer, 1989. 44(5): p. 898-903.
341. Gingrich, J.R., Tucker, J.A., Walther, P.J., Day, J.W., Poulton, S.H.M. & Webb, K.S., *Establishment and characterization of a new human prostatic carcinoma cell line (DuPro-1)*. Journal of Urology, 1991. 146(3): p. 915-919.
342. Albin, A., Iwamoto, Y. & Kleinman, H.K., *A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells*. Cancer Research, 1987. 47(12): p. 3239-3245.
343. Fong, C.J., Sutkowski, D.M., Kozlowski, J.M. & Lee, C., *Utilization of the Boyden chamber to further characterize in vitro migration and invasion of benign and malignant human prostatic epithelial cells*. Invasion and Metastasis, 1992. 12(5-6): p. 264-274.
344. Lee, C., Shevrin, D.H. & Kozlowski, J.M., *In vivo and in vitro approaches to study metastasis in human prostatic cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 1993. 12(1): p. 21-28.
345. Bello, D., Webber, M.M., Kleinman, H.K., Wartinger, D.D. & Rhim, J.S., *Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18*. Carcinogenesis, 1997. 18(6): p. 1215-23.
346. Torres, J.M., Ruiz, E. & Ortega, E., *Development of a quantitative RT-PCR method to study 5 α -reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status*. Prostate, 2003. 56(1): p. 74-9.
347. Liao, S. & Hiipakka, R.A., *Selective inhibition of steroid 5 α -reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. 214(3): p. 833-8.
348. Liang, T. & Liao, S., *Inhibition of steroid 5 α -reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids*. Biochemical Journal, 1992. 285 (Pt 2): p. 557-62.

349. Hong, M.Y., Seeram, N.P. & Heber, D., *Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor*. J Nutr Biochem, 2008. **19**(12): p. 848-55.
350. Iguchi, K., Toyama, T., Ito, T., Shakui, T., Usui, S., Oyama, M., Iinuma, M. & Hirano, K., *Antiandrogenic Activity of Resveratrol Analogs in Prostate Cancer LNCaP Cells*. Journal of Andrology, 2012. **33**(6): p. 1208-15.
351. Dotan, N., Wasser, S.P. & Mahajna, J., *Inhibition of the androgen receptor activity by Coprinus comatus substances*. Nutrition and Cancer, 2011. **63**(8): p. 1316-27.
352. Gao, N., Zhang, Z., Jiang, B.H. & Shi, X., *Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **310**(4): p. 1124-32.
353. Chuu, C.P., Chen, R.Y., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A. & Liao, S., *Suppression of androgen receptor signaling and prostate specific antigen expression by (-)-epigallocatechin-3-gallate in different progression stages of LNCaP prostate cancer cells*. Cancer Letters, 2009. **275**(1): p. 86-92.
354. Lin, H.K., Hu, Y.C., Yang, L., Altuwaijri, S., Chen, Y.T., Kang, H.Y. & Chang, C., *Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(51): p. 50902-7.
355. Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L. & Heidenreich, K.A., *Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(44): p. 9993-10002.
356. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. Cell Death and Differentiation, 1999. **6**(11): p. 1028-42.
357. Zimmermann, K.C., Bonzon, C. & Green, D.R., *The machinery of programmed cell death*. Pharmacology and Therapeutics, 2001. **92**(1): p. 57-70.
358. Reed, J.C., *Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance*. Current Opinion in Oncology, 1995. **7**(6): p. 541-6.
359. Revelos, K., Petraki, C., Gregorakis, A., Scorilas, A., Papanastasiou, P. & Koutsilieris, M., *Immunohistochemical expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy*. Anticancer Research, 2005. **25**(4): p. 3123-33.
360. Grossmann, M.E., Mizuno, N.K., Schuster, T. & Cleary, M.P., *Punicic acid is an omega-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation*. International Journal of Oncology, 2010. **36**(2): p. 421-6.
361. Allard, J.P., Kurian, R., Aghdassi, E., Muggli, R. & Royall, D., *Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans*. Lipids, 1997. **32**(5): p. 535-41.
362. Roomi, M.W., Ivanov, V., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A. & Rath, M., *Anti-tumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, and epigallocatechin gallate on prostate*

- cancer cell lines PC-3, LNCaP, and DU145*. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 2004. **115-116**: p. 251-64.
363. Siddiqui, I.A., Malik, A., Adhami, V.M., Asim, M., Hafeez, B.B., Sarfaraz, S. & Mukhtar, H., *Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis*. Oncogene, 2008. **27**(14): p. 2055-63.
 364. Brusselmans, K., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G. & Swinnen, J.V., *Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells*. International Journal of Cancer, 2003. **106**(6): p. 856-62.
 365. Gupta, S., Ahmad, N., Nieminen, A.L. & Mukhtar, H., *Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2000. **164**(1): p. 82-90.
 366. Paschka, A.G., Butler, R. & Young, C.Y., *Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Cancer Letters, 1998. **130**(1-2): p. 1-7.
 367. Zhang, Y., Seeram, N.P., Lee, R., Feng, L. & Heber, D., *Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(3): p. 670-5.
 368. Karin, M. & Greten, F.R., *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nature Reviews: Immunology, 2005. **5**(10): p. 749-59.
 369. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
 370. Tamatani, M., Che, Y.H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T. & Tohyama, M., *Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(13): p. 8531-8.
 371. Carroll, A.G., Voeller, H.J., Sugars, L. & Gelmann, E.P., *p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines*. Prostate, 1993. **23**(2): p. 123-34.
 372. Yasui, Y., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T. & Miyashita, K., *Troglitazone and 9-cis,11-trans,13-trans-Conjugated Linolenic Acid: Comparison of Their Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Effects on Different Colon Cancer Cell Lines*. Chemotherapy, 2006. **52**(5): p. 220-225.
 373. Yasui, Y., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T. & Miyashita, K., *Growth Inhibition and Apoptosis Induction by All-trans-conjugated Linolenic Acids on Human Colon Cancer Cells*. Anticancer Research, 2006. **26**(3A): p. 1855-1860.
 374. Yasui, Y., Hosokawa, M., Sahara, T., Suzuki, R., Ohgiya, S., Kohno, H., Tanaka, T. & Miyashita, K., *Bitter gourd seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon*

- cancer Caco-2 cells*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2005. **73**(2): p. 113-119.
375. Suzuki, R., Yasui, Y., Kohno, H., Miyamoto, S., Hosokawa, M., Miyashita, K. & Tanaka, T., *Catalpa seed oil rich in 9t,11t,13c-conjugated linolenic acid suppresses the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rats*. Oncology Reports, 2006. **16**(5): p. 989-96.
376. Chen, X., Thakkar, H., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S.K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N. & Srivastava, R.K., *Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer*. Oncogene, 2001. **20**(42): p. 6073-83.
377. Voelkel-Johnson, C., King, D.L. & Norris, J.S., *Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL*. Cancer Gene Therapy, 2002. **9**(2): p. 164-72.
378. Shankar, S., Chen, Q., Siddiqui, I., Sarva, K. & Srivastava, R.K., *Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential*. J Mol Signal, 2007. **2**: p. 7.
379. Christian, P.A., Thorpe, J.A. & Schwarze, S.R., *Velcade sensitizes prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis and suppresses tumor growth in vivo*. Cancer Biology & Therapy, 2009. **8**(1): p. 73-80.
380. Gartel, A.L., *p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm?* Biofactors, 2009. **35**(2): p. 161-4.
381. Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M.C. & Holbrook, N.J., *p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells*. Oncogene, 1997. **14**(8): p. 929-35.
382. Kadowaki, Y., Chari, N.S., Teo, A.E., Hashi, A., Spurgers, K.B. & McDonnell, T.J., *PI3 Kinase inhibition on TRAIL-induced apoptosis correlates with androgen-sensitivity and p21 expression in prostate cancer cells*. Apoptosis, 2011. **16**(6): p. 627-35.
383. Gasmi, J. & Sanderson, J.T., *Growth inhibitory, antiandrogenic, and pro-apoptotic effects of punicic acid in LNCaP human prostate cancer cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(23): p. 12149-12156.
384. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-336.
385. Hague, A., Diaz, G.D., Hicks, D.J., Krajewski, S., Reed, J.C. & Paraskeva, C., *bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis*. International Journal of Cancer, 1997. **72**(5): p. 898-905.
386. Reed, J.C., *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. Journal of Cell Biology, 1994. **124**(1-2): p. 1-6.

387. Pourzand, C., Rossier, G., Reelfs, O., Borner, C. & Tyrrell, R.M., *Overexpression of Bcl-2 inhibits UVA-mediated immediate apoptosis in rat 6 fibroblasts: evidence for the involvement of Bcl-2 as an antioxidant*. *Cancer Research*, 1997. **57**(8): p. 1405-11.
388. Shinohara, N., Tsuduki, T., Ito, J., Honma, T., Kijima, R., Sugawara, S., Arai, T., Yamasaki, M., Ikezaki, A., Yokoyama, M., Nishiyama, K., Nakagawa, K., Miyazawa, T. & Ikeda, I., *Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. **1821**(7): p. 980-8.
389. Albrecht, M., Jiang, W., Kumi-Diaka, J., Lansky, E.P., Gommersall, L.M., Patel, A., Mansel, R.E., Neeman, I., Geldof, A.A. & Campbell, M.J., *Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells*. *Journal of Medicinal Food*, 2004. **7**(3): p. 274-83.
390. Lansky, E.P., Harrison, G., Froom, P. & Jiang, W.G., *Pomegranate (Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel*. *Investigational New Drugs*, 2005. **23**(2): p. 121-2.
391. Pantuck, A.J., Zomorodian, N. & Belldgrun, A.S., *Phase-II Study of pomegranate juice for men with prostate cancer and increasing PSA*. *Curr Urol Rep*, 2006. **7**(1): p. 7.
392. Paller, C.J., Ye, X., Wozniak, P.J., Gillespie, B.K., Sieber, P.R., Greengold, R.H., Stockton, B.R., Hertzman, B.L., Efros, M.D., Roper, R.P., Liker, H.R. & Carducci, M.A., *A randomized phase II study of pomegranate extract for men with rising PSA following initial therapy for localized prostate cancer*. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2013. **16**(1): p. 50-5.
393. Tsuzuki, T., Igarashi, M., Komai, M. & Miyazawa, T., *The metabolic conversion of 9,11,13-eleostearic acid (18:3) to 9,11-conjugated linoleic acid (18:2) in the rat*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2003. **49**(3): p. 195-200.
394. Cassidy, A., *Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks*. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1996. **55**(1B): p. 399-417.
395. Shen, Q., Li, X., Yuan, D. & Jia, W., *Enhanced oral bioavailability of daidzein by self-microemulsifying drug delivery system*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010. **58**(5): p. 639-43.
396. Lee, S.H., Kim, Y.H., Yu, H.J., Cho, N.S., Kim, T.H., Kim, D.C., Chung, C.B., Hwang, Y.I. & Kim, K.H., *Enhanced bioavailability of soy isoflavones by complexation with beta-cyclodextrin in rats*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007. **71**(12): p. 2927-33.