

## Etude du métabolisme du cholestérol dans la progression et la résistance des cancers mammaires et identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Maud Voisin

### ► To cite this version:

Maud Voisin. Etude du métabolisme du cholestérol dans la progression et la résistance des cancers mammaires et identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT: 2015TOU30274. tel-02005733

## HAL Id: tel-02005733 https://theses.hal.science/tel-02005733

Submitted on 4 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





En vue de l'obtention du

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

#### Présentée et soutenue le 29/09/2015 par : Maud VOISIN

Etude du métabolisme du cholestérol dans la progression et la résistance des cancers mammaires et identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Vincent Cavaillès Gérard Lizard Bruno Ségui Sandrine Silvente-Poirot Marc Poirot JURY DR, INSERM Montpellier CR, INSERM Dijon PU-PH, Université Toulouse III DR, INSERM Toulouse DR, INSERM Toulouse

Rapporteur Rapporteur Président du jury Directeur Directeur

École doctorale et spécialité :

 $BSB: Biotechnologies, \ Cancérologie$ 

Unité de Recherche :

Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (INSERM UMR 1037, Equipe 12) Directeur(s) de Thèse :

Sandrine Silvente-Poirot et Marc Poirot

#### **Rapporteurs** :

Vincent Cavaillès et Gérard Lizard

A ma famille,

Si toute vie va inévitablement vers sa fin, nous devons durant la nôtre, la colorier avec nos couleurs d'amour et d'espoir Marc Chagall

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Bruno Ségui, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse. Je remercie le Docteur Vincent Cavaillès et le Docteur Gérard Lizard d'avoir accepté d'évaluer mon travail doctoral, en tant que rapporteurs dans mon jury de thèse. Je vous exprime toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Un très grand remerciement à mes deux directeurs de thèse le Docteur Sandrine Silvente-Poirot et le Docteur Marc Poirot. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de votre équipe et d'avoir accepté de me confier ce projet, auquel je tiens particulièrement. J'ai énormément appris, si ce n'est tout, au cours de ces quatre ans et demi passés avec vous. Merci de m'avoir patiemment guidée durant cette thèse, votre passion et vos connaissances sans limites. Merci pour votre présence et vos conseils éclairés. Je vous suis très reconnaissante d'avoir fait confiance à une petite étudiante de M2 Chimie qui est devenue, grâce à vous, une biologiste/chimiste redoutable prête à affronter un post-doc aux USA !!

Je remercie le docteur Michel Record pour ses précieux conseils, sa présence et ses encouragements pendant toutes ces années.

Je remercie l'Ecole Doctorale de Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse d'avoir soutenu mon projet de thèse en m'accordant un financement du MENRT pour les trois premières années de ma thèse, ainsi qu'à Claire et Sylvia pour leur aide administrative, tout au long de mon doctorat. Je remercie aussi l'ARC ainsi que ses donateurs d'avoir financé ma quatrième année de thèse et d'avoir porté l'espoir que ce sujet puisse aboutir un jour à de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer.

Je tiens à remercier du fond du cœur l'ensemble de l'équipe de Marc et Sandrine. Désolée pour l'humeur ronchon de ces derniers mois, les cernes et le mode "auto-repeat" sur le manuscrit et la soutenance de thèse.

Philippe, merci d'avoir commencé le travail sur l'OCDO plusieurs années avant que je n'arrive au laboratoire. Merci d'avoir partagé ton bureau, tes nombreuses publis et tes grandes connaissances avec moi. Je te remercie également pour ta patience lors de discussions, de manips ou lorsque que nous écoutions Christophe Maé dans le bureau (seul moyen pour te faire fuir).

Greg, je te remercie pour cette démonstration de thèse réussie avec brio. Moi, jeune thésarde, avais intérêt à assurer la relève.

Emmanuel, je te remercie pour ta gentillesse et ton calme olympien. Je suis ravie d'avoir vécu ces années de thèse en parallèle avec toi.

Marion, merci pour ton authenticité, tes connaissances, ta générosité, ton immense soutien et tes conseils de grande sœur. Merci pour nos soirées balcon, nos « raleries » et nos éclats de rire.

Nini, merci pour ton soutien et ton mauvais caractère (je sais de quoi je parle). Je suis contente de cette complicité qui existe entre nous et que seules nous deux pouvons comprendre.

Elodie, merci pour tes encouragements, ta joie de vivre et ta gaité, que j'ai beaucoup appréciée et qui m'ont même été indispensables les derniers mois de thèse. Merci pour nos thés partagés ainsi que nos sessions running, pas faciles tous les jours, mais dont je garde un très bon souvenir (on va courir demain ?).

Aurélie, merci pour ta générosité, ta patience, ton expertise en *in vivo* et pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de ma thèse. Ma thèse n'aurait pas été la même sans toi au labo, ni lors de nos nombreuses soirées « à la maison ».

Nicolas, chef des opérations, merci pour ton calme, ta sérénité, ton grand sens de l'humour et ton aide lors de tous mes problèmes d'ordre informatique.

Mathilde, merci pour ta bonne humeur communicative. J'ai vraiment apprécié tous nos moments, « scolaires » comme extrascolaires.

Régis, merci. Ce fut un grand plaisir de travailler quelques temps avec toi et de t'initier sur quelques manips de biologie. J'espère que tu me pardonneras mon impatience.

Je remercie l'ensemble des stagiaires du laboratoire : Clément, Morgan, Pascale, Jérémy, Laura, le « fantôme », Laura, Arnaud, et plus particulièrement Anne et Marie de leur aide et de leur patience lors des derniers mois de ma thèse, lorsque que j'étais en plein rush.

Je remercie tout particulièrement Florence, qui s'est beaucoup impliquée dans mon projet, qui a toujours su se rendre disponible et qui m'a beaucoup aidée lors de la dernière ligne droite. Merci pour ton aide précieuse et ta grande gentillesse.

Je remercie également Frédéric et Sévérine, ainsi que nos anciens physiciens Manuel, Daphné, Sarah, Thibault, Allan et Alice.

Je remercie le service d'anapath et le CRB de l'Institut Claudius Regaud, et plus particulièrement Magali, Philippe, Audrey, Sophie, Loubna, et Laurence d'avoir participé à ce beau travail. Merci pour votre collaboration.

Je remercie tous nos collaborateurs, notamment Frédéric Pont du plateau de lipidomique et l'ensemble de nos aides techniques et scientifiques, les plateaux, les services in vivo de l'ICR et de Purpan, les services de la laverie et nos secrétaires.

Je remercie la société Affichem pour notre collaboration et plus particulièrement Stéphane Silvente et Frédéric Thivet.

Je remercie tous les membres présents et passés des équipes qui nous ont entourés à l'ICR ou au CRCT, avec un remerciement spécial pour les personnes qui m'ont soutenue et encouragée et pour qui j'ai beaucoup d'affection, Iotefa, Christine, Agnese, Nicolas, Olivier, Magda, Faten, Perrinette, Jouliette, Laurette, Nico, Antony, Benoit, Magalie, Quentin, Diane-Charlotte, Héléna, Sonia, Clément, Mathilde, Quentin, Mathilde, Marine et Thomas. Estelle, rien que pour toi mais tu fais un peu partie du labo, merci pour cette belle année au CRCT !! Merci pour ta bonne humeur ou tes râleries, qui réchauffent nos journées à tous et particulièrement les miennes. Je suis certaine que nos chemin se recroiseront. Je remercie ma « famille » Gym Suédoise. Ma thèse sans la Gym Suédoise, impossible. Merci pour tous ces moments de bonne humeur, de transpiration, de défoulement, et d'amitié. Je pense tout particulièrement à Léa, Judith, Sandra, Laure, Alice, Tiphaine, Maelle, Sophie, Amandine, Cindy, Camille, Barbara, Sarah, Faustine, Florence, Lucie, Maymouna et Juan.

Je voudrais remercier sincèrement mes meilleures amies, Louise et Alison. A vous deux, je ne trouve pas les mots pour décrire le soutien inconditionnel que vous avez été depuis que nous nous connaissons et à quel point j'ai pu passer des moments incroyables avec vous. Je vous aime, vous êtes ma deuxième famille, je suis sûre que toutes les trois on fera les quatre cent coups à la maison de retraite dans cinquante ans !

Tifania et Fanny, mes amies avec un grand A, je n'ai pas été à la hauteur de votre amitié ces derniers temps, alors que vous êtes toujours là pour moi. J'espère que vous savez à quel point vous comptez pour moi. Notre amitié m'est très précieuse, j'espère vraiment qu'elle dépassera les années et les frontières !!

Un grand merci à Tic et Tac, pour votre bonne humeur, vos encouragements et nos éclats de rire ! Ma thèse n'aurait pas été la même sans vous. J'espère vous voir très vite !

Léa et Daphné, mes petites mamans qui m'ont plus qu'aidée et même fourni un toit pendant quelques semaines ou mois, je vous remercie. Merci pour votre soutien et notre profonde amitié. Je sais bien que nous allons nous voir assez souvent, n'est-ce pas Daphné ?!

Enfin, un immense merci à ma famille, qui a toujours été derrière moi et sur qui je peux toujours compter. Granny, pour ta force et ta bienveillance, Joëlle et Franck pour m'avoir accompagnée dans la vie, et fait découvrir le sens du mot famille. Merci pour votre amour. Merci à ma sœur Esther, à Fabrice et à Mathis, que j'aime fort. Bien sûr un immense merci à mes parents sans qui je ne serais rien, merci pour votre amour irremplaçable et inconditionnel. Merci de votre confiance sans fin, de m'avoir toujours soutenue, portée et encouragée tout au long de mon parcours universitaire, de m'avoir donné le goût du travail, et l'envie de me dépasser. Maman, je sais que ma rédaction n'a pas été une partie de plaisir, promis c'est la dernière fois. Cette thèse est aussi la votre. J'espère que vous êtes fiers de moi. Je vous aime plus que tout.

Cette thèse en mon nom est finalement le travail d'une très grande équipe. Merci infiniment à tous !

# SOMMAIRE

ABREVIATIONS	5
TABLE DES FIGURES	9
RESUME1	3
ABSTRACT 1	5
INTRODUCTION1	7
Chapitre I - Le cancer du sein1	9
A. La glande mammaire chez la femme2	21
1. Anatomie et histologie2	21
2. Développement et contrôle2	23
a) Développement de la glande mammaire2	23
b) Contrôle du développement de la glande mammaire2	24
3. Les récepteurs hormonaux et l'oncogène HER2 2	24
a) Récepteurs aux œstrogènes	24
b) Récepteurs de la progestérone2	28
c) L'oncogène HER2	:9
B. Les cancers du sein	:9
1. Généralités, épidémiologie et facteurs à risque2	:9
2. Processus tumoral	51
a) D'une cellule au cancer	51
b) Principales mutations associées au cancer du sein	2
c) Biosynthèse et rôle des œstrogènes dans le cancer du sein	64
3. Les différents types de cancer du sein	5
a) Classification histologique	6
b) Classification moléculaire	6
4. Les traitements des cancers du sein	8

a)	La chirurgie	38
b)	La radiothérapie	39
c)	Agents anti-cancéreux	40
5. R	ésistance des cancers du sein à l'hormonothérapie	46
Chapitre	II - Le métabolisme du cholestérol <sup>2</sup>	19
A. Le c	cholestérol	51
1. St	tructure du cholestérol	51
2. R	ôle physiologique du cholestérol	51
3. L	es différentes sources du cholestérol	54
4. H	oméostasie du cholestérol	58
5. C	ontrôle transcriptionnel de la synthèse du cholestérol	58
a)	Elimination de l'excès de cholestérol	59
6. L	e cholestérol dans les cancers du sein	59
B. Les	oxystérols	53
1. Se	ource	54
2. Fe	ormation	55
a)	Formation par auto-oxydation	55
b)	Formation par voie enzymatique	58
c)	Effets biologiques des oxystérols	59
C. Le r	nétabolisme des 5,6-époxycholestanols	75
1. L	a Cholestérol Epoxyde Hydrolase : ChEH	75
a)	Caractérisation et pharmacologie	75
b)	Activité ChEH et cancer	77
2. L	es 5,6-époxycholestanols (5,6-EC)	78
a)	Structure des 5,6-EC	78
b)	Réactivité des 5,6-EC	79
c)	Précurseurs des dendrogénines	30
d)	5,6-EC métabolites et cancer	82

Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2	
(11HSD1 et 11HSD2)	5
A. Métabolisme des glucocorticoïdes	7
1. Cortisone et cortisol	7
a) Synthèse et Rôle	7
b) Leurs effets via les récepteurs nucléaires9	0
B. Les 11β-Hydroxystéroides déshydrogénases de type 1 et de type 2 (11HSD1 & 11HSD2)	ي ک
1. Deux enzymes distinctes	7
2. Gènes et protéines des 11HSD1 & 11HSD299	8
a) Gènes codant pour les 11HSD1 & 11HSD29	8
b) Protéines 11HSD1 & 11HSD210	1
c) Souris invalidées pour l'expression de la HSD1B1 et HSD11B2 10	5
3. 11HSD1 & 11HSD2 : sens de réaction et substrats10	7
a) Activité 11HSD110	7
b) Activité 11HSD211	3
4. La 11HSD1 et 11HSD2 comme cibles thérapeutiques ? 114	4
OBJECTIFS DE LA THESE121	
RESULTATS	3
Article 1 :	5
Article 2 :	3
Article 3 :	1
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	1
BIBLIOGRAPHIE	3

# **ABREVIATIONS**

11HSD1	type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenase
11HSD2	type 2 11β-hydroxysteroid dehydrogenase
17β-HSD	17β-hydroxysteroid deshydrogenase
l7-oxoLCA	Acide 7-oxolithocholique
24-ОНС	24-hydroxycholesterol
27-ОНС	27-hydroxycholesterol
3-HSD	$3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4-isomerase
5,6-EC	5,6-epoxicholestanols
5,6a-EC	5,6α-epoxycholestanol
5,6β-ΕС	5,6β-epoxycholestanol
6-ketocholestanol	5α-cholestan-3β-ol-6-one
7-KC	7-ketocholesterol
7-ketocholestanol	5α-cholestan-3β-ol-7-one
7α-ΟΗC	7a-hydroxycholesterol
7β-ΟΗC	7β-hydroxycholesterol
7β-ΟΗC	7β-hydroxycholesterol
ABCA1	ATP Binding Cassette A1
ABCG1	ATP Binding Cassette G1
ACAT	Acyl cholesterol acyltransferase
AEBS	Anti-Estrogen Binding Site
AI	Aromatase inhibitor
AME	Apparent Mineralocorticoid Excess
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AP1	Activator Protein 1
ARL7	ADP-ribosylation factor-like 7
BRCA1	Breast Cancer Susceptibility Gene 1
ChEH	Cholesterol Epoxyde Hydrolase
СНО	Chinese hamster ovary
COX2	Cyclooxygenase 2

CREB	C-AMP Response Element Binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
СТ	cholestan-3β,5α,6β-triol
D8D7I	$3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 8- $\Delta$ 7-isomerase
DBD	DNA binding domain
DDA	Dendrogenin A (5α-Hydroxy-6β-[2-(1H-imidazol-4-
	yl)ethylamino]cholestan-3β-ol)
DDB	Dendrogenin B $(5\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -[3-(4-
	aminobutylamino)propylamino]cholest-7-en-3β-ol)
DHCR7	$3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 7-reductase
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Egr-1	Early growth response protein 1
ENaC	Epithelial Na <sup>+</sup> Channel
ER	Estrogen Receptor
ER	Estrogen Receptor
ER FDA	Estrogen Receptor Food and drug administration
ER FDA FXR	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor
ER FDA FXR	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor
ER FDA FXR G6Pase	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase
ER FDA FXR G6Pase GILZ	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE H6PD	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE H6PD HDL	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element Hexose-6-phosphate dehydrogenase High Density Lipoprotein
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE H6PD HDL HER2	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element Hexose-6-phosphate dehydrogenase High Density Lipoprotein Human Epithelial Growth Factor 2
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE H6PD HDL HER2 HMG-CoA	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element Hexose-6-phosphate dehydrogenase High Density Lipoprotein Human Epithelial Growth Factor 2 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-CoenzymeA
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE H6PD HDL HER2 HMG-CoA HNF1α	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element Hexose-6-phosphate dehydrogenase High Density Lipoprotein Human Epithelial Growth Factor 2 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-CoenzymeA Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox A
ER FDA FXR G6Pase GILZ GR GRE H6PD HDL HER2 HMG-CoA HNF1α HPA	Estrogen Receptor Food and drug administration Farnesoid X Receptor Glucose-6-Phosphatase Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Glucocorticoid Receptor Glucocorticoid Receptor responsive Element Hexose-6-phosphate dehydrogenase High Density Lipoprotein Human Epithelial Growth Factor 2 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-CoenzymeA Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox A Hypothalamic-Pituitary-Adrenal

IdolInducible Degrader of LDLRIGF-1Insulin-like Growth Factor-1IKKIxB KinaseIL-10Interleukine-10InsigInsulin-induced geneKOKnock-outLBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor aLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMTORNuclear Factor 1NCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor -lapamycinOCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymeP4LB2Pattner And Localizer of BRCA2	Id4	Inhibitor of DNA binding 4
IGF-1Insulin-like Growth Factor-1IKKIcB KinaseIL-10Interleukine-10InsigInsulin-induced geneKOKnock-outLBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor aLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor -1apamycinOCDO6-oxo-cholestan-3β.5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymeP4LB2Pattner And Localizer of BRCA2	Idol	Inducible Degrader of LDLR
IKKIcB KinaseIL-10Interleukine-10InsigInsulin-induced geneKOKnock-outLBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding proteinOSBPCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Patner And Localizer of BRCA2	IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-10Interleukine-10InsigInsulin-induced geneKOKnock-outLBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMTORNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-кBNuclear Factor-1app BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Patner And Localizer of BRCA2	IKK	IkB Kinase
InsigInsulin-induced geneKOKnock-outLBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDLRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor 1NPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	IL-10	Interleukine-10
KOKnock-outLBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMulear Factor 1MFF <kb< td="">Nuclear Factor 1NCEHNuclear Factor 1NF1Niclear Factor 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2</kb<>	Insig	Insulin-induced gene
LBDLigand binding domainLCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-xBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding Protein	КО	Knock-out
LCATLecithin-Cholesterol Acetyl transferaseLDLLow Density LipoproteinLDRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-aLiver X receptor aLXR-βMitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMimeralocorticoid Receptor responsive ElementmTORNuclear Factor 1NCEHNuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor 1NPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	LBD	Ligand binding domain
LDLLow Density LipoproteinLDLRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNuclear Factor 1NF1Nuclear Factor 1NF2Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	LCAT	Lecithin-Cholesterol Acetyl transferase
LDLRLow Density Lipoprotein ReceptorLXRLiver X ReceptorLXR-aLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor 1NPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	LDL	Low Density Lipoprotein
LXRLiver X ReceptorLXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor sponsive Clamann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LXR-αLiver X receptor αLXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor 2OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	LXR	Liver X Receptor
LXR-βLiver X receptor βMAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymeP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzyme	LXR-a	Liver X receptor α
MAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor -kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	LXR-β	Liver X receptor β
MAKP-1Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor 1NPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymeP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2		
MDGF-1Mammary Derived Growth Factor-1mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	MAKP-1	Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1
mEHmicrosomal Epoxyde HydrolaseMRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor -kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPCholesterol side chain cleavage enzymeP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	MDGF-1	Mammary Derived Growth Factor-1
MRMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementMREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	mEH	microsomal Epoxyde Hydrolase
MREMineralocorticoid Receptor responsive ElementmTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	MR	Mineralocorticoid Receptor responsive Element
mTORMammalian target of rapamycinNCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	MRE	Mineralocorticoid Receptor responsive Element
NCEHNeutral cholesterol ester hydrolaseNF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF1Nuclear Factor 1NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	NCEH	Neutral cholesterol ester hydrolase
NF-κBNuclear Factor-kappa BNPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	NF1	Nuclear Factor 1
NPC1Niemann-Pick type C 1OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	NF-ĸB	Nuclear Factor-kappa B
OCDO6-oxo-cholestan-3β,5α-diolORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	NPC1	Niemann-Pick type C 1
ORPOxysterol-binding protein related-proteinsOSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	OCDO	6-oxo-cholestan-3β,5α-diol
OSBPOxysterol Binding ProteinP450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	ORP	Oxysterol-binding protein related-proteins
P450 CYP-sccCholesterol side chain cleavage enzymePALB2Partner And Localizer of BRCA2	OSBP	Oxysterol Binding Protein
PALB2 Partner And Localizer of BRCA2	P450 CYP-scc	Cholesterol side chain cleavage enzyme
	PALB2	Partner And Localizer of BRCA2

РЕРСК	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
РІЗК	Phosphoinositide 3-Kinase
РКС	Protein kinase C
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PR	progesterone receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog mutated in multiple advanced
	cancers 1
PXR	Pregnane X Receptor
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand
ROR	Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
RU-486	Mifepristone
RXR	Retinoid X Receptor
SC4MOL	Sterol-C4-methyl oxidase-like
Scap	SREBP cleavage-activating protein
sEH	soluble Epoxyde Hydrolase
SERD	Selective Estrogen Receptor Downregulator
SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulators
SNP	Single-Nucleotide polymorphism
SP1	Specificity Protein 1
SP3	Specificity Protein 3
SREBPs	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
SSRI	Selective serotonin re-uptake inhibitors
SULT2B1b	Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1
SUMO-1	Small ubiquitin-related modifiez-1
Tam	Tamoxifen
TGF-α	Transforming Growth Factor α
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α

# **TABLE DES FIGURES**

## Chapitre 1

Figure 1	22
Morphologie de la glande mammaire.	
Figure 2	24
Développement de la glande mammaire au long de la vie reproductrice d'une femme.	
Figure 3	25
Présence des récepteurs des œstrogènes dans le corps.	
Figure 4	26
Structures des æstrogènes.	
Figure 5	26
Représentation des domaines et homologies de structures des ER $\alpha$ et ER $\beta$ .	
Figure 6	27
Représentation du mode d'action du récepteur des œstrogènes.	
Figure 7	28
Représentation des gènes codant pour les PR $\alpha$ et PR $\beta$ .	
Figure 8	31
Principaux facteurs étiologiques et risques de cancer du sein : niveaux de preuves.	
Figure 9	32
Cancérisation de la glande mammaire.	
Figure 10	35
Voie de synthèse des œstrogènes et mécanismed'action dans les cancers.	
Figure 11	36
Classification des stades de cancers du sein.	
Figure 12	46
Les principales molécules utilisées en hormonothérapie et métabolisme du Tamoxifène.	

## Chapitre 2

Figure 13	51
Structure du cholestérol.	
Figure 14	52
Effet du cholestérol sur les membranes.	
Figure 15	54
Le cholestérol en tant que précurseur des hormones stéroïdiennes : androgènes, œstrogènes, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, et progestagènes.	
Figure 16	57
Biosynthèse du cholestérol.	
Figure 17	62
Balance métabolique du cholestérol.	
Figure 18	64
Structure de quelques oxystérols.	
Figure 19	67
Mécanisme de formation des principaux oxystérols en contact avec l'oxygène de l'air.	
Figure 20	69
Formation enzymatique et métabolisme des principaux oxystérols.	
Figure 21	70
Représentation des mécanismes d'action des oxystérols sur l'homéostasie du cholestérol.	
Figure 22	74
Effets des LXR sur l'homéostasie du cholestérol.	
Figure 23	76
Structure des ligands d'AEBS représentatifs de différentes classes.	
Figure 24	77
Le site AEBS porte l'activité ChEH.	
Figure 25	79
Structure des 5,6-EC.	
Figure 26	82
Structure de l'adduit EC-GSH (glutathion conjugué au 5,6-EC) et des aminostérols naturels : la squalamine, la Dendrogénine A ou la Dendrogénine B.	

10

Figure 27	84
Métabolisme des 5,6-EC et cancer.	
Figure 28	84
Métabolisme centré sur la ChEH.	
Chapitre 3	
Figure 29	87
Structure des glucocorticoïdes naturels présents chez l'homme.	
Figure 30	89
Synthèse des glucocorticoïdes à partir du cholestérol.	
Figure 31	90
Structures de quelques glucocorticoïdes de synthèses comparées au cortisol.	
Figure 32	92
Représentation et organisation de l'ADN, ARN et des protéines du GR.	
Figure 33	94
Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.	
Figure 34	96
Le cortisol comme ligand du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et aux minéralocorticoïdes (MR) dont la concentration est régulée par les $11\beta$ -hydroxystéroides déshydrogénase type 1 et 2 (11HSD1 et 11HSD2).	
Figure 35	97
Transformation du cortisol et de la cortisone par les 11β-hydroxystéroides déshydrogénase (11HSD1 et 11HSD2).	
Figure 36	100
Structures de gènes codant pour les 11HSD1 et 11HSD2.	
Figure 37	102
Structures de la 11HSD1 humaine lié avec un NADP et un inhibiteur.	
Figure 38	103
Structures in silico de la 11HSD2 humaine basé sur la 17HSD1.	
Figure 39	104
Expression des 11HSD1 et 11HSD2 dans différents tissus.	
Figure 40	112
Structure des substrats et inhibiteurs de la 11HSD1.	

Figure 41	113
Représentation des axes de symétrie présents sur le noyau stéroïdien, exemplifié sur l'œstradiol.	
Figure 42	114
Structure des substrats et inhibiteurs de la 11HSD2.	

## Discussion

## Figure 43

211

Dérégulation de la balance métabolique centrée sur la ChEH dans les cancers du sein.

## RESUME

Le cancer du sein (CS) est le cancer féminin le plus fréquent. Il affecte plus de 1 million de femmes dans le monde et environ 400 000 patientes meurent chaque année de cette maladie. De nombreux progrès ont été réalisés dans le traitement des CS par l'utilisation de thérapies comme le Tamoxifène (Tam) pour les CS qui expriment les récepteurs des œstrogènes (RE) (70-80 % des CS) ou des agents qui ciblent la surexpression de HER2 (15-18 % des CS). Cependant tous les cancers ne répondent pas à ces thérapies et de nombreux cancers développent des résistances malgré une réponse initiale. De plus, il n'existe aucune thérapie ciblée pour les patientes dont les tumeurs n'expriment aucun de ces marqueurs.

Il y a donc un besoin urgent de caractériser les acteurs moléculaires impliqués dans l'étiologie des cancers du sein, leur progression et résistance dans le but de mieux phénotyper les tumeurs et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Récemment, des dérégulations du métabolisme des stérols ont été impliquées dans le développement des CS et dans la résistance des CS au Tam et ont été corrélées à une survie plus faible des patientes atteintes d'un CS. L'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot a caractérisé une nouvelle voie métabolique issue du cholestérol centrée sur la Cholesterol Epoxide Hydrolase (ChEH). La ChEH est une cible de haute affinité pour le Tam. La ChEH hydrolyse sélectivement les cholestérols époxydes (CE) en cholestane- $3\beta$ ,  $5\alpha$ ,  $6\beta$ -triol (CT). L'équipe a montré que le CT, formé par la ChEH dans les cellules tumorales, générait un oncométabolite, identifié comme étant le 6-oxo-cholestan-3β,5α-diol (OCDO). Il a été mis en évidence que l'OCDO favorise la prolifération et l'invasion tumorale. Par ailleurs, il a été montré dans l'équipe que la transformation enzymatique des CE menait à la production d'un suppresseur de tumeur, la dendrogénine A (DDA), dans le tissu sain, impliqué dans le contrôle de la différenciation cellulaire et de la croissance tumorale. La production de la DDA a été montrée diminuée dans les CS comparé aux tissus sains adjacents, indiquant une dérégulation de ce métabolisme dans les CS. Dans ce contexte, le but de mon travail de thèse a été d'étudier les dérégulations du métabolisme des CE et de l'OCDO dans les CS, leurs rôles dans la progression et l'agressivité tumorale et d'identifier les enzymes régulant ce métabolisme.

Durant ma thèse, j'ai mis en évidence que l'OCDO favorise la prolifération, l'invasivité et la croissance tumorale de différentes lignées de CS exprimant ou non les RE, *in vitro* et *in vivo*. J'ai montré que la production de l'OCDO dans les cellules tumorales, ou dans des tumeurs implantées chez l'animal, est fortement diminuée par les inhibiteurs de la ChEH aux propriétés anti-tumorales, tels que le Tam ou la DDA. Dans le but d'étudier les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'OCDO, j'ai mis au point une nouvelle méthode de synthèse en une seule étape du CT à partir du cholestérol. Cette méthode a permis de synthétiser de manière très fiable, les molécules du métabolisme des CE radiomarquées ou deuterées. J'ai identifié les enzymes régulant et produisant l'OCDO et montré que l'expression de ces enzymes est dérégulée dans les CS comparée au tissu sain, en faveur de la production d'OCDO.

En conclusion, nous avons montré que des dérégulations du métabolisme des cholestérols époxydes mènent à la formation de l'OCDO, un onco-métabolite promoteur de tumeur, dans les CS exprimant ou non les RE. La production des CE, CT, OCDO et DDA, ainsi que l'expression des enzymes produisant ces métabolites pourraient être des biomarqueurs des CS et de l'efficacité de traitement anti-cancéreux comme le Tam ou la DDA. Les enzymes régulant et produisant l'OCDO pourraient également être des cibles thérapeutiques innovantes pour les CS.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common female cancer. It affects more than 1 million women worldwide and about 400 000 patients die due to this disease every year. Much progress has been made in the treatment of BC by the use of therapies like Tamoxifen (Tam) for the BC that express estrogen receptors (ER) (70-80 % BC) or agents that target the overexpression of HER2 (15-18 % of BC). However all cancers do not respond to these therapies, and many cancers develop resistance despite initial response. In addition, there are no targeted therapies for patients whose tumors do not express any of these markers.

This indicates that it is necessary to characterize the molecular actors involved in BC etiology, progression and resistance that will help to improve BC phenotyping and treatment efficacy and to identify new therapeutic targets. Recent literature highlights that cholesterol metabolism can produce new targets for cancer progression and resistance, and correlate with a decreased in survival of patients. Marc Poirot and Sandrine Silvente-Poirot's team characterized a new metabolic pathway from cholesterol at the level of Cholesterol Epoxide Hydrolase (ChEH). ChEH is a high affinity target for Tam. ChEH selectively catalyses the hydrolysis of cholesterol 5,6-epoxides (CE) into cholestane-3β,5α,6β-triol (CT). We showed that the enzymatic transformation of CT by the ChEH in tumor cells generates an onco-metabolite, identified as the 6-oxo-cholestan- $3\beta$ ,  $5\alpha$ -diol (OCDO). The team characterized that OCDO stimulates proliferation, invasion and tumor growth. Furthermore, it has been shown in the team that the enzymatic conversion of CE leading to the production of a tumor suppressor the dendrogenin A (DDA), in healthy tissue, involved in the control of cell differentiation and tumor growth. The production of the DDA was shown diminished in BC compared to adjacent normal tissues, indicating a deregulation of this metabolism in the BC. In this context, the aim of my thesis was to study deregulation of the metabolism of CE and OCDO in BC, their roles in the progression and tumor aggressiveness and to identify the enzymes regulating this metabolism.

During my Ph.D., I determined that OCDO stimulates proliferation, invasion and tumor growth, *in vitro* and *in vivo*, of various BC cells expressing or not the ER. Interestingly, OCDO formation in tumor cells or in tumors grafted into mice was strongly inhibited by ChEH inhibitors known to have anti-tumor activity such as Tam, or DDA. In order to study the enzymes involved in the biosynthesis of OCDO, I have developed a new one step synthesis of CT from cholesterol. This method allowed synthesizing in a very reliable manner, the radiolabeled or deuterated molecules of CE metabolism. I have characterized the enzymes regulating and producing OCDO and showed that the expression of these enzymes is deregulated in BC compared to normal tissue, to the benefit of OCDO production.

In conclusion, the results obtained indicate that deregulations of the metabolism of cholesterol 5,6epoxides occur in ER-positive and ER-negative tumor cells to favor OCDO production, an oncometabolite promoter of BC. Therefore, OCDO, CE CT and DDA production as well as the expression of the enzymes producing these metabolites could be markers of BC and of the efficacy of anti-cancer compounds such as Tam or DDA and could be innovative therapeutic targets for breast cancer.

# **INTRODUCTION**

Chapitre I - Le cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie qui se développe à partir des cellules qui constituent la glande mammaire. Une cellule initialement normale se transforme et se multiplie de façon anarchique et excessive, pour former une masse, appelée tumeur maligne (Institut National pour le Cancer, 2013).

#### A. La glande mammaire chez la femme

La glande mammaire est une glande exocrine propre aux mammifères. Sa fonction, essentielle à la survie du nourrisson, est de synthétiser, sécréter et délivrer le lait dès que nécessaire. Elle est bien différente en fonction de l'âge puisqu'elle se développe au cours de la vie de la femme. Du fait de sa fonction, c'est seulement lors de périodes de grossesse et d'allaitement, que la glande devient mature grâce à l'influence hormonale qui induit des modifications anatomiques de la glande permettant d'en faire un organe sécréteur de lait. La composition biochimique du lait maternel, fournit à l'enfant une alimentation optimale (protection et développement). C'est pourquoi, l'Organisation Mondiale pour la Santé recommande l'allaitement.

Le rôle si particulier de la glande mammaire, son fonctionnement complexe, sa structure propre, mais aussi sa valeur symbolique et affective forte, en font un organe unique.

#### 1. Anatomie et histologie

La glande mammaire est structurée de deux éléments principaux: le parenchyme et le stroma environnant. Le parenchyme est constitué de 15 à 20 lobes glandulaires. Les lobes glandulaires sont formés par des lobules organisés autour de canaux galactophores reliés au mamelon. Les lobules et les canaux lobulaires aboutissent sur une centaine d'alvéoles. Le stroma adipeux de la glande, formé de matrice extracellulaire, de cellules fibroblastiques, d'adipocytes, et de vaisseaux sanguins nécessaires au développement de la glande mammaire, fournit un cadre de support ainsi qu'un substrat pour le parenchyme (Figure 1A) (Medina 1996). Comme tout organe excréteur, le réseau de canaux de la glande mammaire, appelé l'arbre mammaire, est densément ramifié pour rendre la production et le transport du lait optimum.

D'un point de vue histologique, l'ensemble du système mammaire est constitué de deux couches cellulaires. Les cellules épithéliales constituant la couche interne (cellules luminales)

#### Introduction - Chapitre I – Le cancer du sein

forment la lumière canalaire ou alvéolaire. Certaines de ces cellules, principalement celles présentes dans les alvéoles, ont la capacité de se différencier en cellules sécrétrices de lait (lactocytes) lors de la lactation. Elles sont entourées de cellules myoépithéliales contractiles, permettant, grâce au stimulus de succion, l'excrétion du lait vers les canaux alvéolaires, lobulaires et galactophores et sont en contact avec la membrane basale (cellules basales) séparant les canaux mammaires du stroma (Figure 1B) (Hassiotou & Geddes 2013).



**Figure 1: Morphologie de la glande mammaire. A.** Représentation de la glande mammaire. La glande mammaire est constituée de différents lobes mammaires, formés de dizaines de lobules, comportant 10 à 100 alvéoles chacun. **B.** Histologie de la glande mammaire normale. Les têtes des flèches délimitent le lobule, la petite flèche indique le canal terminal alvéolaire menant au réseau canalaire (grandes flèches), les fibres roses (composées essentiellement de collagène) forment la matrice extracellulaire. Le carré noir a été agrandi. Les têtes de flèches montrent les cellules myoépithéliales, qui avec les cellules épithéliales (petites flèches) forment le canal. Les grandes flèches indiquent les fibroblastes péri-canalaires, les astérisques représentent les fibres de collagène et la flèche épaisse une artériole. *Adapté de www.santeallaitementmaternel.com et www.mammary.nih.gov* 

#### 2. Développement et contrôle

#### a) Développement de la glande mammaire

Il existe différentes phases de développement de la glande mammaire : l'embryogénèse, la puberté et la vie adulte, puisqu'à la différence d'autres organes, le développement de la glande mammaire suit différentes phases tout au long de la vie (Figure 2). Durant le développement embryonnaire, commence le développement d'une paire de placodes et du bourgeonnement, pour former un petit arbre mammaire qui constitue la glande mammaire rudimentaire. Après la naissance, la glande mammaire rudimentaire entre dans une longue phase de quiescence morphogénétique qui dure jusqu'au début de la puberté et qui est peutêtre l'étape la plus frappante de la morphogenèse mammaire. Poussées par des niveaux élevés d'hormones sexuelles sécrétées chez la femme par les ovaires, y compris les œstrogènes, les extrémités des canaux rudimentaires prolifèrent pour former des bourgeonnements terminaux constitués de multiples couches de cellules épithéliales, jusqu'à atteindre la limite du coussinet adipeux, formant ainsi l'arbre mammaire (Hassiotou & Geddes, 2013; Watson & Khaled, 2008). Toutefois, le développement de la glande mammaire au cours de la puberté reste incomplet. Pendant la grossesse et l'allaitement, l'épithélium luminal prolifère et se différencie pour former des alvéoles sécrétrices et productrices de lait. Après la lactation, la glande mammaire subit l'involution, phase de forte apoptose, qui provoque la mort et l'élimination des cellules épithéliales et myoépithéliales, permettant le retour de la physiologie mammaire à un état pré-gestationnel. De manière remarquable, la glande mammaire maintient sa capacité à effectuer ces différents cycles grossesse - allaitement involution tout au long de la vie reproductrice de la femme. Le cycle de développement de la glande mammaire s'achève avec une autre phase d'involution post-ménopause associé à l'arrêt de l'activité ovarienne (Gjorevski & Nelson 2011).


**Figure 2: Développement de la glande mammaire au long de la vie reproductrice d'une femme**. C'est durant l'embryogénèse que le développement de la glande mammaire commence, avec la formation d'un arbre mammaire rudimentaire. Lors de la puberté, sous la pression des hormones, on observe la croissance de bourgeonnements composés de cellules myoépithéliales et de cellules épithéliales luminales, pour former l'arbre mammaire. Pendant la grossesse, les cellules épithéliales prolifèrent et se différencient pour former des alvéoles sécrétrices et productrices de lait. *Adapté de Gjorevski & Nelson, 2011* 

## b) Contrôle du développement de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire est régulé par l'hormone de croissance, les hormones stéroïdiennes sexuelles (l'œstradiol principalement) et le ER $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ) lors de la puberté, alors que l'œstrogène, la progestérone et leurs récepteurs (ER $\alpha$  et PR) sont essentiels lors de la vie adulte. Pendant la grossesse, les concentrations d'œstrogène, de progestérone et d'hormone lactogène placentaire sont élevées. D'autres facteurs de croissance tels que le EGF (Epidermal Growth Factor), le IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), le MDGF-1 (Mammary Derived Growth Factor-1), ou le TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ) sont nécessaires à la prolifération des cellules lors de la grossesse. La chute brutale du taux de progestérone et d'œstrogène en faveur de la prolactine induit la production de lait juste après l'accouchement (Sternlicht 2006; Sternlicht et al. 2006).

# 3. Les récepteurs hormonaux et l'oncogène HER2

#### a) Récepteurs aux æstrogènes

Les hormones sexuelles telles que l'œstradiol (E2) jouent un rôle crucial dans le développement et la maintenance des fonctions sexuelles et reproductives, sur le sein et les voies génito-urinaires, par l'intermédiaire des ER. De plus, chez l'homme et la femme, les

œstrogènes ont une activité biologique sur l'immunité, le système nerveux central, et sur d'autres tissus, tels que les os, le foie , le cerveau et le système cardio-vasculaire (Heldring et al. 2007; Pearce & Jordan 2004). Le ER est un facteur de transcription ligand dépendant intracellulaire dont l'activité est modulée par les hormones œstrogènes ou par des agonistes ou antagonistes de synthèse (Nilsson et al. 2011). Il existe sous 2 formes principales, ERα et ERβ, qui possèdent des profils d'expression tissulaire distincts. En effet, le ERα et ERβ sont connus pour être localisés dans le sein, le cerveau, le système cardiovasculaire, les voies génito-urinaires et l'os. Le ERα est le principal sous-type de ER dans le foie, alors que le ERβ est la forme principale dans le colon (Figure 3). Le ERα et le ERβ peuvent également être localisés dans des sous-types cellulaires différents selon le tissu. En effet, dans la prostate, le ERβ est exprimé dans l'épithélium- , alors que ERα se localise dans le stroma (Deroo & Korach 2006; Pearce & Jordan 2004; Dahlman-Wright et al. 2006). Il a été montré que, dans les cancers du sein le ratio ERα/ERβ est plus important que dans le tissu normal (Docquier et al. 2013).



**Figure 3: Présence des récepteurs des œstrogènes dan le corps**. Le ERα et ERβ sont connus pour être exprimés dans le sein, le œrveau, le système cardiovasculaire, les voies génito-urinaire et osseuse. Le ERα est le principal sous-type de ER dans le foie, alors que le ERβ est le principal isotype présent dans le côlon . *D'après de Pearce & Jordan, 2004* 

L'æstrone (E1), l'æstradiol (E2 ou  $17\beta$ -æstradiol) et l'æstriol (E3) (Figure 4) sont les trois principaux æstrogènes endogènes, parmi lesquels l'E2 est l'espèce prédominante et la plus active biologiquement (Nilsson et al. 2011).



Figure 4: Structures des œstrogènes.

Les gènes codant pour le ER $\alpha$  et le ER $\beta$  sont sur 2 chromosomes distincts. Le ER $\alpha$ , dont la masse protéique est de 66kDa, est localisé sur le chromosome 6, alors que le ER $\beta$ , 59kDa de masse protéique, est positionné sur le chromosome 14. Ils présentent des homologies de structures plus ou moins importantes selon les domaines jusqu'à 97% d'homologie pour le DNA binding domain (Figure 5) (Bai & Gust 2009).



Figure 5: Représentation des domaines et homologies de structures des ERa et ERB. D'après de Bai & Gust, 2009

Il apparait que différents mécanismes d'actions seraient impliqués dans les effets biologiques des œstrogènes sur le ER $\alpha$  et  $\beta$  (Heldring et al. 2007; Saha Roy & Vadlamudi 2012). Les ER $\alpha$ et  $\beta$  sont des facteurs de transcription ligand-inductible : les œstrogènes qui entrent dans la cellule se lient aux ER $\alpha$  et  $\beta$  présent dans le cytoplasme, ce qui induit un changement de conformation du récepteur et sa dimérisation. Le complexe œstrogène-ER $\alpha$  et  $\beta$  est transloqué dans le noyau pour se lier à l'élément de réponse aux œstrogènes présent sur le promoteur de gènes régulables par E2. L'initiation de la transcription est complexe et nécessite le recrutement de protéines co-régulatrices, co-activateurs et co-represseurs, qui induisent l'activité de transcription de gènes sous dépendance du ER $\alpha$  et du ER $\beta$  (Docquier et al. 2013)

(Figure 6.A.). Un autre mécanisme implique une interaction protéine-protéine du ER $\alpha$  ou  $\beta$  avec d'autres facteurs de transcription, comme AP1 (Activator Protein 1) ou SP1 (Specificity Protein 1), qui après activation par le ligand, induit la régulation de gènes par liaison indirecte avec l'ADN (Nilsson et al. 2011; Heldring et al. 2007).

De plus, l'activation rapide de voies non canoniques peut être observée après liaison des œstrogènes sur le ER $\alpha$  ou  $\beta$ , comme la stimulation des voies protéines kinases (AKT, MAPK, PI3K) l'activation de phospholipase C, et l'augmentation de la production d'oxyde nitrique, qui se font dans le cytoplasme. On peut également observer la régulation de gènes après phosphorylation et intégration du ER $\alpha$  ou  $\beta$  dans le noyau (Figure 6.B.) (Nilsson et al. 2011).



**Figure 6: Représentation du mode d'action du récepteur des œstrogènes. A.** Le mécanisme direct d'action des œstrogènes sur le ER dépendant de la liaison des œstrogènes sur le ER, qui se fixera ensuite sur l'ADN et induira grâce au recrutement de co-régulateurs, la régulation de la transcription des ARNm. Un autre mécanisme nécessite une interaction protéine-protéine, après activation par le ligand, ce qui induira une liaison indirecte avec l'ADN. B. Un autre mécanisme d'action des œstrogènes peut impliquer la stimulation des voies des protéines kinases et des phosphatases et la régulation de gènes grâce aux co-régulateurs, menant à une réponse physiologique rapide. *D'après de Nilsson et al., 2011* 

## b) Récepteurs de la progestérone

Le PR (Progesteron Receptor) fait partie, tout comme le ER, de la famille des récepteurs nucléaires. Dans la glande mammaire, le PR est exclusivement exprimé dans les cellules épithéliales, et non dans les cellules myoépithéliales ou le stroma.

Le récepteur de la progestérone est présent sous deux isoformes: PR $\alpha$  et PR $\beta$ , qui possèdent le même gène situé sur le chromosome 11, mais pour lesquels le site d'initiation de la traduction n'est pas le même. En effet le PR $\alpha$  correspond à une version tronquée du PR $\beta$  (Figure 7) (Gao & Nawaz 2002a). Le gène codant pour le PR est régulé par deux promoteurs indépendants, qui peuvent agir en homo ou hétérodimères (Daniel et al. 2011).



**Figure 7: Représentation des gènes codant pour les PRα et PRβ**. Le PRα est une forme tronquée du PRβ. *D'après* Gao & Nawaz, 2002

Ce récepteur active la transcription de gènes après fixation du ligand (Obr and Edwards, 2012). Le ligand naturel du PR, la progestérone, contrôle notamment la différentiation de l'endomètre, et la maturation ainsi que le développement de la glande mammaire, de l'utérus et des ovaires (Ellmann et al. 2009; Gao & Nawaz 2002b). Plus précisément, la progestérone contrôle le développement des canaux et des alvéoles de la glande mammaire pendant la grossesse, grâce au recrutement d'effecteurs comme Wnt-4, Id4 (Inhibitor of DNA binding 4) ou RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand). La protéine Wnt-4 est augmentée durant la grossesse afin de réguler la prolifération cellulaire des canaux en activant les cibles du cycle cellulaire, Cyclin D1 et p21. Id4, agit comme un inhibiteur de la différentiation cellulaire et est impliquée dans le développement de la glande mammaire lors des premiers stades de la grossesse. RANKL est une cytokine de la famille des TNFa (Tumor Necrosis Factor) qui, en se liant au récepteur RANK, induit des cascades de signalisation, parmi lesquels le facteur de transcription NFkB et son gène cible CCND1 qui code pour la cycline D1 (Daniel et al. 2011). La stimulation de l'expression de RANKL et de Wnt-4 agit aussi sur les cellules souches mammaires en stimulant leur prolifération (Obr and Edwards 2012; Daniel et al. 2011). La progestérone est également capable de supprimer, grâce à une balance progestérone/PR et prolactine/Stat5, l'activation de la production de lait durant la grossesse et avant l'accouchement, par l'inhibition de l'expression de gènes codant pour les protéines de lait (Obr and Edwards 2012).

#### c) L'oncogène HER2

La famille des récepteurs à facteurs de croissance épidermiques humains comprend 4 isoformes (HER1/EGFR, HER2, HER3 et HER4) dont les gènes codant pour ces récepteurs sont *ERBB1/2/3/4* respectivement. Aucun ligand de grande affinité pour le HER2 n'a encore été découvert, ce qui tend à montrer que HER2 est le partenaire de choix pour les hétérodimères (Moasser 2007). La dimérisation de HER2, essentielle à son activation, induit la phosphorylation de tyrosines du domaine intracellulaire, qui induit ensuite une cascade de signalisation aboutissant notamment à la prolifération cellulaire, au contrôle de la différentiation cellulaire, à l'angiogénèse et à l'apoptose (Kostyal et al. 2012). L'activation anormale de l'oncogène HER2 dans les cancers du sein, passant par une amplification du gène *ERBB2*, joue un rôle important dans les cancers du sein (Di Fiore et al. 1987; Hudziak et al. 1987; Slamon et al. 1987) et sa recherche est indispensable en clinique car il s'agit non seulement d'un facteur pronostic majeur mais aussi d'un facteur prédictif de réponse aux différents traitements anti-HER2.

## B. Les cancers du sein

# 1. Généralités, épidémiologie et facteurs à risque

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent des cancers de la femme. Une femme sur neuf sera touchée au cours de sa vie (Singletary 2003). Plus de 50 000 nouveaux cas ont été diagnostiqué en France en 2012. Il représente 32 % de l'ensemble des cancers féminins et reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Les hommes sont également touchés, puisque le cancer du sein représente 1 % des cancers chez l'homme. L'âge médian au diagnostic est estimé à 63 ans et la survie à 5 et 10 ans est très bonne, puisque de 86 % et de 76 % (diagnostiqué entre 1989 et 2004). La mortalité a diminué depuis les années 2000, surtout pour les tumeurs diagnostiquées à un stade précoce et pour les femmes de 50 à 74 ans (Les cancers en France, édition 2014, Institut National pour le Cancer). Les progrès thérapeutiques, (McDaniel et al. 2013), la diminution de prescriptions des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause (Daubisse-Marliac et al. 2011), et la généralisation du dépistage organisé du cancer du sein pour les femmes de 50 à 74 ans, sont à l'origine de cette diminution (Gangnon et al. 2015).

Il est prouvé que la susceptibilité génétique, l'exposition à des facteurs environnementaux et à des facteurs liés au style de vie jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie. Cependant, il existe deux types de facteurs : les non-modifiables et les modifiables.

L'âge constitue le premier facteur de risque non-modifiable puisqu'il est rare de développer un cancer du sein (ou tout autre cancer non spécifique de l'enfant) en dessous de trente ans, alors que le risque augmente jusqu'à l'âge de 80 ans. L'exposition prolongée aux œstrogènes endogènes, c'est-à-dire un âge précoce des premières menstruations (avant 12 ans) et une ménopause tardive (après 50 ans), augmente le risque de cancer du sein. Des antécédents familiaux relevant et/ou un âge jeune au diagnostic peut faire évoquer une prédisposition génétique (mutation notamment des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*) (Venkitaraman 2002; Ford et al. 1998) qui est associée à une augmentation d'environ 80% de risque de développer un cancer du sein, mais représente moins de 10% des cas. Certaines maladies bénignes du sein constituent un facteur de risque de cancer mammaire tout comme le niveau de densité des tissus mammaires en mammographie. Le sein étant l'un des organes les plus sensibles aux effets des radiations. L'exposition aux radiations ionisantes (liées à un premier traitement par radiothérapie, par exemple pour une maladie de Hodgkin) est également un facteur de risque.

Parmi les risques modifiables, on retrouve ce qui est lié à notre mode de vie. Le surpoids tout au long de la vie et l'obésité augmentent le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées (d'environ 50%) ainsi que la faible activité sportive (30%), du fait notamment de l'augmentation de l'exposition aux œstrogènes endogènes (Nimptsch & Pischon 2015). L'apport d'œstrogènes exogènes, comme la contraception orale (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1996) ou le traitement hormonal substitutif prescrit pour pallier aux effets de la ménopause (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997), ont été démontrés comme étant des facteurs à risque pour le cancer du sein. L'alcool est le seul facteur nutritionnel établi de risque de cancer du sein (Roswall & Weiderpass 2015).

Certains facteurs, quand à eux, peuvent prévenir la survenue de cancer du sein. En effet, la multiparité et l'âge précoce de la première grossesse, avant 30 ans, (Layde et al. 1989) ainsi que l'allaitement (Beral et al. 2002) diminuent de près de 40% le risque de cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002).

l	Preuve	Augmentation du risque	Diminution du risque	Principaux mécanismes biologiques
				en cause
	Convaincante	Âge avancé Âge précoce des premières règles (< 12 ans) Grande taille à l'âge adulte Alcool (au moins une boisson alcoolique/jou Mutations génétiques ( <i>BRCA1/2</i> ) Radiations ionisantes (avant 40 ans) Densité mammographique (>50%)	u)	Exposition précoce et prolongée au milieu hormonal Nutrition durant l'enfance et l'adolescence Réduction de masse de la glande mammaire Augmentation des hormones sériques Augmentation de la production d'IGF Augmentation de l'instabilité génomique Dommages de l'ADN et ses constituants Augmentation d'IGF avant la ménopause Augmentation de la prolactine après la ménopause
	Probable/ possible	Ménopause tardive (après 55 ans) Contraceptifs oraux Traitement hormonal substitutif Histoire familiale de cancer du sein	Multiparité Allaitement (pendant au moins 25 mois)	Production prolongée des hormones ovariennes Augmentation de l'exposition aux æstrogènes Suppression de la production d'æstradiol et de progestérone Report des effets de la ménopause Accélération, différenciation des tissus mammaires Prolifération rapide de l'épithélium Réduction de la production d'æstrogènes Excrétion d'agents carcinogènes Report du rétablissement de l'ovulation Même environnement et style de vie, fonds génétique commun
	Probable/ possible nsuffisante	Maladies bénignes du sein Obésité (après la ménopause) Gain de poids (à partir de 18 ans) Cigarette	Activité physique régulière Cigarette	Augmentation de l'hyperplasie des cellules épithéliales Diminution de la vitesse mitotique Augmentation de la concentration d'æstradiol libre sérique Réduction de la production d'æstrogènes Maintien de l'équilibre énergétique Production de substances carcinogènes
			Restriction énergétique (durant l'enfance et l'adolescence)	Diminution des æstrogènes circulants Recul de la date d'apparition des premières règles Diminution des æstrogènes et de hormone de croissance IGF-I

**Figure 8: Principaux facteurs étiologiques et risques de cancer du sein : niveaux de preuves**. D'après Nkondjock & Ghadirian, 2005

# 2. Processus tumoral

#### a) D'une cellule au cancer

Le développement d'un cancer comprend plusieurs étapes, dont l'initiation, la promotion, et la dissémination, jusqu'à l'apparition de métastases (Vargo-Gogola & Rosen 2007; Krzeszinski & Wan 2015). L'accumulation de mutations génétiques au cours du temps, induit l'initiation, qui permettra aux cellules de proliférer de façon anarchique pour former des lésions pré-tumorales appelées hyperplasie. L'étape de promotion permet aux cellules hyperplasiques de continuer à proliférer et de former des cancers canalaires *in situ*, qui n'ont pas encore franchi la membrane basale. Durant cette étape, les cellules acquièrent de nouvelles caractéristiques leurs permettant d'accroitre leur capacité à proliférer et à survivre, rendant ainsi la tumeur plus agressive. L'envahissement du stroma, après pénétration des cellules tumorales à travers la membrane basale se fait par intravasation pendant l'étape de dissémination. Les cellules ont alors, acquis la capacité à migrer, nécessaire lors de la dernière étape de cancérisation qui est la formation de métastases (Krzeszinski & Wan 2015; Vargo-

Gogola & Rosen 2007) : les cellules ont quitté le sein et ont envahi d'autres organes comme les ganglions lymphatiques, le poumon, le foie (R. Ma et al. 2015), le cerveau (Kodack et al. 2015) ou les os (Krzeszinski & Wan 2015).



**Figure 9: Cancérisation de la glande mammaire**. Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation de métastases, qui est le demier stade de la cancérogénèse. Pour cela les cellules, devront quitter la cellule primaire, qui a subi plusieurs mutations génétiques lui conférant la propriété de proliférer anarchiquement et qui a induit l'initiation de la tumeur. Les cellules vont alors proliférer et envahir le stroma. A partir de là, les cellules présentes dans les vaisseaux vont pouvoir, via la circulation sanguine, former des tumeurs secondaires à distance de la tumeur primaire. *Adapté de* Vargo-Gogola & Rosen, 2007.

# b) Principales mutations associées au cancer du sein

Le cancer est connu comme une pathologie complexe, qui pourrait s'expliquer par le principe établi qu'un cancer provient d'une cellule ayant accumulé des aberrations génétiques lui permettant de devenir maligne.

Ainsi, *BRCA1* (Breast Cancer Susceptibility Gene 1), un gène suppresseur de tumeur bien connu, est le gène principal pour lequel les mutations sont associées aux cancers du sein héréditaires. Ce gène à été identifié en 1990 grâce à l'analyse génétique de 23 familles, parmi lesquelles 329 personnes ont participé à l'étude, dont 146 cas de cancers avec un taux élevé de cancers chez de jeunes personnes, et une plus grande récurrence des cancers du sein chez les hommes (J. M. Hall et al. 1990). Quelques années plus tard le gène *BRCA2* a été découvert. Une mutation sur les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* augmente le risque de cancer du sein et des ovaires. En effet, les femmes possédant une mutation sur ces gènes, ont un risque de développer un cancer du sein au cours de leur vie, de 50 à 80% (Shiovitz & Korde 2015). Les effets attribués à ces gènes impliquent l'augmentation des dommages à l'ADN et la diminution de la stabilité du génome. Ainsi, *BRCA1* et *BRCA2* contrôlent la réparation des dommages à l'ADN, la progression du cycle cellulaire et la maintenance de l'intégrité du génome. Il a été montré que *BRCA1* régulait négativement les voies de signalisation AKT et PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) (Minami et al. 2014). Les femmes ayant une tumeur triple

négative c'est-à-dire qui n'exprime ni le ER, ni le PR, ni HER2 présentent plus fréquemment des mutations de *BRCA1* (Koboldt et al. 2012; Zhang et al. 2015). Le gène *PALB2* (Partner And Localizer of BRCA2) est un partenaire essentiel de *BRCA2*, qui se lie et co-localise avec *BRCA2*, permettant le maintient du génome. Ce gène est muté dans 0.5 à 1 % des patientes et pourrait être corrélé à une diminution de la survie (Cybulski et al. 2015).

Il peut également y avoir des mutations somatiques du gène *BRCA*, soit au niveau des tumeurs ou bien des modifications épigénétiques du promoteur du gène qui sont responsable d'un phénotype BRCAness, notamment dans les tumeurs triples négatives (Turner et al. 2004; Chalasani & Livingston 2013).

Comme vu précédemment, le gène codant la protéine HER2 est amplifié chez 18 à 20 % des carcinomes mammaires infiltrants (Alluri et al. 2014; Moasser 2007). Il a été montré que des mutations ponctuelles, chez 2 à 3% des patientes, provoquent une augmentation de l'activité kinase. Le dérèglement de HER2 induit une augmentation de la croissance cellulaire. La surexpression de HER2 dans le cancer du sein, apparait comme menant à des cancers plus agressifs donc à des cancers de mauvais pronostiques pour les patientes. Il existe des mutations pour le gène codant le ER $\alpha$ , *ESR1*. Ces mutations, peu fréquentes, sont trouvées principalement dans les cancers métastasés ou résistants aux traitements, et quasiment non-existantes dans les tumeurs primaires non traitées par hormonothérapie. Ceci indique que ces mutations peuvent être une cause de résistance acquise aux traitements mais dans de rare cas (Alluri et al. 2014; Goncalves et al. 2014).

Des mutations héréditaires ou somatiques de haute pénétrance sur des gènes comme p53, *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1) ou *PI3KCA* sont impliquées dans de nombreux cancers du sein (Goncalves et al. 2014; Koboldt et al. 2012; Shiovitz & Korde 2015; Watson et al. 2013; André et al. 2014). Les mutations sur p53, sont les plus communes (Hollstein et al. 1991). Effectivement, p53 contrôlant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réparation de dommages à l'ADN et le cycle cellulaire si p53 est muté, la cellule est bien plus encline à développer des cancers (Gasco et al. 2002). Ceci explique qu'on observe des mutations de p53 dans plus de la moitié des cancers humains. De plus, dans le cancer du sein, des mutations de p53 sont associées à des cancers plus agressifs associés à une faible survie (Gasco et al. 2002) et sont très fréquentes dans les cancers de type basal-like (environ 80%) (Goncalves et al. 2014; Koboldt et al. 2012). Une mutation constitutionnelle ou congénitale sur le gène *PTEN*, gène suppresseur de tumeur, augmente le risque de développer un cancer du sein de 85% (Shiovitz & Korde 2015). Son inactivation

dans les cancers lève le frein que la protéine exerce sur les voies PI3K/AKT, augmentant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, la survie, et la migration cellulaire (Minami et al. 2014). Des mutations sur les gènes *PI3KCA*, la sous-unité catalytique de PI3K, ou *AKT1*, induisent des dérégulations de la voie PI3K, largement impliquées dans les cancers. Les mutations de ces gènes sont retrouvées assez fréquemment dans les cancers du sein, principalement dans les cancers de type luminal et HER2 positif (Goncalves et al. 2014; Troxell 2012; André et al. 2014). La caractérisation de ces mutations chez chaque patiente, permettrait d'adapter les traitements afin de mieux cibler chaque cancer, selon ses caractéristiques propres. Des traitements combinés ciblant différentes anomalies moléculaires, diminuerait le risque de résistance des cancers aux traitements (André et al. 2014)

# c) Biosynthèse et rôle des æstrogènes dans le cancer du sein

Les œstrogènes sont impliqués dans différents processus biologiques normaux, mais ont été montrés comme étant largement impliqués dans le développement des cancers du sein, en favorisant la croissance et la progression des tumeurs.

Chez les femmes en pré-ménopause, les ovaires susceptibles aux variations du cycle menstruel, sont la source principale de biosynthèse des œstrogènes. Une faible quantité d'œstrogène est produite par d'autres organes, comme le foie, les muscles, le tissu adipeux ou les seins. Au contraire, ces sources secondaires sont importantes pour la synthèse d'œstrogènes chez les femmes ménopausées. L'androstènedione, métabolite issu du cholestérol, est le précurseur de la testostérone et des œstrogènes. Ce composé est transformé immédiatement en œstrone ou en testostérone, puis en œstradiol. La conversion de l'androstènedione en testostérone et de l'œstrogènes), alors que la transformation de l'androstènedione en cypelé aromatase (Clemons & Goss 2001).

Deux mécanismes différents contribuent aux effets des œstrogènes dans les cancers. La transcription de gènes impliqués dans la division cellulaire, l'apoptose et la prolifération, par la liaison des œstrogènes sur les récepteurs aux œstrogènes, est le mécanisme principal des effets promoteurs de tumeurs des œstrogènes (Yager & Davidson 2006; Pearce & Jordan 2004). Un second mécanisme plus confidentiel, pourrait mettre en jeu des métabolismes oxydés des œstrogènes, le 2-hydroxycatéchol œstrogène et le 4-hydroxycatéchol œstrogène qui forment ensuite des quinones réactives. Ces quinones forment des adduits sur l'ADN, par liaison sur les guanines et adénines, et induisent l'oxydation de lipides cellulaires, via la

formation de ROS (Reactive Oxygen Species) (Clarke, Leonessa, Welch, & Skaar, 2001; Liehr, 2000; Yager & Davidson, 2006). L'effet de ces quinones peut être diminué grâce à leur conjugaison avec la gluthatione par des glutathiones-S-Transferase, tel que la GSTP1 ou GSTM1 et GSTA1 dans de moindres proportions (Hachey et al. 2003). Ainsi, les métabolites oxydés des œstrogènes sont des génotoxiques et des mutagènes faibles ; qui peuvent initier ou induire les processus carcinogénes (Clarke, Leonessa, Welch, & Skaar, 2001; Liehr, 2000; Yager & Davidson, 2006).

Les enzymes régulant la biosynthèse des œstrogènes ou responsables des effets carcinogènes des œstrogènes sont devenus des cibles thérapeutiques, comme les récepteurs aux œstrogènes et l'aromatase et ont conduit au développement de l'hormonothérapie pour le cancer du sein.



**Figure 10:** Voie de synthèse des œstrogènes et mécanisme d'action dans le cancer. A. L'oestradiol (E2) est issu de la synthèse de l'androsténedione, qui forme la testostérone et l'oestrone. La 17- $\beta$  hydroxystéroide déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD) et le cytochrome CYP19 (aromatase) sont les enzymes responsables de la biosynthèse de l'oestradiol à partir de l'androsténedione. B. L'oestradiol peut ensuite agir selon deux mécanismes : principalement sur le récepteur aux oestrogènes pour induire la promotion et la progression des cancers mammaires; et dans de plus faibles proportions grâce au métabolisme oxydatif de l'oestradiol qui induira l'initiation des cancers mammaires. *Adapté de Clemons & Goss, 2001 et Yager & Davidson, 2006.* 

# 3. Les différents types de cancer du sein

La dernière classification des tumeurs du sein identifie une vingtaine de types histologiques différents, soulignant la grande hétérogénéité des cancers du sein (Skibinski & Kuperwasser

2015; Vargo-Gogola & Rosen 2007), d'un point de vue biologique ou de la réponse au traitement et de la survie (Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver 2012). De ce fait, la détermination des types de cancer du sein est difficile, bien que certains types histologiques soient décrits comme associés à un bon pronostic, tels que les carcinomes infiltrants de type tubulaire, ou mucineux (Ellis et al. 1992). Même si la détermination du type de cancer est nécessaire, une classification histologique et moléculaire rend compte plus précisément du type de cancer du sein et de la stratégie thérapeutique à adopter.

## a) Classification histologique

La définition du profil histologique d'un cancer, basée sur des standards, donne des informations sur l'étendue du cancer et sa sévérité. C'est la première approche utilisée pour le classer et établir les bases du traitement. Les principales caractéristiques observées, rendant compte de l'extension locale, régionale et générale, sont la taille de la tumeur (T0 à T4), l'atteinte ganglionnaire loco-régionale (N0 à N3), la présence de métastases (M0 à M1). Ces trois caractéristiques définissent le statut TNM et permettent l'établissement du stade tumoral (de I à IV) (Figure 11) (Escobar et al. 2007). Cette classification est internationale et facilite l'échange d'informations entre cliniciens et chercheurs.

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	
0	In Situ	N0	M0	Cancer non invasif
I	Τ1	NO	M0	Petite tumeur, sans propagation extérieure au sein
II	T0/1 T2 T3	N1 N0/1 N0	M0	Tumeur moyenne avec ou sans atteinte ganglionnaire mineure
111	T0/1/2 T4 Tout T	N2 N0/1/2 N3	M0	Tumeur moyenne ou avancée avec atteinte ganglionnaire majeure
IV	Tout T	Tout N	M1	Tumeur métastasée à distance

Figure 11: Classification des stades de cancers du sein. Les différents stades des cancers du sein en fonction de la classification TNM. Adapté de Stage Information for breast cancer National Cancer Institute, 2015.

## b) Classification moléculaire

La détermination du statut des HR (Hormonal Receptor) est devenue l'un des éléments clé de la prise en charge du cancer du sein. Ainsi l'expression par la tumeur du récepteur  $\alpha$  des œstrogènes (ER $\alpha$ ) et du récepteur de la progestérone (PR $\alpha$  et  $\beta$ ) est systématiquement recherchée par immunohistochimie pour tout cancer diagnostiqué, puisqu'à côté de l'aspect pronostique, ces marqueurs prédisent la réponse à une hormonothérapie. Environ 80% des cancers du sein expriment le ER $\alpha$  et 70% le PR $\alpha$  et  $\beta$ . 20% des tumeurs n'expriment aucun de ces récepteurs (Brenton et al. 2005).

La surexpression de la protéine HER2 joue un rôle important dans les cancers du sein (Di Fiore et al. 1987; Hudziak et al. 1987; Slamon et al. 1987). Le gène *HER2* est amplifié dans 18 à 20 % des cancers du sein. La détermination du statut du HER2 est systématique pour tous les cancers du sein, puisque plus qu'un facteur pronostique, il est prédictif de la réponse aux traitements anti-HER2 (Chia et al. 2008; Slamon et al. 2001).

Au début des années 2000, il a été publié que les cancers du sein pouvaient être classés en groupes moléculaires selon leur profil d'expression génique. Deux études, analysant 496 et 426 gènes sélectionnés (car variable entre les tumeurs issues de patientes différentes) sur 65 et 84 échantillons issus de 42 et 85 patientes respectivement, ont permis de caractériser 5 types moléculaires de cancer du sein (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001). Cette classification a peu changé depuis 15 ans (Cheang et al. 2015). Ils ont montré que les cancers surexprimant le ERa pouvaient être séparés des cancers ERa négatifs. Le groupe luminal, caractérisé par l'expression de cytokératines 8 et 18, spécifique des cellules épithéliales bordant la lumière des canaux et des alvéoles, l'expression du ERa et de gènes associés à la voie des ERa peut être divisé en deux sous groupes : luminal A et luminal B (70% des cancers). Le sous-type luminal A, caractérisé par la présence du ERa et/ou du PR ne surexprime pas HER2. Il contient des carcinomes très souvent de faible grade, peu proliférants (expression faible du KI67), peu mutés pour P53 (15%) et en général de bon pronostic. Le sous-type luminal B est similaire au sous-groupe luminal A puisqu'il exprime le ER $\alpha$  (plus faiblement) et / ou le PR, mais surexprime parfois HER2. Les tumeurs Luminal B sont de grade plus élevé et prolifèrent plus rapidement que les tumeurs Luminal A. Elles présentent une mutation de P53 dans environ 60% des cas et sont de pronostique moins bon (Schnitt 2010; Brenton et al. 2005; Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001; Goldhirsch et al. 2013).

Les cancers du sein qui n'expriment pas le ER $\alpha$ , sont divisés en deux sous groupe : les HER2 et basal-like. Les cancers du sein dits HER2, environ 18 à 20 % des cancers, surexpriment ou amplifient HER2 et expriment ou non le ER $\alpha$  et/ou le PR $\alpha$  et  $\beta$ . Généralement de grade élevé, ils sont associés à une expression élevé de c-myc et à une forte prolifération. Ils sont peu différenciés, mutés pour *p53* dans 70% des cas et de mauvais pronostique. Le sous-groupe basal-like (15% des cancers) est généralement appelé « triple négatif ». Il n'exprime pas les récepteurs hormonaux (ER $\alpha$  et PR $\alpha$  et  $\beta$ ) et ne surexprime pas HER2. Ce sous-type exprime les cytokératines 5, 6 et 17 caractéristiques des cellules dites basales, c'est-à-dire les cellules myoépithéliales qui bordent la membrane basale de la glande mammaire. P53 est muté dans 80% de ce sous-type de cancer qui est souvent de grade élevé et associé à une mutation de BRCA1 (Zhang et al. 2015). Le pronostique des cancer basal-like est mauvais du fait de l'agressivité de ces cancers et du fait de l'absence de thérapie ciblée (Schnitt 2010; Brenton et al. 2005; Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001; Onitilo et al. 2009; Goldhirsch et al. 2013). Un autre sous-type assez mal défini, normal like, regroupe les cancers caractérisés par un profil triple négatif et par l'expression de gènes observés dans le tissu mammaire normal et le tissu adipeux (Perou et al. 2000). La pertinence de cette classification des cancers du sein a été validée puisqu'elle permet une prédiction des résultats cliniques sur des patientes traitées atteintes de cancers du sein (Brenton et al. 2005; Onitilo et al. 2009). Cependant, la simplicité d'une telle classification ne peut refléter l'hétérogénéité que représentent les cancers du sein. En effet, les cancers du sein de type triple négatif peuvent par exemple, être classés en 6 sousgroupes. Chacun de ces sous-groupes pourrait être la cible de traitements spécifiques tenant compte de leurs caractéristiques moléculaires différentes (Lehmann et al. 2011). C'est pourquoi, la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse au traitement, permettraient à chaque patiente possédant une tumeur « unique » d'obtenir un traitement spécifique.

## 4. Les traitements des cancers du sein

La prise en charge thérapeutique comprend un contrôle loco-régional, assuré par la chirurgie et la radiothérapie, et un contrôle systémique grâce à l'utilisation de traitements médicamenteux, tels que la chimiothérapie et les thérapies ciblées dont font parties les hormonothérapies qui agissent sur la tumeur primaire ainsi que sur les éventuelles micro-métastases. Ils sont généralement utilisés en association. Le choix des traitements dépend des caractéristiques anatomopathologiques du cancer et des données cliniques (âge, comorbidité, etc) pour un traitement le plus adapté possible pour chaque patiente. Les traitements (néo)adjuvants ont pour but de guérir la patiente en réduisant son risque de récidive locorégional et à distance. En phase métastatique, ils ont pour but d'allonger la durée de vie en ralentissant l'évolution de la maladie tout en améliorant la qualité de vie (Institut National pour le Cancer, 2013).

## a) La chirurgie

La chirurgie est généralement le premier traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein. Dans certains cas, un traitement médicamenteux peut être utilisé avant la chirurgie

(traitement néo-adjuvant) afin de diminuer la taille de la tumeur et de la rendre ensuite opérable en conservant la glande mammaire. Les études cliniques n'ont jamais démontré que ces traitements néo-adjuvants amélioraient la survie des patientes *versus* un traitement adjuvant. (Haddad & Goetz 2015). L'exérèse de ganglions sentinelles ou bien le curage axillaire seront réalisés au cours de l'opération s'il s'agit bien d'une forme infiltrante. Le curage axillaire consiste à retirer un ensemble de ganglions lymphatiques de l'aisselle lorsque ceux-ci sont atteints par des cellules cancéreuses (Institut National pour le Cancer, 2013).

Il existe deux types de chirurgie, la chirurgie mammaire conservatrice et la chirurgie mammaire non conservatrice, appelée mastectomie. La chirurgie conservatrice consiste à enlever la tumeur ainsi qu'une marge de sécurité saine, de façon à éliminer toutes les cellules tumorales sans enlever la totalité du sein. Elle est privilégiée dès que c'est possible et toujours complétée d'une radiothérapie. La mastectomie quant à elle, consiste à enlever l'ensemble du sein dans laquelle se situe la tumeur. Afin de prévenir le risque de récidive, cette chirurgie, peut être suivie d'un traitement médicamenteux et /ou d'une radiothérapie. La reconstruction mammaire ou le port de prothèses mammaires externes, qui reste un choix strictement personnel, fait partie intégrante de la prise en charge du cancer du sein puisque la perte d'un sein ou sa déformation, suite à une chirurgie peut altérer la perception de soi (Institut National pour le Cancer, 2013).

## b) La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. Son objectif est de délivrer de la manière la plus précise possible, la dose de rayonnement appropriée au volume du sein et/ou des aires ganglionnaires loco-régionales, en épargnant au mieux les tissus sains avoisinants. Les effets cellulaires des particules ionisantes sont initiés par la formation de radicaux libres instables et hautement réactifs, qui induisent la création de lésions sur différentes molécules et surtout sur l'ADN ce qui provoque l'apoptose des cellules. La radiothérapie est délivrée quotidiennement en complément d'une chirurgie initiale, sur une période de plusieurs semaines (5 à 6 semaines), à une dose relativement standardisée. Le champ d'irradiation comprend le sein ou la paroi thoracique et/ou les aires ganglionnaires internes (chaine mammaire interne et région sus-sous claviculaire) selon les caractéristiques biologique de la tumeur et des données cliniques que sont principalement l'âge de la patiente et la position de la tumeur dans le sein. Cette technologie fait intervenir des faisceaux de rayonnements externes émis par un accélérateur linéaire. Le principe fondateur de la radiothérapie repose sur le principe d'effet différentiel

entre les temps de réparation des tissus sains et cancéreux. La technologie IntraBeam® est une radiothérapie peropératoire qui consiste à délivrer en une seule fois, pendant l'intervention chirurgicale, une dose de rayons directement sur le lit tumoral. Cette nouvelle technique permet d'éviter 5 à 6 semaines de radiothérapie après la chirurgie pour les tumeurs à bas risque de rechute locale. Elle est en cours d'expérimentation pour les tumeurs à l'inverse, à haut risque de rechute locale, en complément de la radiothérapie externe ensuite délivrée (études cliniques prospectives en cours).

La radiothérapie induit des effets secondaires, qui peuvent être immédiats (fatigue ou radioépidermite) ou tardifs (troubles cutanés ou cancer radio-induit dans de très rare cas) (Institut National pour le Cancer, 2013; IRSN 2015).

## c) Agents anti-cancéreux

Des agents anti-cancéreux sont utilisés pour le traitement des cancers du sein. On distingue trois classes de traitements : les molécules de chimiothérapie, qui agissent sur les mécanismes de division cellulaire et provoquent la mort des cellules ; les thérapies ciblées qui bloquent des mécanismes spécifiques aux cellules cancéreuses ; et l'hormonothérapie (qui est en fait à considérer comme la plus ancienne des thérapies ciblées) qui bloque la prolifération des cellules induite par les hormones féminines sur les cellules cancéreuses (Institut National pour le Cancer, 2013).

## (1) <u>La chimiothérapie</u>

Les molécules de chimiothérapie sont séparées en différentes classes selon leurs mécanismes d'action. Comme la prolifération des cellules cancéreuses est plus rapide et avec moins de correction d'erreur que les cellules saines, elles sont plus sensibles à un dégât de l'ADN, comme son alkylation. Les agents alkylants, tels que le cyclophosphamide, sont très utilisés pour traiter le cancer du sein ; le carboplatine quand à lui, pourrait avoir un intérêt pour certains cancers du sein triple négatifs et chez les patientes mutées pour *BRCA1* ou 2 (de nombreuses études cliniques sont en cours). Les anthracyclines, inhibiteurs de la topo-isomérase II, dont la doxorubicine et l'épirubicine, sont également des agents intercalants générant des dommages à l'ADN et l'apoptose ainsi que des radicaux libres. Ce sont des cytotoxiques majeurs pour le traitement des cancers du sein (Minotti et al. 2004). Les taxanes sont enfin, une autre classe majeure de cytotoxiques (paclitaxel et docetaxel principalement). Ce sont des nolécules naturelles inhibant la fonction des microtubules et qui bloquent donc la division normale des cellules (Guastalla & Diéras 2003; Alvarez 2010). D'autres molécules peuvent être utilisées tels que les anti-métabolites analogues de la pyrimidine ou de la purine,

le fluorouracile ou la gemcitabine, qui seront incorporées dans l'ADN et l'ARN, et induiront un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose. Ces cytotoxiques sont généralement utilisés en association, afin d'augmenter la réponse aux traitements en multipliant les mécanismes d'action sans augmenter la toxicité de chacune des molécules. Du fait de l'action de ces molécules sur les cellules cancéreuses, mais aussi sur les cellules saines, ces traitements ont des effets secondaires importants qui varient selon le médicament, les doses et les personnes. La chute des cheveux les vomissements et nausées, la baisse des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes, les douleurs musculaires ou articulaires, les troubles cardiaques et une intense fatigue sont les effets secondaires les plus fréquents (Institut National pour le Cancer, 2013).

## (2) <u>Les thérapies ciblés</u>

L'amélioration des connaissances des voies dérégulées dans les cancers a permis de développer de nouvelles molécules permettant de cibler spécifiquement ces mécanismes.

# Les anticorps monoclonaux et inhibiteurs de tyrosine kinase

Pour les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2 positif, les traitements anti-HER2, dont le Trastuzumab (Herceptin®) sont devenus incontournables car ils modifient considérablement l'histoire naturelle de ces tumeurs. Le Trastuzumab est un anticorps dirigé contre le récepteur HER2 et empêche donc l'activation de ce récepteur, induisant une inhibition de la prolifération des cellules tumorales surexprimant HER2. Il entraine aussi un effet de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, qui permet grâce par exemple, au recrutement de cellules NK, la dégradation des cellules sur lesquelles sont fixées l'anticorps (Clynes et al. 2000). Il est la seule des thérapies anti-HER2 à avoir une Autorisation de AMM (Mise sur le Marché) en adjuvant. Ce traitement est administré sur une période de un an en intraveineux ou en sous-cutané, après une chirurgie et en association ou non avec une chimiothérapie ou une hormonothérapie si la tumeur exprime les récepteurs hormonaux (Institut National pour le Cancer, 2013; Kostyal et al., 2012; Lieutenant, Toulza, Pommier, & Lortal-Canguilhem, 2015; Slamon et al., 2001). Le Pertuzumab (Perjeta®) est un anticorps qui bloque les hétérodimères HER2 (alors que le Trastuzumab bloque les homodimères). Il a une AMM en première ligne métastatique associé au Docétaxel et au Trastuzumab, en néoadjuvant aux USA. Son intérêt en adjuvant est en cours d'évaluation (étude AFINHITY).

Le lapatinib (Tyverb®) et l'évérolimus (Afinitor®) sont des inhibiteurs de la tyrosine kinase des récepteurs HER1 et HER2 (Kostyal et al. 2012) et de mTOR (mammalian traget of rapamycin), respectivement. Ces agents permettent, en inhibant ces tyrosines kinase, d'induire la mort des cellules et donc de limiter la croissance et le développement tumoral. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) étant une protéine qui favorise le développement des vaisseaux sanguins, l'utilisation de Bévacizumab (Avastin®), anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A, ralentit la pousse tumorale (Montero, Avancha, Glück, & Lopes, 2012; Institut National pour le Cancer, 2013). Ces trois molécules ont une AMM en phase métastatique.

## L'Hormonothérapie

Les cancers du sein qui expriment le ER $\alpha$  et/ou le RP $\alpha$  et  $\beta$  représentent 80% des cancers mammaires (Brenton et al. 2005) qui sont dits hormonodépendants. Le fait qu'une ovariectomie puisse diminuer la progression tumorale chez certaines patientes atteinte d'un cancer du sein, a permis de découvrir les ER $\alpha$  et leurs implication dans les cancers du sein, et à inspiré la mise au point de thérapies ciblant la voie de signalisation des œstrogènes (Jordan 2006). Ce type de thérapie, appelée l'hormonothérapie, bloque les effets des hormones en agissant sur leurs récepteurs ou en inhibant leur synthèse. Ce type de traitement regroupe trois types de thérapies anti-œstrogéniques: les inhibiteurs d'aromatase (AI :Aromatase Inhibitor), les modulateurs du récepteur des œstrogènes (SERMs : Selective Estrogen Receptor Modulators) et l'antagoniste pur du récepteur des œstrogènes l'ICI 182,780 ou Fulvestrant (SERD : Selective Estrogen Receptor Downregulator).

### o Les SERMs

Les SERMs, ligands synthétiques du ER $\alpha$  et  $\beta$ , ont une action tissu-dépendante : ils se lient au ER $\alpha$  et  $\beta$  mais ils induisent une conformation du récepteur différente de celle qu'il adopte, lorsqu'il est lié aux œstrogènes, ce qui induit leur effet antagoniste ou agoniste partiel, *via* le recrutement de co-activateurs ou de corépresseurs différents selon les tissus (Heldring et al. 2007). Dans le sein, ils entrent en compétition avec les œstrogènes en se fixant sur le ER $\alpha$  et bloquent la prolifération tumorale et la survie induite par les œstrogènes, ce qui provoque l'arrêt de la croissance tumorale et la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Le Tamoxifène (Tam), l'un des premiers SERM découvert et le plus utilisé actuellement pour le traitement des cancers du sein qui exprime le ER $\alpha$  (Figure 12.A.). Le Raloxifène, un autre SERM, n'a pas d'AMM pour les cancers du sein. Le Tam, augmente le risque de cancer de

l'endomètre (Jordan & O'Malley 2007). Sur l'os, le Tam et le raloxifène, se comportent comme des œstrogènes (effet agoniste) et protège donc l'os de la déminéralisation (Jordan 2006). Le raloxifène, qui n'induit pas la cancérisation de l'endomètre est utilisé en prévention et en traitement de l'ostéoporose (Delmas 2002; Dahlman-Wright et al. 2006). Les SERM peuvent également augmenter le risque de thromboses veineuses qui sera étroitement surveillé (Obiorah & Jordan 2011; Jordan 2006). Ils diminuent le taux de cholestérol sérique (Love et al. 1992) et le raloxifène diminue le taux de LDL (Low Density Lipoprotein) circulant, considéré comme le « mauvais cholestérol» (Delmas et al., 1997).

Des SERMs de troisième génération ont vu le jour, comme le lasofoxifène, le bazedodoxifène et l'arzoxifène et sont principalement utilisés en clinique pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose. Des études cliniques sont en cours afin de montrer leur intérêt dans le traitement du cancer du sein (Obiorah & Jordan 2011).

## • Le Tamoxifène : le premier SERM

Dans les années 1960, alors que la compagnie ICI Pharmaceuticals cherche de nouveaux agents contraceptifs, Michael Harper et Arthur Walpole synthétisent un triphenyléthylene appelé ICI-46,474, plus tard appelé Tamoxifène (Jordan & Brodie 2007). Le Tam a tout d'abord été développé comme agent contraceptif, puis a été décrit quelques années plus tard comme une molécule capable d'induire l'ovulation chez la femme. Considérant l'objectif initial de la compagnie ICI Pharmaceuticals, le Tam est un échec comme contraceptif. Cependant, un des fondateurs est intéressé par le développement de thérapies anticancéreuses. V. Craig Jordan est alors recruté pour développer les anti-œstrogènes en thérapie anticancéreuse mammaire. Il s'intéresse au Tam et montre sur un modèle de carcinome mammaire chimiquement induit chez le rat que cette molécule a des propriétés anticancéreuses (Poirot 2011). Le Tam est ensuite testé pendant deux ans chez des patientes atteintes de cancer du sein avec des résultats prometteurs. Progressivement, le Tam est devenu le premier traitement administré aux patientes atteintes de cancer du sein hormono-dépendant (Nagaraj & Ma 2015). En effet, un traitement adjuvant de 5 ans par le Tam permet de réduire de 45% le risque de rechute et de 32% la mortalité et a donc permis de sauver des milliers de vie (Puhalla et al. 2009). L'utilisation et les bénéfices importants du traitement à long terme du Tam, ont permis de considérer cette molécule comme le premier agent de prévention des cancers. Il fut autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) en 1998 comme traitement préventif des cancers du sein chez les femmes en pré- et post-ménopause à risque, à la suite d'une étude clinique, réalisée chez 13 800 femmes (Jordan 2006).

Le Tam est métabolisé dans le foie par les cytochromes CYP2D6 et CYP3A4 en 4hydroxytamoxifène et en endoxifène, métabolites « actifs » du Tam (Figure 12.B.), qui ont une affinité 100 fois plus élevée pour le ER $\alpha$  que le Tam (Jordan 2007). Cependant, ces molécules sont de moins bons agents pharmacologiques puisqu'ils sont métabolisés plus rapidement par l'organisme que le Tam, lequel est accumulé dans les organes (Maximov et al. 2014). En effet, 98% du Tam présent dans la circulation sanguine, est sous forme liée aux protéines du sérum, principalement l'albumine, et est ensuite relargué dans les tissus ce qui induit l'accumulation du Tam. Il a été montré que malgré la faible concentration de Tam dans le sang, des patientes recevant un traitement par Tam (40mg/jour) avaient des concentrations de Tam intra-tumoral assez importantes, de l'ordre du  $\mu$ M alors que la concentration de l'œstradiol est de l'ordre du nM (0,67 à 14 $\mu$ M) (Clarke et al., 2001). Cette grande disponibilité dans la tumeur, explique que le Tam soit un traitement aussi important pour le traitement des cancers du sein hormono-dépendant.

En tant que le SERM, le Tam se lie au ER $\alpha$  mais induit une conformation du récepteur différente de celle produite par la liaison avec le E2 (Heldring et al. 2007). Dans le sein, le Tam inhibe la transcription de gènes cibles du ER $\alpha$  impliqués dans la prolifération et la survie des cellules, ce qui provoque l'arrêt de la croissance tumorale et la mort des cellules cancéreuses par apoptose alors qu'il a un effet antagoniste sur la prolifération des cellules de l'endomètre (Jordan & O'Malley 2007). En plus des voies génomiques, le Tam, tout comme l'E2 peut agir selon des mécanismes se déroulant au niveau de la membrane plasmique ou du cytoplasme. Ainsi le Tam semble inhiber les voies de signalisation PI3K/AKT et l'activité MAPK ce qui inhibe la prolifération cellulaire, de manière indépendante du ER $\alpha$  (Lam et al. 2009).

En plus de ces mécanismes, une nouvelle cible du Tam a été caractérisée par notre équipe. En effet, la ChEH ou Cholesterol Epoxyde Hydrolase, portée par le AEBS (Anti-Estrogen Binding Site), est impliqué dans les effets anti-prolifératifs, de différentiation et de mort cellulaire du Tam (Segala et al. 2013; de Medina, Paillasse, et al. 2010a). Ce sujet sera développé plus en détails dans la partie II-C.

Le Tam, dont l'histoire a commencé il y a plus de 40 ans, reste encore un traitement très utilisés pour les cancers du sein hormono-dépendants en phase métastatique comme en adjuvant; c'est le traitement qui est très majoritairement prescrit chez la femme non ménopausée en adjuvant pour 5 voire 10 ans. Il est également le seul médicament approuvé par la FDA, à être utilisé en prévention des cancers du sein pour les patientes à risque. Le

Tam, a ainsi sauvé la vie de plus de plus d'un million de femmes à travers le monde. Grâce à la découverte récente de nouveaux mécanismes d'actions, le Tam n'a pas encore dévoilé tous ses secrets.

#### • Le Fulvestrant (Faslodex®)

L'ICI182780 ou fulvestrant (Figure 12.C.) est un anti-œstrogène pur qui possède un mode d'action unique. En effet, il se lie au récepteur, bloque sa dimérisation et dégrade le ERα au niveau du protéasome, ce qui conduit à une inhibition du mécanisme d'action des œstrogènes. Il est considéré comme un SERD (Selective Estrogen Receptor Downregulator). Le fulvestrant, par son mode d'action, n'induit pas le risque de développer un cancer de l'endomètre. Du fait de son mécanisme, le fulvestrant peut-être utilisé en traitement du cancer du sein résistant au Tam. Le Fulvestrant constitue un des médicaments les plus utilisés pour le traitement des cancers du sein hormono-dépendants métastatiques (Valachis et al. 2010; Johnston 2010).

## • Les inhibiteurs d'aromatase

Au moment où les premières études cliniques du Tam commençaient, le Dr. Angela Brodie s'est intéressée à la possibilité d'utiliser des inhibiteurs d'aromatase, l'enzyme clé de la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes chez la femme ménopausée, pour traitement des cancers du sein. Après avoir montré que le 4-hydroxyandrosténedione, était le plus efficace des AI, des études cliniques ont démontré l'efficacité de la molécule en clinique. C'est ainsi que le 4-hydroxyandrosténedione est devenu le premier AI utilisé (Jordan & Brodie 2007). Depuis, des inhibiteurs de troisième génération ont été développés, l'anastrozole, le létrozole et l'éxemestane (Figure 12.D). Leur efficacité a été démontrée dans le traitement de cancer du sein ERa positif, chez les patientes en post-ménopause, pour qui la synthèse des œstrogènes se fait principalement dans les tissus périphériques (Cella et al. 2006; Arimidex 2008). L'éxemestane est un AI qui se lie irréversiblement à l'aromatase alors que l'anastrozole ou le létrozole, sont des AI non-stéroïdiens qui se lient de manière réversible. Différents essais cliniques ont montré que ces molécules avaient une efficacité supérieure au Tam chez les femmes ménopausées en métastatique d'abord puis en adjuvant (Arimidex 2008; Obiorah & Jordan 2011; Cella et al. 2006). Ce qui fait des inhibiteurs d'aromatase, le traitement de référence chez la femme post-ménopausée.



**Figure 12:** Les principales molécules utilisées en hormonothérapie et métabolisme du Tamoxifène. L'hormonothérapie des cancers du sein repose sur trois classes d'agents thérapeutiques : **A.** les SERMs, avec comme chef de file le Tamoxifène, **B.** dont les métabolites actifs sont le 4-hydroxytamoxifène et l'endoxifène, synthétisés par le CYP2D6 et le CYP3A4/5 respectivement, **C.** les SERDs et **D.** les inhibiteurs d'aromatase. Ces molécules ciblent la voie des œstrogènes, **E.** parmi lesquels l'oestradiol est le plus actif.

# 5. Résistance des cancers du sein à l'hormonothérapie

En clinique, le niveau d'expression des ER $\alpha$  et PR $\alpha$  et  $\beta$  sont actuellement les seuls marqueurs utilisés pour prédire la réponse à l'hormonothérapie. Cependant, ce type de traitement est limité par les phénomènes de résistance intrinsèque ou acquise. En effet, 25% des tumeurs ER+/PR+, 66% des tumeurs ER+/PR- et 55% des tumeurs ER-/PR+ ne répondent pas au Tam (Ma et al. 2004). Des patientes qui ont montré des résistances intrinsèques ou acquises au Tam, peuvent répondre aux AI ou au fulvestrant, ce qui prouve que les voies du ER $\alpha$  continuent de jouer un rôle important dans la prolifération (Bedard et al. 2008).

Plusieurs mécanismes de résistance aux hormonothérapies ont été décrits :

- Des mécanismes pharmacogénomiques. Par exemple, la métabolisation du Tam en endoxifène, un de ces métabolites actifs, est sous dépendance du cytochrome P450 CYP2D6. Des études suggèrent que certaines patientes répondant moins au Tam, pourraient posséder un variant du gène codant pour CYP2D6 qui est inactif. Elles ne peuvent donc pas métaboliser le Tam sous sa forme active. Les SSRI (Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors), anti-dépresseurs parfois utilisés, pour le traitement des bouffées de chaleurs sont des inhibiteurs du CYP2D6, ce qui inhibe donc la métabolisation du Tam (Bedard et al. 2008). Ils sont donc à proscrire chez les patientes qui prennent du Tam (Stearns et al. 2003; Jin et al. 2005).
- <u>Hyper-activation des voies de signalisations intra-cellulaires.</u> Par exemple, une augmentation des récepteurs des facteurs de croissance, tels que HER1 et HER2, peut être observée dans les tumeurs, ce qui mène à l'activation ligand-indépendante du ERα grâce à une cascade de phosphorylation impliquant notamment la voie AKT/mTOR (Bedard et al. 2008). Il a aussi été mis en évidence que le Tam pouvait être un agoniste des récepteurs HER1 et HER2 dans les tumeurs, corrélé avec une augmentation de HER2 et MAPK, ce qui augmente la prolifération cellulaire. Ce mécanisme peut expliquer que les AI ou le fulvestrant soient actifs sur des tumeurs ayant développé des résistances au Tam (Jordan & O'Malley 2007).
- <u>Des mutations de l'ERa</u> (chez 3% des patientes environ) peuvent induire l'inhibition des effets agonistes du Tam. Certaines de ces mutations sont capables de diminuer l'activation de la transcription sans modifier l'affinité du Tam pour le ERa ou la liaison du ERa sur l'ADN, ou bien altèreront la liaison du Tam sur le ERa, ou encore feront que le ERa est transcriptionellement actif indépendamment des œstrogènes (Ring & Dowsett 2004). Des mutations somatiques des gènes codant pour *PI3CKA* ou *P53*, par exemple, ont été associées à la résistance aux AI, tout comme des mutations sur le gène codant le ERa (*ESR1*) (Ma, Reinert, Chmielewska, & Ellis, 2015).
- La perte de l'expression de l'ERα dans les métastases, comparée aux tumeurs primaires, est l'un des mécanismes associés aux phénomènes de résistance acquise. Alors que l'augmentation de la présence du ERα à la surface des cellules a été montrée comme responsable de résistance au traitement. Le traitement par le Tam au long terme, peut induire une hypersensibilisation des tumeurs aux œstrogènes (Berstein et al. 2004). Ainsi ces tumeurs se développeront rapidement avec un faible taux d'œstrogène. La perte du PR dans les tumeurs ERα+ augmente l'expression de HER1

et HER2 et diminue l'expression de PTEN, qui favorise le développement tumoral (Bedard et al. 2008).

- L'augmentation de certains co-activateurs et la diminution de co-répresseurs, après un long traitement au Tam, peut aussi augmenter l'effet agoniste du Tam sur le ERα (Clarke et al. 2003; Ring & Dowsett 2004).
- <u>Le microenvironnement</u> péri-tumoral joue également un rôle important dans la résistance des cancers du sein à l'hormonothérapie, notamment grâce à la mise en lumière de l'effet protecteur des CAFs (Cancer Associated Fibroblast), qui augmente l'activité mitochondriale des cellules épithéliales et la protection des cellules de l'apoptose (Martinez-Outschoorn et al. 2011).
- <u>Le métabolisme des stérols</u> est impliqué dans les phénomènes de résistance puisque des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol et dans son métabolisme, ont été montrées comme étant prédictives de la réponse au Tam (Pitroda et al. 2009).

Malgré l'ensemble de ces connaissances, l'importance du ER $\alpha$  dans les cancers du sein qui en fait une cible thérapeutique importante et le développement de thérapies ciblées, les échecs thérapeutiques et les récidives des cancers du sein sont encore mal compris, indiquant qu'il est nécessaire de mieux caractériser les acteurs moléculaires impliqués non seulement dans l'étiologie mais aussi dans la résistance aux traitements déployés. Ceci conduira à un meilleur phénotypage des tumeurs afin de permettre une médecine personnalisée et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour compléter l'arsenal thérapeutique existant.

Il a été observé que la reprogrammation tumorale met en jeu des altérations majeures du métabolisme lipidique (Kroemer & Pouyssegur 2008). Récemment, le métabolisme des stérols a été impliqué non seulement dans le développement des cancers du sein (Nelson et al. 2013; Silvente-Poirot & Poirot 2012a; Llaverias et al. 2011; Villablanca et al. 2010), mais aussi dans la résistance au Tam (Poirot et al. 2012; Pitroda et al. 2009).

Chapitre II - Le métabolisme du cholestérol

# A. Le cholestérol

Le cholestérol est un des lipides les plus intéressants dans la nature. Contrairement aux autres lipides, il est retrouvé à de fortes concentrations dans les membranes des cellules des mammifères. Il n'est donc pas surprenant que le cholestérol joue des rôles aussi importants que divers, qui vont de la structuration et du maintien des membranes, à la synthèse d'hormones stéroïdes ou de vitamines (Róg et al. 2009).

# 1. Structure du cholestérol

Le cholestérol est formé d'un noyau tétracyclique stérol, composé de quatre cycles carbonés notés A, B C ou D (Figure 13. A.), d'une chaine iso-octyl en position 17 et d'une fonction alcool (Figure 13. B.). C'est une molécule hydrophobe, à l'exception de son groupement hydroxyle sur le carbone 3, qui constitue la tête polaire et donc la partie hydrophile de la molécule, ce qui lui donne son caractère amphiphile. Les jonctions des cycles sont en *trans*, ce qui lui confère une structure plane et rigide (Figure 13. C.). Le caractère tridimensionnel de la molécule est très important, puisque le groupement hydroxyle en 3, les deux méthyles en 18 et 19 ainsi que la chaine alkyle sont situés du même coté de la molécule : sur la face  $\beta$  (Ohvo-Rekilä et al. 2002).



**Figure 13: Structure du cholestérol. A.** Numérotation des atomes de carbone et des cycles. **B**. Eléments structuraux composant le cholestérol. **C.** Structure tridimensionnelle du cholestérol, avec la face α et la face β qui comporte tous les groupement de la molécule. *Adapté de Rog et al., 2009.* 

# 2. Rôle physiologique du cholestérol

Le cholestérol est un composant crucial de la membrane lipidique. Il joue un rôle très important dans l'organisation, la dynamique et le fonctionnement des membranes. Il permet

## Introduction - Chapitre II – Le métabolisme du cholestérol

de moduler la physico-chimie des membranes cellulaires. En effet, il interagit avec les phospholipides et les sphingolipides qui forment la membrane plasmique et influence leurs propriétés. Il se place entre les lipides, avec la tête polaire au niveau de la phase aqueuse, et le corps rigide de la molécule aligné avec les chaines d'acides gras des phospholipides. Le cholestérol tend à augmenter la rigidité des membranes et donc permet de les ordonner (Figure 14.) (Smondyrev & Berkowitz 1999). Le taux de cholestérol composant les membranes permet à celles-ci d'être dans un état dit liquide-cristal. Cette nouvelle capacité leur permet la diffusion latérale de composants de la membrane, tout en augmentant leur résistance mécanique et en diminuant leur perméabilité passive (Ohvo-Rekilä et al. 2002).



Figure Effet du cholestérol membranes. 14: sur les Α. Modélisation d'une bicouche de dipalmitoyphosphatidylcholine (DPPC) comprenant 11 mol% de cholestérol. B. Modélisation de cette même couche lipidique de DPPC après augmentation du taux de cholestérol en vert à 50 mol%. On observe une plus grande organisation de cette bicouche lipidique grâce à l'ajout de cholestérol. D'après Smondyrev and Berkowitz, 1999

Le cholestérol influence de nombreuses protéines de la membrane, notamment les récepteurs couplés aux protéines G, en modulant l'activité de ces protéines de manière directe par interaction spécifique, ou bien par effet indirect en altérant les propriétés de la membrane (Lee 2011; Paila & Chattopadhyay 2009; Chattopadhyay et al. 2015).

En plus de sa capacité à augmenter la stabilité des membranes, le cholestérol, dans des zones spécifiques, riches en cholestérol, est capable de former des structures spéciales, que sont les radeaux lipidiques ou les cavéoles. Ces structures, plus rigides, ont une composition particulière en protéines et des propriétés spécifiques (Simons & Ikonen 1997). En effet, les rafts lipidiques sont impliqués dans le trafic intracellulaire de lipides et de protéines, la présentation de protéines et la transduction du signal (Lingwood & Simons 2010). Les cavéoles permettent principalement les mécanismes d'endocytose (Lajoie & Nabi 2010;

Parton & Simons 2007; Parton & del Pozo 2013). Ces propriétés sont spécifiques du cholestérol puisque l'utilisation de desmostérol modifie fortement la structure des membranes et l'activation des protéines, alors que ces deux molécules sont différenciées par seulement une double liaison en 24-25 (Vainio et al. 2006).

De plus, le cholestérol est un précurseur des hormones stéroïdiennes (Figure 15.) telles que les glucocorticoides (cortisol, corticostérone) et les minéralocorticoïdes (aldosterone) produits dans les glandes surrénales ; les œstrogènes (œstradiol), les progestagènes (progéstérone) et les androgènes (testostérones) dans les gonades ainsi que la vitamine D produite dans le rein. Ces hormones indispensables à la vie des mammifères sont produites par des enzymes spécifiques présentes dans les mitochondries des tissus stéroïdogéniques primaires (Miller 2013). L'étape initiale est commune à toutes les hormones et consiste à la formation de la prégnénolone à partir du cholestérol par coupure de la chaine alkyle du cholestérol entre les carbones 20 et 22. Cette réaction est réalisée par le cytochrome P450scc (cholesterol Side-Chain Cleavage) (Hanukoglu 1992).

D'autre part, les oxystérols, molécules issues de l'oxydation du cholestérol, sont des composés jouant un rôle important dans la physiologie cellulaire. Ils sont considérés comme des molécules de signalisation pouvant avoir une action régulatrice de différents métabolismes grâce à leur liaison sur des récepteurs tels que les LXR (Liver X Receptor), le LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) ou SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*), qui contrôlent notamment l'homéostasie du cholestérol. Cependant, de plus en plus d'études mettent en avant leurs rôles dans diverses pathologies (McDonnell et al. 2014; Lordan et al. 2009; Xu et al. 2011; Schroepfer 2000; Silvente-Poirot & Poirot 2014; Nelson et al. 2014). Ces molécules seront plus détaillées dans la partie II.B.



Figure 15: Le cholestérol en tant que précurseur des hormones stéroïdiennes: androgènes, œstrogènes, glucocorticoides, minéralocorticoides, et progestagènes.

# 3. Les différentes sources du cholestérol

Le cholestérol présent dans l'organisme provient de deux sources distinctes : de l'alimentation qui constitue la source exogène et de la biosynthèse endogène du cholestérol, majoritairement dans le foie et l'intestin.

Une quantité importante de cholestérol est issue de l'alimentation, puisque l'on considère que 300 à 500 mg de cholestérol provenant de l'alimentation sont absorbés chaque jour par un homme. Ce cholestérol est capté au niveau de l'intestin et exporté vers le foie puis distribué

aux autres tissus par les LDL (Repa & Mangelsdorf 2000). Ces lipoprotéines, transportant le cholestérol libre et estérifié, circulent dans le sang vers les tissus périphériques depuis le foie. Après fixation sur le LDLR, situé au niveau de la membrane plasmique, le LDL est internalisé dans des endosomes. Les lipides et les protéines contenues dans les LDL sont hydrolysés pour former notamment du cholestérol libre et des acides gras. Le LDLR est recyclé vers la membrane plasmique. Le cholestérol libre peut ainsi intégrer et ordonner les membranes plasmiques, former les hormones stéroïdiennes, être estérifié par ACAT (Acyl-CoA Cholestérol Acyl tranférase) pour être stocké sous forme d'ester, et inhiber sa propre synthèse ainsi que celle des LDLR (Chang et al. 2006). La formation intracellulaire d'esters de cholestérol a deux buts physiologiques : 1- La limitation du taux de cholestérol et d'oxystérols libres dans les cellules et 2- la constitution dans les cellules de stocks de cholestérol. Dans les cellules, les enzymes responsables de l'estérification du cholestérol sont les ACAT 1 (Suckling & Stange 1985) et ACAT-2 (Cases et al. 1998). Ces enzymes estérifient le cholestérol ainsi que certains de ses dérivés à l'aide d'acyl-CoA. La LCAT (Lecithin-Cholestérol Acetyl transferase) est une enzyme plasmatique associée aux HDL (High Density Lipoprotein) et dont l'activité assure l'estérification du cholestérol libre (Glomset 1968). L'hydrolyse des esters de cholestérol est effectuée par la NCEH (Neutral cholesterol ester hydrolase) (Chang et al. 2006).

Le cholestérol n'est pas considéré comme essentiel, puisqu'il peut être synthétisé par l'organisme pour compléter les besoins de l'organisme. En effet, en plus de l'apport exogène en cholestérol, toutes les cellules sont capables de synthétiser leur propre cholestérol même si le lieu principal de synthèse est le foie (50% de la synthèse) (Repa & Mangelsdorf 2000). Il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique des cellules, où se trouvent la plupart des enzymes responsables de sa biosynthèse (Luu et al. 2015) La première étape consiste en une condensation de trois molécules d'acétyl-CoA pour former le HMG-CoA (3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-CoenzymeA). La transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par la HMGCR (3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-CoenzymeA réductase) est l'étape limitante de la synthèse du cholestérol qui compte au total 21 réactions enzymatiques (Brown & Goldstein 1980). La synthèse est séparée en deux étapes principales : les étapes pré- et post-lanostérol.

La partie pré-lanostérol (Figure 16.A.), après formation du mévalonate consiste en une série de condensations pour former le farnésyl-pyrophosphate. C'est un composé clé car il mène à la formation de trois différentes voies dont la voie du cholestérol (Brown & Goldstein 1980).

La condensation de deux farnésylpyrophosphates par la squalène synthase donne le squalène, qui est ensuite époxydé par le squalène oxydase et enfin cyclisé en lanostérol (Waterham & Wanders 2000).

Le lanostérol conduit ensuite au cholestérol par deux voies parallèles dites de Bloch (Bloch 1965) et de Kandusch-Russel (Kandutsch & Russell 1960) (Figure 16.B.). Ces deux voies partagent les mêmes enzymes, ce qui les différencie est la première étape et la dernière étape (Ačimovič & Rozman 2013). Ainsi, le zymostérol et le zymosténol sont des précurseurs du cholestérol des voies Bloch et Kandutsch respectivement. Ce qui sépare ces deux molécules, c'est une double liaison en position 24, qui sera ensuite réduite par la DHCR24 (24-dehydrocholesterol reductase) lors de la dernière étape de la voie de Bloch (Waterham & Wanders 2000; Kedjouar, De Médina, et al. 2004).



**Figure 16: Biosynthèse du cholestérol. A.** Les étapes pré-lanostérol : de l'acétyl-CoA au lanostérol. **B.** Les étapes postlanostérols, avec les deux voies menant au cholestérol: la voie Bloch et la voie Kandutsch-Russelll. *Adapté de Acimovic, 2013* 

# 4. Homéostasie du cholestérol

Le taux intracellulaire de cholestérol est régulé par plusieurs voies dans les tissus périphériques : i) d'une part , par la balance entre l'apport extérieur par les LDL et son efflux par les HDL ; ii) d'autre part, par la régulation de sa synthèse endogène dans le foie majoritairement, mais aussi dans le cerveau, les glandes surrénales, l'intestin, le colon ou les tissus stéroïdogéniques (ovaires, testicules, prostate) (Dietschy et al. 1993; Van Der Wulp et al. 2013; Pikuleva 2006b); principalement au niveau de la HMGCR, et le stockage sous forme d'esters de cholestérol.

## 5. Contrôle transcriptionnel de la synthèse du cholestérol

L'apport de cholestérol par la voie exogène et par sa biosynthèse à partir de l'acétyl-CoA est contrôlé principalement par le cholestérol lui-même. En effet, quand les cellules ont besoin de cholestérol, la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse ou l'import du cholestérol est augmentée grâce à l'action de facteurs de transcription liés aux éléments de réponse aux stérols (SRE). Ainsi, les protéines de liaison aux éléments de réponse aux stérols (SREBP), reconnaissent ces séquences et sont les contrôleurs majeurs de la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, dont ceux impliqués dans sa biosynthèse et son import dans les cellules (HMGCR et LDLR respectivement). Il existe deux isoformes de SREBP présents dans le réticulum endoplasmique. SREBP-1c est impliqué dans la stimulation de la synthèse des acides gras et SREBP-2 dans la stimulation de celle du cholestérol et régule le LDLR (Espenshade & Hughes 2007). L'activation de SREBP se fait par clivage protéolytique au niveau du Golgi par les protéases S1P et S2P (protéases du site 1 et 2) lorsque la synthèse de cholestérol est nécessaire. Le transport et donc l'activation des SREBP est régulée par la protéine Scap (SREBP cleavage-activating protein) qui contient un domaine de détection des stérols par lequel se fait la modulation du métabolisme. En absence de stérols, Scap se dissocie de Insig (Insulin-induced gene) et se lie à SREBP, et favorise son export vers le golgi. La protéine activée est alors transportée dans le noyau pour activer la transcription de ses gênes cibles tels que la HMGCR et le LDLR (Brown & Goldstein 1997). La HMGCR possède également un domaine de détection des stérols semblable à celui de Scap. Elle est donc également régulée de façon à délivrer un taux constant de substrats pour la synthèse du mévalonate, tout en réduisant l'accumulation de cholestérol ou de ses précurseurs (Goldstein & Brown 1990).

## a) Elimination de l'excès de cholestérol

Comme nous l'avons vu, l'efflux et l'estérification du cholestérol permet de réguler son homéostasie.

L'efflux du cholestérol est sous contrôle du récepteur LXR $\alpha$  (Liver X receptor  $\alpha$ ), un récepteur nucléaire qui est un facteur de transcription ligand-dépendant modulant entre autres le taux de protéines de transport ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) et ABCG1 (ATP Binding Cassette G1) impliquées dans le transport du cholestérol vers la membrane plasmique, pour son appariement aux lipoprotéines formant les HDL et son export vers le foie (Gelissen et al. 2006). Ainsi l'élimination du cholestérol en excès dans les cellules se fait grâce aux HDL (Lewis & Rader 2005). La fonction des HDL est d'assurer le transport inverse du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie. ABCA1, permet le transfert du cholestérol libre de la cellule vers les HDL. Le cholestérol est ensuite estérifié dans les HDL grâce à la LCAT. Au niveau du foie les HDL sont reconnues par les SRB1 (Scavanger Receptor class B1) (Rigotti et al. 1997) et par la voie F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> (Martinez et al. 2003; Serhan et al. 2013). Finalement, l'élimination du cholestérol se fait par la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires puis celui-ci sera éliminé dans les fèces (Chang et al. 2006).

De plus, le cholestérol peut également être transformé en acides biliaires grâce à son oxydation par des cytochromes P450. Il est transformé en petites molécules solubles au niveau du foie, pour être éliminé de l'organisme après sa transformation en acides biliaires. Il est excrété après passage dans l'iléum et dans l'intestin. Cette transformation permet à l'organisme d'éliminer le cholestérol mais également les hormones stéroïdes et les oxystérols, espèces oxydées du cholestérol ainsi que les catabolites du foie (Boyer 2013).

## 6. Le cholestérol dans les cancers du sein

Le cholestérol est un élément essentiel des membranes cellulaires et son homéostasie est cruciale pour la fonction des cellules normales (Maxfield & Tabas 2005). Le cholestérol est associé au cancer puisqu'il est le précurseur des hormones stéroïdiennes largement impliquées dans la progression tumorale, comme les œstrogènes ; ou bien dans la mort cellulaire, avec le cortisol, (Silvente-Poirot & Poirot 2014). Différentes études ont suggéré un lien entre obésité, prise de poids, régime riche en cholestérol et l'augmentation du risque de développer un cancer du sein, mais ceci reste encore controversé (McDonnell et al. 2014; Lof & Weiderpass 2009; McMillan et al. 2006; McPherson et al. 1994). L'obésité et une alimentation riche sont
associées à une modification du métabolisme des lipides et à la diminution du niveau de HDL (Kim et al. 2009). Il semblerait que l'augmentation de la consommation de cholestérol soit corrélée à l'augmentation du risque de cancer du sein chez la femme post-ménopausée (Cohen, 1994; Danilo & Frank, 2012; McPherson, Steel, & Dixon, 2000; Miller et al., 1978; Rossi, Pericleous, Mandair, Whyand, & Caplin, 2014; Sieri et al., 2008). En effet, il a été observé chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, une altération du profil lipidique, avec notamment une diminution du taux de cholestérol, ce qui suggère que la diminution de cholestérol plasmatique soit associée à l'augmentation du besoin en cholestérol de la tumeur (Kritchevsky & Kritchevsky 1992). D'autres études ont cherché à établir une corrélation entre l'inhibition de la synthèse du cholestérol et le risque de cancer du sein. L'utilisation de statines, médicaments qui inhibent la HMGCR, a été associée, à la fois à un risque accru, et à la réduction des cancers du sein. Une étude récente a montré qu'un traitement à long terme par les statines, doublait le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées (McDougall et al. 2013).

Plusieurs équipes ont révélé une cartographie plus complexe de l'influence du métabolisme du cholestérol sur la promotion ou la suppression de cancer du sein, qui pourrait expliquer ces études contradictoires. En effet, le travail de différentes équipes a démontré que le métabolisme du cholestérol était impliqué dans la pousse tumorale et la résistance des cancers du sein à l'hormonothérapie, mais aussi dans leur suppression (Silvente-Poirot & Poirot 2014). Le fait que le taux de cholestérol plasmatique ou le taux de HDL ou LDL puisse augmenter le risque de cancer du sein est plutôt controversé (Danilo & Frank 2012). Cependant, l'équipe du Dr. Frank a montré *in vivo* et *in vitro* l'implication du cholestérol, et des HDL et LDL dans la prolifération et l'invasion des cancers du sein, et que l'accumulation d'esters de cholestérol inhibait la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses (Llaverias et al. 2011). De même, il a été montré que l'inhibition de ACAT, l'enzyme responsable de l'estérification du cholestérol, diminuait la prolifération et l'invasion (Paillasse et al. 2009). De plus, l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol, à différentes étapes postlanostérol, a également été montrée comme ayant un impact sur la prolifération et la prolifération

Il a été mis en évidence que les stérols avaient des effets importants sur l'activité des voies de signalisation. En effet, l'activité accrue des facteurs de croissance ou des récepteurs d'hormones stéroïdes dans les cellules cancéreuses actives SREBP, favorisent l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol et l'absorption de cholestérol, par l'intermédiaire de voies de signalisation, telles que les voies PI3K / AKT, MAPK, mTOR et

EGFR (Gabitova et al. 2014; Maxfield & Tabas 2005; Gorin et al. 2012). Il a été montré que l'inhibition de SC4MOL (sterol-C4-méthyl oxidase-like), enzyme impliquée dans la biogénèse du cholestérol, permettait l'accumulation de 4-méthylstérols et sensibilisait les tumeurs aux inhibiteurs de l'EGFR (Sukhanova et al. 2012). Ainsi les auteurs proposent de cibler les enzymes impliquées dans les voies métaboliques des stérols comme stratégies anticancéreuses.

Dans ce contexte, le 27-OHC (27-hydroxycholestérol), un métabolite oxydé du cholestérol, a été montré comme promoteur de tumeur grâce à son interaction sur le ERα et le LXR. Chez les patientes, l'augmentation du taux de cytochrome P450, CYP7B1, responsable de l'élimination du 27HC, est associée à une augmentation du taux de survie, alors que l'augmentation du CYP27A1, qui transforme le cholestérol en 27HC a été observée dans des tumeurs plus agressives. De plus, les échantillons de tumeurs de patientes ont un taux plus élevé de 27-HC comparé au tissu sain adjacent. Ceci montre une dérégulation de la production de 27-HC lors de la carcinogénèse vers sa production (Nelson et al. 2013).

En 2009, Pitroda et al. ont caractérisé une signature transcriptionnelle, impliquant différents gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, associée à la résistance des patientes à l'hormonothérapie et à un mauvais pronostique. Ainsi, la forme tronquée de la Mucin 1, une glycoprotéine surexprimée dans les cancers, induit une modulation transcriptionnelle du métabolisme des stérols et des lipides dans les cancers du sein, qui est prédictive de la réponse au Tam. On retrouve parmi ces gènes, ceux codant pour ACAT; et la DHCR7 (3βhydroxysterol- $\Delta$ 7-reductase), enzyme qui produit le 7-dehydrocholestérol à partir de cholestérol, et qui est une des sous-unités de la ChEH qui catalyse l'hydratation des 5,6-EC (5,6-époxicholestanols) (Pitroda et al. 2009). De plus, notre équipe a montré que la ChEH était une cible thérapeutique du Tam, dont l'action n'est pas seulement limitée au ER $\alpha$  ou  $\beta$ (de Medina, Paillasse, et al. 2010a). L'inhibition de la ChEH par le Tam, induit l'accumulation de 5,6-EC, qui mène à la mort et à la différenciation cellulaire grâce à un mécanisme dépendant et indépendant des LXR (Segala et al. 2013). Ainsi, la dérégulation du métabolisme du cholestérol et de la production de métabolites issus de sa production, induit la promotion des cancers du sein ou la résistance aux thérapies (Poirot et al. 2012; Gabitova et al. 2014).

D'un autre coté, notre équipe à mis en évidence l'existence d'un nouveau métabolite issu du métabolisme de cholestérol, la DDA (Dendrogenine A), comme étant un suppresseur de

tumeur. En effet, l'équipe a montré que la DDA permet la différenciation et la mort des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* et augmente la survie des souris. Cette molécule est le produit de la réaction chimique des 5,6-EC avec l'histamine, générant une nouvelle classe de stérols, les aminostérols. De plus, les taux de la DDA sont fortement diminués dans les tumeurs de patientes, comparés aux tissus sains adjacents, suggérant une dérégulation de sa synthèse durant la carcinogénèse (de Medina et al. 2013). Ses propriétés et son taux diminué dans les tumeurs suggèrent que la fonction physiologique de la DDA permet le maintien de l'intégrité cellulaire et de la différenciation.

Il semble donc exister une balance métabolique centrée sur la régulation du métabolisme du cholestérol et de ses dérivés (Figure 17), qui mène d'un coté à la prolifération des tumeurs et à la résistance aux traitements et de l'autre à la différenciation et la suppression des tumeurs. Au vu de l'importance grandissante de l'implication du métabolisme du cholestérol dans les cancers, il semble nécessaire de mieux décrypter son implication (Huang & Freter 2015) ainsi que de cartographier, chez les patientes, la présence de ces dérivés et des enzymes les régulant. Ceci mènera à une meilleure compréhension du métabolisme du cholestérol et au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du cancer du sein (Silvente-Poirot & Poirot 2014; Mandal 2014).



**Figure 17: Balance métabolique du cholestérol.** Les dérégulations du métabolisme du cholestérol peuvent favoriser l'accumulation de métabolites aux propriétés de promoteurs de tumeur, comme le 27HC, et également inhiber la formation de suppresseurs de tumeurs, tels que la DDA. *D'après de Silvente-Poirot & Poirot, 2014* 

# **B.** Les oxystérols

Les oxystérols sont des molécules oxydées issues du cholestérol ou du lanostérol (Figure 18). Ils peuvent être fonctionnalisés par une ou plusieurs fonctions hydroxyle, cétone, aldéhyde, époxyde ou hydropéroxyle. L'oxydation peut se trouver sur le noyau stéroïdien ou sur la chaine latérale. La double liaison présente sur le cycle B favorise l'oxydation des fonctions 4, 5. 6 et 7 (Veiux et al. 2008). Ces molécules sont formées par de l'auto-oxydation comme le 7-KC (7-ketocholestérol), ou le 7b-OHC (7b-hydroxycholestérol); ou grâce à des réactions enzymatiques comme pour le 7b-OHC, 24 (S)-, 25-, ou le 27-hydroxycholestérol (24(S)-OHC, 25-OHC ou le 27-OHC respectivement). L'introduction d'une fonction oxygénée augmente la polarité de ces molécules et induit le changement de leur structure en trois dimensions qui modifient leurs propriétés. Comme le cholestérol, les oxystérols peuvent composer les membranes, mais en raison de leur hydrophilie considérablement accrue, ils se déplacent beaucoup plus rapidement entre les membranes et sont donc plus facilement accessibles aux récepteurs présents dans le cytoplasme (Olkkonen & Hynynen 2009). Grâce à leur hydrophilie, ils sont également plus solubles dans le plasma, et leur transport vésiculaire des tissus périphériques vers le foie est accru (Vejux et al. 2008). Ils sont retrouvés dans les tissus et la circulation chez les mammifères, mais à de très faibles doses comparées au cholestérol. L'enrichissement en oxystérol est associé à différentes pathologies comprenant l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'ostéoporose, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la cataracte ou bien les cancers (Vejux & Lizard 2009; Nelson et al. 2013; Silvente-Poirot & Poirot 2014; Gorin et al. 2012; Waterham & Wanders 2000; Zarrouk et al. 2014).



Figure 18: Structure de quelques oxystérols.

# 1. Source

Tout comme le cholestérol, les oxystérols peuvent provenir de l'alimentation ou être produits de manière endogène. On distinguera alors les oxystérols formés par auto-oxydation ou ceux formés par voies enzymatiques (Schroepfer 2000).

Les oxystérols sont présents dans les produits riches en cholestérol, notamment le lait, les œufs, le beurre ou la charcuterie. En effet, les produits contenant du cholestérol sont susceptible d'être oxydés du fait de la déshydratation, de la durée de stockage, de hautes températures ou de la cuisson des aliments en présence d'oxygène (Schroepfer 2000). Sous ces conditions le cholestérol est exposé à différentes ROS (Reactive oxygen species) ou à des radicaux libres. Les oxystérols issus de l'alimentation, les plus souvent détectés sont les 7-KC (7-ketocholestérol), 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC (7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxycholestérol), les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ - EC (5,6 $\alpha$ - et 5,6 $\beta$ - époxycholestanols), et le CT (cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol) ; mais aussi les oxystérols hydroxylés sur la chaine latérale comme le 19-, 20 $\alpha$ -, et 25-hydroxycholestérol présents en plus faible quantité (Leonarduzzi, Sottero, & Poli, 2002; Vejux & Lizard, 2009).

Les oxystérols provenant de l'alimentation suivent la même voie d'absorption que le cholestérol : ils sont principalement absorbés dans l'intestin, rapidement transportés dans le plasma puis distribués vers les tissus grâce aux LDL (Vejux et al., 2008).

Les oxystérols peuvent être formés par auto-oxydation dans tous les tissus par des ROS ou des radicaux libres. La formation de ces molécules par voies enzymatiques est différente selon le type d'oxystérol formé et les organes (Schroepfer 2000).

## 2. Formation

La forte concentration du cholestérol dans les tissus et sa position dans les membranes cellulaires, permet son oxydation spontanée dans les cellules, ce qui provoque l'auto-oxydation du cholestérol. Certains oxystérols sont produits uniquement par auto-oxydation du cholestérol, alors que d'autres sont produits par voies enzymatique. La plus grande majorité retrouvée dans les fluides biologiques sont produits par ces deux mécanismes de manière complémentaire (Iuliano 2011).

#### a) Formation par auto-oxydation

Le terme auto-oxydation fait référence à l'oxydation non-enzymatique du cholestérol. La double liaison en C5-C6, permet l'auto-oxydation du cholestérol, principalement en position 7 ou sur la double liaison elle-même. L'oxydation non-enzymatique du cholestérol peut avoir lieu dans les membranes des cellules ou dans les lipoprotéines qui transportent le cholestérol (Iuliano 2011). Différents espèces peuvent être formées, en fonction du type de ROS en contact avec le cholestérol. Ainsi, il peut être oxydé par des réactions mettant en jeu des espèces radicalaires, dont les plus étudiées, sont initiées par des espèces radicalaires superoxide, péroxide ou hydroxyl; ou par des espèces non-radicalaires comme l'oxygène singulet ou l'ozone. Au contact de l'oxygène de l'air, des radicaux peroxydes se forment. Cette voie donne naissance aux oxystérols oxydés sur le cycle B, 7a et 7BOHC, 7-KC (7ketocholestérol), 5,6α-EC et 5,6β -EC et au CT (Murphy & Johnson 2008). La génération de radicaux HO° peut mener, par différents mécanismes (réaction de Fenton, action du péroxynitrite ou radiation ionisante), à la création d'un radical sur le C7 par départ du proton aliphatique sur cette position. Le radical centré sur le carbone 7 est suffisamment stable pour rencontrer une molécule de dioxygène à l'état triplet (3O2) pour former un radical hydropéroxyde. Le radical hydropéroxyde, hautement réactif, est capable de propager la réaction en captant un hydrogène d'une molécule voisine et donner naissance aux  $7\alpha$  et 7BOHC de cholestérol. Ces hydropéroxydes seront réduits par du fer II en radicaux

alkyloxyde<u>s</u> qui vont, soit donner les 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxycholestérol en arrachant un H°, soit donner le 7-KC par réaction avec un radical hydropéroxyde lipidique (Figure 19.A.) (Iuliano 2011; Murphy & Johnson 2008). La conversion des 7 $\alpha$  et 7 $\beta$ -OHC en 7-KC est possible grâce à une réaction de déshydrogénation, mettant en jeu ou non, une enzyme, la 11HSD1 (11 $\beta$ hydroxystéroide déshydrogénase de type 1) (Björkhem et al. 1968).

L'hydroperoxydation de la chaîne latérale est également possible. Les hydropéroxydes formés sont également sujets à dégradation en hydroxydes et donnent principalement les hydroxystérols 20(S)-; 25-; 25(S),26- et 27-hydroxycholestérol ainsi que la cholest-5-èn-3 $\beta$ -ol-24-one (Smith 1987).

Les oxystérols peuvent également être formés par des mécanismes non radicalaires impliquant l'oxygène singulet, l'ozone ou bien encore l'acide hypochloreux. L'oxygène singulet, après « ène » addition, provoque la formation de 6-hydropéroxydes et de 7-hydropéroxydes précédemment décrits (Figure 19.B.). L'ozone peut donner entre autres, après formation d'un 1,2,3-trioxolane et réarrangement , du 5,6β-EC ou du 5,6-secostérol (Figure 19.C.) (Pulfer & Murphy 2004). Enfin, le HOCl quand à lui, est capable de donner des produits chlorés comme l'  $\alpha$  et  $\beta$ -chlorhydrines, obtenues par ouverture des époxydes pour donner des dérivés 5-chloro-6-hydroxylés ou 6-chloro-5-hydroxylés ; ou bien le 5,6-dichloro-cholestérol (Iuliano 2011; Murphy & Johnson 2008).

D'autres produits de l'oxydation radicalaire ou non radicalaire du cholestérol peuvent mener à la formation de 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC. En effet, un radical hydropéroxyde peut se fixer sur la double liaison en C5-C6, et former les deux époxydes après libération d'un radical alkoxyle (Figure 19.D.) (Iuliano 2011; Murphy & Johnson 2008). On observera que ces molécules peuvent mener à la formation de cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol puis au 6-oxocholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol par l'intermédiaire de réactions enzymatiques (Murphy & Johnson 2008).



**Figure 19:** Mécanisme de formation des principaux oxystérols en contact avec l'oxygène de l'air. A. Formation des dérivés oxydés sur le C7. **B.** Mécanisme induit par les singulets d'oxygène. **C.** Mécanisme d'oxydation par l'ozone. **D.** Mécanisme d'oxydation menant à la formation des  $\alpha$  et  $\beta$ -EC. LOO. : radical hydroperoxyde de lipide ; LOH : lipide hydroxylé ; LOOH : hydroperoxyde de lipide ; LO. : radical alkoxyde de lipide. *D'après Murphy and Johnson, 2008* 

Des études ont permis de mettre en évidence le fait que toutes les formes d'oxygène actif ne sont pas capables de former tous les oxystérols. En effet, certains oxystérols ne sont formés que par une espèce oxygénée, comme le radical HO° qui forme préférentiellement du  $\alpha$ -EC, alors que l'ozone par exemple, forme principalement du 5,6 $\beta$ -EC (Murphy & Johnson 2008). Cette étude a également permis de démontrer qu'il existait une stéréosélectivité pour la formation des hydropéroxydes et des hydroxydes en position 7 et des 5,6-époxycholestanols (Smith & Jaworski 1988).

## b) Formation par voie enzymatique

Certains des oxystérols les plus abondants sont produits par voie enzymatique. Leur biosynthèse a été décrite pour la première fois en 1956 par Frederickson et Ono. Ils ont montré qu'en incubant une fraction subcellulaire enrichie en mitochondrie avec du cholestérol radiomarqué, du 25- et du 27-hydroxycholestérol étaient formés (Frederickson & Ono 1956). Depuis, il a été caractérisé que de nombreux oxystérols sont formés de la même façon, par des cytochromes P450 principalement (Schroepfer 2000). Ces enzymes sont présentes dans le foie, le cholestérol dégradé en oxystérols est ainsi éliminé ; ou dans des tissus périphériques comme le cerveau, les glandes surrénales, l'intestin, le colon ou les tissus stéroïdogéniques (ovaires, testicules, prostate) (Pikuleva 2006b).

L'oxydation enzymatique sur la chaine latérale, peut générer les 20-, 22-, 24-, 25- et 27hydroxycholestérols (Figure 20) (Russell 2000; Otaegui-Arrazola et al. 2010). Ainsi le cvtochrome CYP27A1 catalyse l'oxydation du cholestérol 27-OHC en (27hydroxycholestérol). Une des particularités de cette enzyme est, qu'elle est exprimée dans beaucoup de tissus mais particulièrement dans le foie et les macrophages, est qu'elle peut également oxyder le même méthyl pour former un acide carboxylique (Brown & Jessup 2009). De manière intéressante, la formation du 24-OHC (24-hydroxycholestérol) est particulièrement importante dans le cerveau, du fait de l'hydroxylation du cholestérol par le cytochrome CYP46A1. Le CYP11A1 quand à lui, produit le 20(S)-hydroxycholestérol et le 22(R)-hydroxycholestérol (Schroepfer 2000). La 25-hydroxylase, guand à elle, n'appartient pas à la famille des cytochromes P450 mais aux protéines non -hème contenant du fer (Lund et al. 1998; Russell 2003).

Les cytochromes P450 peuvent également produire des espèces oxydées de manière stéréolective, sur le noyau stéroïde. Le CYP3A4 est le cytochrome le plus abondant du foie et joue un rôle important dans la métabolisation de molécules. Il a été montré comme responsable de la conversion du cholestérol en 4 $\beta$ -hydroxycholestérol (Bodin et al. 2001). Le cytochrome CYP7A1 produit le 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, qui est un précurseur de la

biosynthèse des acides biliaires (Figure 20) (Pikuleva 2006a; Schroepfer 2000). La formation d'un époxyde sur la chaine latérale est possible. En effet, le 24,25-EC est un oxystérol particulier, puisqu'il est produit à partir du squalène au cours de la voie alternative à la cholestérogenèse (Nelson et al. 1981; Schroepfer 2000).



Figure 20: Formation enzymatique et métabolisme des principaux oxystérols.

## c) Effets biologiques des oxystérols

Due à l'homologie de structure des oxystérols, ils peuvent, tout comme le cholestérol s'insérer dans les membranes et moduler la fluidité des membranes (Olkkonen & Hynynen 2009). Ils modifient donc l'activité de protéines transmembranaires, changent la perméabilité de la membrane et peuvent interagir avec les rafts lipidiques (Massey 2006; Olkkonen & Hynynen 2009). Ils sont généralement impliqués dans l'initiation et la progression de maladies chroniques incluant l'athérosclérose, les processus dégénératifs, le diabète, les disfonctionnements rénaux ainsi que dans les cancers. Certains oxystérols, comme le 25-OHC et le 24,25-EC contrôlent l'homéostasie du cholestérol (Figure 21) grâce à la suppression de l'activation de SREBP, la dégradation de la HMGCR, leurs liaisons sur les protéines de liaison des oxystérols, l'activation des LXR, et la formation d'ester de cholestérol, ce qui induit son stockage (Schroepfer 2000). Les oxystérols oxydés sur la cible B, par leur fixation sur le site de liaison des anti-œstrogènes (AEBS) sont également impliqués dans la progression des cancers et la résistance des cancers au Tam (Silvente-Poirot & Poirot 2012a).



**Figure 21: Représentation des mécanismes d'action des oxystérols sur l'homéostasie du cholestérol.** Les oxystérols peuvent par différentes voies contrôler la synthèse, le transport et l'efflux de cholestérol par: 1- l'augmentation de la dégradation de la HMGR, 2- la suppression de l'activation de SREBP qui contrôle la transcription de gènes codants par exemple la HMGCR ou le LDLR, 3- l'augmentation de l'efflux de cholestérol par l'activation de gène sous dépendance des LXR, 4- augmenter le stockage du cholestérol sous forme d'esters*D'après de Brown & Jessup, 2009* 

# (1) <u>Inhibition de l'activation de SREBP : contrôle de la</u> <u>transcription</u>

Du fait de l'activité du cholestérol, il est nécessaire de contrôler son taux, notamment grâce à la diminution ou à l'augmentation de sa synthèse, la stimulation de son élimination, l'augmentation de son stockage par la formation d'esters de cholestérols.

Les oxystérols sont capables de contrôler l'homéostasie du cholestérol par les mêmes mécanismes que le rétrocontrôle du cholestérol (Schroepfer 2000). De nombreux gènes codants des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol sont sous dépendance des facteurs de transcription SREBP, comme vu dans la partie II.A.4.a. Ainsi les oxystérols, en se liant au domaine de détection des stérols de Insig, permettent de retenir le complexe SREBP-Scap dans le réticulum endoplasmique, prévenant ainsi l'activation protéolytique de SREBP ce qui inhibe la transcription de gènes comme la HMGCR (Gill et al. 2008) ou le LDLR (Gill et al. 2008; Leonarduzzi et al. 2002).

## (2) <u>Dégradation de la HMGCR</u>

Les stérols en se liant au domaine de détection des stérols de Insig, peuvent également induire la liaison de celle-ci à la HMGCR. Insig, par son association à d'autres protéines, permet alors l'ubiquitination de la HMGCR puis son extraction de la membrane et son transport vers le protéasome, ce qui entrainera sa dégradation. La dégradation post-transcriptionnelle de la HMGCR semble être un aspect important de la régulation de la synthèse du cholestérol (DeBose-Boyd 2008).

## (3) <u>Formation d'ester de cholestérol</u>

Le cholestérol est stocké, grâce à sa transformation par la ACAT en ester de cholestérol. Les oxystérols comme le 25-OHC stimulent cette estérification. Ce mécanisme pourrait s'expliquer par le fait que les oxystérols pénètrent dans la membrane plasmique prenant la place du cholestérol, qui pourra après transport vers le réticulum endoplasmique, stimuler l'estérification et inhiber l'activation de SREBP ; ou bien grâce à sa liaison à Insig, permettre d'inhiber directement l'activation de SREBP (Brown & Jessup 2009). De plus, certains oxystérols, dont les 5,6 $\alpha$ -EC, et 7 $\alpha$ -OHC qui sont des substrats de haute affinité, sont capables d'activer de manière allostérique la ACAT (Zhang et al. 2003).

# (4) Liaisons sur les protéines de liaison des oxystérols

Les protéines de la famille OSBP (Oxysterol Binding Protein) et ORP (Oxysterol-binding protein related-proteins) sont des protéines cytosoliques qui sont décrites pour moduler la synthèse du cholestérol et pour lier les oxystérols avec une haute affinité. Douze protéines font partie de la famille des OSBP/ORP, mais à l'exception de ORP-1L et ORP-2, qui lient le 22(R)-Hydroxy- et le 7-ketocholestérol, les OSBP sont connues pour lier seulement le 25hydroxycholestérol (Hynynen et al. 2009). La liaison d'oxystérols modifie la localisation subcellulaire des ORPs, du cytoplasme vers le golgi ou le réticulum endoplasmique. Ces protéines s'associent alors à la membrane du golgi ou du RE où elles jouent un rôle direct sur le contrôle de la synthèse et le transport lipidique dans les cellules. Ces protéines sont également décrites comme transporteurs directs de stérols, oxystérols mais aussi acides phosphatidiques et phosphoinositides, et comme des senseurs des stérols (Im et al. 2006; Olkkonen & Hynynen 2009). Les protéines de la famille des OSBP/ORP contrôlent les voies mitogènes : la voie des MAP kinases et la voie AKT, en régulant de manière négative l'activité de la série/thréonine phosphatase PP2A connue pour dé-phosphoryler Akt. L'activation de l'ORP2 induit une augmentation du transport du cholestérol de la membrane du réticulum endoplasmique, accompagnée d'une surexpression de la HMGCR et du récepteur aux LDL, et à une baisse de l'activité et de l'expression de l'ACAT. Il semble donc, que les OSBP/ORP soient des senseurs globaux des stérols permettant la synchronisation de processus cellulaires dépendants du taux de stérols (Yan & Olkkonen 2008).

## (5) <u>Activation de récepteurs nucléaires, cas des LXR</u>

Les oxystérols sont capables d'interagir avec plusieurs récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Ainsi, les oxystérols peuvent se lier et activer, entre autres, l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique, par exemple : les

ROR (Retinoic acid receptor-related orphan receptor), NR1F1, 2 et 3, impliqués dans le développement, le métabolisme du cholestérol et l'immunité (Wang et al. 2010) ; les FXR (farnesoid X receptor), NR1H4, régulent l'élimination des acides biliaires (Deng et al. 2006) ; les PXR (pregnane X receptor), NR1I2, impliqués dans les phénomènes de détoxification par le contrôle de gènes des CYP450 (Langmade et al. 2006) ; les ER, NR3A1 et 2, qui lient les œstrogènes et qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques et notamment dans les cancers (Umetani et al. 2007) ; et les LXR, NR1H2 et 3, qui régulent l'homéostasie du cholestérol et des lipides ainsi que l'inflammation (Janowski, Willy, Devi, Falck, & Mangelsdorf, 1996; Segala et al., 2013; Segala et al., en révision).

L'activation des deux isoformes des LXR, LXR  $\alpha$  et  $\beta$ , en tant que facteurs de transcription ligand dépendants, régulent différents gènes contrôlant la production d'acides biliaires ainsi que leur métabolisation et sécrétion; la biosynthèse du cholestérol, son transport inverse et son excrétion dans l'intestin (Figure 22). Ainsi, les LXR jouent le rôle de senseurs de cholestérol (Zhao & Dahlman-Wright 2010).

Les LXR ont des distributions tissulaires différentes, puisque le LXRa est exprimé dans les tissus à haute activité métabolique, dont le foie ; alors que le LXRβ est ubiquitaire. Les LXR peuvent être activés par les oxystérols (Janowski et al. 1996) ou par des agonistes synthétiques comme le GW3965 ou le T0901317. Ils forment un hétérodimère avec le RXR (Retinoid X Receptor) et peuvent donc être également activés par les ligands du RXR comme l'acide rétinoïque (Willy et al. 1995). Le dimère LXR-RXR est lié à l'élément de réponse des LXR (LXRE) au niveau des éléments de réponse de type DR-4, c'est-à-dire une DR (élément de répétition directe) présentant un espacement de 4 bases entre toutes les séquences AGGTCA. En l'absence de ligands, le complexe LXR-RXR est associé à des corépresseurs. Après liaison de ligands, les corépresseurs sont libérés et des coactivateurs sont recrutés permettant la transcription de gènes (Zelcer & Tontonoz 2006).

Les LXR favorisent la dégradation du cholestérol en acides biliaires, en activant la transcription du cytochrome CYP7A1, permettant l'hydroxylation du cholestérol en  $7\alpha$ -OHC qui est la première étape de la biosynthèse des acides biliaires (Figure 22) (Peet et al. 1998). Les LXR sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse et du trafic intracellulaire du cholestérol en contrôlant l'expression de SREBP et donc des enzymes cholestérogéniques sous dépendance de celui-ci comme la HMGCR ou le LDLR (Zelcer & Tontonoz 2006; Wang et al. 2002); de la Fatty acid synthase, de l'acetyl-CoA carboxylase et de la steroyl-CoA desaturase 1 qui sont impliquées dans la lipogenèse (Figure 22) (Calkin & Tontonoz

2012); mais aussi de la squalène synthase et la lanostérol 14 $\alpha$ -demethylase, deux enzymes de la biosynthèse du cholestérol (Wang et al. 2008). De plus, les agonistes des LXR stimulent l'expression d'Idol (Inducible Degrader Of LDLR), une E3 ubiquitin ligase qui induit la dégradation lysosomal du LDLR, ce qui contribue à diminuer l'entrée de cholestérol dans la cellule (Figure 22) (Nelson et al. 2014). Ceci est en accord avec l'augmentation parallèle de l'efflux de cholestérol induite par les agonistes des LXR qui provoquent de façon générale, une diminution du taux de cholestérol intracellulaire (Calkin & Tontonoz 2012).

Les LXR agissent également sur le transport inverse du cholestérol, ce qui permet son retour des tissus périphériques vers le foie, pour son excrétion. Les protéines de transport membranaire de la famille des ABC : ABCA1, ABCG1, ABCG5 et ABCG8 sont les acteurs clés du transport retour du cholestérol (Repa & Mangelsdorf 2000). Les agonistes des LXR induisent l'expression de ABCA1, ABCG1 et ARL7 (ADP-ribosylation factor-like 7), qui stimule l'efflux de cholestérol via les HDL ; alors que ABCG5 et ABCG8, permettent l'élimination du cholestérol du foie vers l'intestin (Figure 22) (Zhao & Dahlman-Wright 2010; Calkin & Tontonoz 2012). Les transporteurs de cholestérol NPC1 (Niemann-Pick type C 1) et NPC2, nécessaires à l'absorption intestinale, sont diminués par l'activation des LXR (Zhao & Dahlman-Wright 2010).

En parallèle, les LXR activent l'expression d'apolipoprotéines comme ApoA1 et ApoE qui agissent comme des accepteurs extracellulaires de cholestérol en captant le cholestérol expulsé de la cellule par les ABC transporteurs (Figure 22). La fixation du cholestérol par ces apolipoprotéines permet la formation des HDL (Hong & Tontonoz 2014; Calkin & Tontonoz 2012).



**Figure 22: Effets des LXR sur l'homéostasie du cholestérol.** Les LXR modulent différentes voies métaboliques. Dans les tissus périphériques, LXR induit l'expression de IDOL, qui provoque la dégradation des LDLR par le protéasome, ce qui diminue l'absorption de LDL dans les tissus. Les LXR peuvent aussi augmenter l'expression de ABCA1, ABCG1, et ARL7 permettant l'efflux et le transfert de cholestérol vers l'apolipoprotéine AI (APOAI) ou le pré-HDL. APOE permet le retour des HDL vers le foie. Dans le foie, les LXR augmentent la production d'acides biliaires grâce à leur action sur le CYP7A1. Ils contrôlent également la synthèse d'acides gras par l'activation de SREBP, et de ses cibles, la fatty acid synthase (FAS), l'acetyl COA carboxylase (ACC) et l' asteroyl COA desaturase 1 (SCD1). Adapté de Calkin &Tontonoz, 2014.

Il a été montré que le 27-OHC, un ligand des LXR (Fu et al. 2001), était impliqué dans la progression des cancers du sein, grâce à l'activation des LXR et des ER $\alpha$  (Nelson et al. 2014; Nelson et al. 2013). De plus, les 5,6-EC sont également des ligands des LXR (Berrodin et al. 2010). Notre équipe a mis en évidence une régulation indirecte de LXR $\beta$  par les ligands d'AEBS dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Ils ont montré que le Tam, en inhibant l'activité de la ChEH, induisait l'accumulation de 5,6-EC capables de réguler l'activité transcriptionnelle de LXR $\beta$  et de stimuler l'expression de gènes lipogéniques (la steroyl CoA Désaturase et l'Acétyl CoA Carboxylase). Ils ont établi que le LXR $\beta$  est impliqué dans l'induction de la différenciation et la mort des cellules cancéreuses mammaires exprimant ou non le ER, par le tamoxifène (Segala et al. 2013; Silvente-Poirot & Poirot 2012a).

# C. Le métabolisme des 5,6-époxycholestanols

Depuis plus de 15 ans, notre équipe s'intéresse au métabolisme du cholestérol, des oxystérols et des lipides. L'équipe a caractérisée un nouveau métabolisme du cholestérol centré sur les 5,6-EC (5,6-époxycholestanols).

# 1. La Cholestérol Epoxyde Hydrolase : ChEH

## a) Caractérisation et pharmacologie

Les époxydes hydrolases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des époxydes de lipides. La Cholestérol Epoxyde Hydrolase, ou ChEH est la seule enzyme ayant une spécificité de substrat, puisqu'elle est très sélective des 5,6-EC (5,6-époxycholestanols) et catalyse leur hydratation stéréosélective en cholestane- $3\beta$ , $5\alpha$ , $6\beta$ -triol (CT) (Sevanian & McLeod 1986; Watabe & Sawahata 1979; Poirot & Silvente-Poirot 2013). De plus, le 5, $6\beta$ -EC a été reporté comme étant le substrat d'hydratation préférentiel, plutôt que le 5, $6\alpha$ -EC pour la ChEH (Sevanian & McLeod 1986; Nashed et al. 1985).

Le site de liaison des anti-œstrogènes (AEBS) est un site multi-protéique, qui après le ER, est le site de haute affinité pour le Tam (Watts et al. 1984) et qui lie également d'autres SERM, comme le raloxifène ou le clomiliphène ; des dérivés diphénylméthanes du Tam (DPPE, PBPE) (Figure 23) (de Medina et al. 2009; Payré et al. 2008; Kedjouar, De Medina, et al. 2004), ou des inhibiteurs de la cholestérogénèse, tels que le triparanol ou AY-9944 (Figure 23) (Poirot et al. 2000; Kedjouar, De Medina, et al. 2004; de Medina, Paillasse, et al. 2010a). Les oxystérols oxydés sur le cycle B peuvent aussi être des ligands de l'AEBS. En effet, le 7-KC, ou 7-ketocholestanol (5α-cholestan-3β-ol-7-one) et le 6-ketocholestanol (5α-cholestan-3B-ol-6-one) peuvent se lier à AEBS (Sevanian & McLeod 1986). Il a été montré au laboratoire, que la coexpression des D8D7I ( $3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerase) et DHCR7  $(3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 7-reductase) était nécessaire et suffisante pour reconstituer le site de haute affinité du Tam, c'est-à-dire AEBS (Kedjouar, De Medina, et al. 2004). Il est intéressant de noter que ces deux enzymes sont impliquées dans la biosynthèse du cholestérol. AEBS est ubiquitaire et fortement exprimée dans les cellules prolifératives, ainsi que dans les tissus cholestérogéniques comme le foie et le cerveau (Gray & Ziemian 1992; Kedjouar, De Medina, et al. 2004). L'équipe a démontré que les ligands d'AEBS sont capables d'induire la différenciation et l'apoptose dans des cellules cancéreuses mammaires (De Medina, Silvente-Poirot, et al. 2009; de Medina et al. 2009).



**Figure 23: Structure des ligands d'AEBS représentatifs de différentes classes.** Le Tamoxifène, le raloxifène et le clomifène font partie des SERMs, le PBPE et le DPPE sont des ligands sélectifs de synthèse et le triparanol et le AY9944 sont des inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol (DHCR24; et DHCR7 et D8D7I respectivement). On retrouve le motif du Tam avec le noyau triterpénoide sur les autres molécules (en rouge), et les trois cycles dont les liaisons sont modifiées pour l'AY9944 (en violet).

Il est apparu, que le site AEBS et la ChEH partagent de nombreuses caractéristiques pharmacologiques : elles sont tous deux microsomales ; les 7-KC, 7-ketocholestanol et 6-ketocholestanol peuvent être des ligands de ces deux entités et les constantes d'affinité de ces molécules sont du même ordre de grandeur pour l'AEBS et la ChEH (Sevanian & McLeod 1986; Hwang & Matin 1989). L'étude du métabolisme des 5,6-EC a permis à l'équipe de découvrir que l'activité ChEH est portée par l'AEBS (Figure 24) (de Medina, Paillasse, et al. 2010a). Les traitements au Tam ou avec les ligands d'AEBS sont associés à une accumulation de 5,6-EC. Ainsi, les effets anticancéreux du tamoxifène et des autres ligands du site AEBS sont concomitants à une accumulation des 5,6-EC, qui pourraient être impliqués dans ces effets caractérisés par de la redifférenciation cellulaire, un contrôle de la prolifération et de la cytotoxicité à plus forte dose (Payré et al. 2008; de Medina et al. 2009; de Medina, Paillasse, et al. 2010a; Sola et al. 2013; De Medina, Silvente-Poirot, et al. 2009).



**Figure 24: Le site AEBS porte l'activité ChEH**. En absence de ligands, les 5,6-EC sont hydrolysés en CT. Lorsqu'un ligand, comme le Tam vient se fixer, il provoque l'inhibition de la ChEH et l'accumulation des 5,6-EC.

## b) Activité ChEH et cancer

La ChEH est une cible de haute affinité pour le Tam, inhibée aux doses thérapeutiques (de Medina, Paillasse, et al. 2010b; Silvente-Poirot & Poirot 2012a). Les inhibiteurs de la ChEH/AEBS contrôlent la différenciation, la pousse tumorale ainsi que l'apoptose de cellules cancéreuses mammaires qui expriment ou non le ER $\alpha$  (Payré et al. 2008; de Medina et al. 2009; De Medina, Silvente-Poirot, et al. 2009), par des mécanismes dépendants et nondépendants des LXR (Segala et al. 2013). De plus, le clomiliphène, un SERM est capable d'induire l'apoptose indépendamment de ER $\alpha$  ou  $\beta$  dans des lignées leucémiques et dans des échantillons de patients (Hayon et al. 1999).

Pitroda *et al.*, ont montré que la forme oncogène de Mucin 1, une glycoprotéine surexprimée dans de nombreux cancers, induit une signature transcriptionnelle, comprenant 38 gènes et transporteurs impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol, prédictive de la résistance au Tam (Pitroda et al. 2009). Une des sous-unités de la ChEH, la DHCR7, est comprise dans cette liste de gènes, ce qui implique qu'une surexpression de la ChEH dans les cancers peut mener à la résistance des cancers aux traitements.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la ChEH et l'accumulation de 5,6-EC, contribuent aux effets anti-cancéreux et chémopréventifs du Tam et des autres inhibiteurs de la ChEH/AEBS (Poirot et al. 2012; Silvente-Poirot & Poirot 2012a).

# 2. Les 5,6-époxycholestanols (5,6-EC)

Nous venons de voir l'importance des oxystérols dans l'homéostasie du cholestérol et dans différentes pathologies incluant les cancers. A cause de leur structure, 5,6-EC ont d'abord été considérés comme des carcinogènes impliqués dans la survenue de cancers de la peau induits par les UV (Black & Douglas 1973; Black et al. 1979), mais aussi ont été montrés comme non-tumorigéniques chez le rat (El-Bayoumy et al. 1996). Les 5,6-EC, sont des produits majeurs de l'oxydation du cholestérol (Schroepfer 2000) dont la signification est mal connue.

## a) Structure des 5,6-EC

Les époxydes sont des espèces chimiques comportant un cycle à trois comprenant un atome d'oxygène. Les 5,6-EC existent sous deux formes diastéréoisomériques : les 5,6\alpha-EC et 5,6\beta-EC, qui dépendent de l'orientation du groupe oxirane par rapport au plan défini par le noyau stéroïdien. La représentation généralement utilisée pour représenter les deux formes, implique un changement conformationnel du 5.6α-EC comparé au 5.6β-EC (Figure 23.A.). Cependant les derniers travaux du laboratoire, montrent que ces deux molécules sont dans une conformation chaise (Figure 23.B.) (Paillasse et al. 2012). Les cycles A, C et D sont identiques, alors que le cycle B est tordu et associé à une jonction de cycles A et B différente pour les deux isomères. La différence conformationnelle peut être observée grâce à la superposition des deux diastéréoisomères (Figure 23.C). La longueur de la liaison de l'oxygène sur le carbone en 3, ainsi que la position du méthyl en C19 n'est pas la même. Les volumes de Van der Waals, au niveau du méthyl en 19 et de l'époxyde sont différents entre les deux formes 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC, qui partagent 87% de leur volume de Van der Waals (Figure 23.C). Le calcul de l'énergie, a montré que le 5,6β-EC est plus faible en énergie, et donc plus stable que le 5,6*a*-EC. Ces résultats sont la première évidence de la différence conformationnelle entre le  $5.6\alpha$ -EC et  $5.6\beta$ -EC. De plus, cette différence est moins importante en solution, qu'à l'état solide, indiquant que la liaison des cycles A et B est moins importante en solution qu'à l'état solide (Paillasse et al. 2012).



**Figure 25: Structure des 5,6-EC. A.** Représentation généralement utilisée pour représenter les deux diastéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  des 5,6-EC : 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC. **B.** Structure tridimensionnelle des 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC établie par analyse par rayons X et représentation 2D associée. **C.** Superposition des 5,6 $\alpha$ -EC (en orange) et 5,6 $\beta$ -EC (en bleu), grâce à laquelle on peut observer la différence conformationnelle des deux formes, ainsi que les volumes de Van der Waals. *D'après Paillasse et al., 2012.* 

#### b) Réactivité des 5,6-EC

Généralement, les époxydes se comportent comme des électrophiles qui réagissent avec des nucléophiles, pour donner, de manière régiosélective et stéréosélective, des alcools  $\beta$ -substitués, selon un mécanisme de type SN2 (Parker & Isaacs 1959). Les espèces portant ce type de fonction, comme les styrenes oxides, sont des agents alkylants qui forment des adduits sur les acides nucléiques ou les protéines, ce qui contribue à leurs effets mutagéniques et carcinogéniques (Marnett et al. 2003).

Les diastéréoisomères des 5,6-CE sont rapidement métabolisés chez les mammifères par des voies différentes. Ils peuvent être estérifiés avec un acyl ester d'acides gras, par ACAT1 et ACAT2, pour donner des acyl gras-esters de cholestérol, ou sulfatés par SULT2B1b (Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1) en 3-sulfate de 5,6-EC (Fuda et al. 2007). Les 3-sulfate de 5,6-CE ont été montrés comme antagonistes des LXR (Song et al. 2001), et les 5,6-EC ont été trouvés être des modulateurs directs de LXR (Berrodin et al. 2010; Segala et al. 2013). Il est intéressant de noter que le 5,6 $\alpha$ -EC a été montré comme étant meilleur 79

substrat que le 5,6 $\beta$ -EC pour les ACAT et pour SULT2B1b et le seul diastéréoisomère substrat de la glutathione transferase B (Watabe et al. 1979), ce qui indique une différence de réactivité des deux formes de 5,6-EC (Paillasse et al., 2012 ; Poirot & Silvente-Poirot, 2013).

Dans des conditions fortes, dans l'acide concentré, les 5,6-EC forment un seul produit d'hydratation : du CT. En présence d'acides halogénés, le 5,6 $\alpha$ -EC peut donner des formes bromées, chlorées, fluorées comme les 6 $\beta$ -fluoro-, 6 $\beta$ -chloro- et 6 $\beta$ -bromo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ diol ou le 5 $\alpha$ -chloro-cholestan-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol. Après réaction avec des catalyseurs de palladium, le 5,6 $\alpha$ -EC peut être transformé en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol, cholestane-3 $\beta$ -ol and cholestane-3 $\beta$ ,5,6-triol. Alors que dans les mêmes conditions, le 5,6 $\beta$ -EC donnera des mélanges (Poirot & Silvente-Poirot 2013). Notre équipe, a récemment publié une étude comparant la réactivité des deux diastéréoisomères des 5,6-EC vis-à-vis des nucléophiles. Ils ont pu montrer que ces époxydes sont particulièrement stables dans des conditions de substitution nucléophile de type 2 puisqu'aucune réaction n'est observée sans catalyse à température physiologique contrairement aux styrènes oxydes. Ceci prouve que les 5,6-EC ne peuvent former des substances alkylées de manière spontanée, ce qui exclut que ces molécules sont des mutagènes et carcinogénes (Paillasse et al. 2012).

Cependant, en présence d'acide de Lewis, comme LiClO<sub>4</sub>, le 5,6 $\alpha$ -EC peut mener à une réaction d'addition, mais pas le 5,6 $\beta$ -EC. L'analyse du produit formé après réaction du 5,6 $\alpha$ -EC avec le 2-aminoéthanol ou 2-mercapto-éthanol, a montré que cette réaction donnait seulement un produit substitué en 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , indiquant une réaction par ouverture de cycle en trans-diaxial. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par la conformation différente des 5,6-EC, qui génère une gêne stérique importante pour le 5,6 $\beta$ -EC, ainsi que par une énergie plus faible pour l'isomère  $\beta$ , comme vu précédemment (Paillasse et al. 2012).

Ces critères de sélectivité entre les deux isomères permettent de postuler qu'ils réagissent de manières différentes. De plus, ces résultats sont appuyés par le fait que le 5,6 $\alpha$ -EC ait été montré comme étant transformé de manière sélective par la glutathion transferase B pour donner le 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxycholestan-6 $\beta$ -yl-S-glutathion (Figure 24) (Watabe et al. 1979).

## c) Précurseurs des dendrogénines

Les données présentées dans les précédentes parties de ce manuscrit ont permis de montrer l'importance du métabolisme du cholestérol en relation avec le cancer, et particulièrement le rôle des 5,6-époxycholestanols. Leur métabolisme semble être complexe et différent pour les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC (Carvalho et al. 2009).

Un premier aminostéroïde, aux propriétés antibiotiques, a été identifié chez le requin : la squalamine (Figure 24) (Moore et al. 1993). Cette molécule a ensuite été montrée comme possédant des effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux, grâce au blocage des voies de prolifération et de migration (Sills et al. 1998), et permet la potentialisation de drogues cytotoxiques comme le cisplatine (Williams et al. 2001). La synthèse de cette molécule a été entreprise (Kinney et al. 2000), mais les faibles rendements obtenus, ne permettent pas d'envisager son utilisation en clinique. De ce fait, de nouveaux analogues ont été synthétisés et certains d'entre eux possèdent des activités cytotoxiques vis-à-vis de différents types de cancers, comme les leucémies, les myélomes ou les glioblastomes (El Kihel et al. 2008; Thibeault et al. 2008). Néanmoins, malgré la diversité des structures moléculaires et des activités biologiques intéressantes, les mécanismes d'action de ces molécules sont mal connus et restent à approfondir.

Cependant, le fait que l'équipe ait montré que le site AEBS soit impliqué dans les effets anticancéreux induits par ces ligands par des mécanismes de redifférenciation des cellules cancéreuses (Payré et al. 2008; de Medina et al. 2009; Silvente-Poirot & Poirot 2012a) ; et que les amines, tels que la putrescine, la spermidine, la spermine ou l'histamine, soient supposées se lier à un récepteur intracellulaire, porté par le complexe AEBS (LaBella & Brandes 2000; Brandes et al. 1985) ; a conduit à l'étude de la formation de produits résultant de l'aminolyse des 5,6-EC. En effet, la proximité des 5,6-EC et des amines, au niveau du site AEBS, a permis de postuler que des adduits entre ces produits pouvaient se former au niveau de l'AEBS et être impliqués dans les effets des ligands d'AEBS et notamment la redifférenciation (De Medina, Paillasse, et al. 2009).

Ainsi, l'équipe a décrit la synthèse de différents composés issus de l'aminolyse des 5,6-EC par des amines biogéniques (De Medina, Paillasse, et al. 2009). Ces molécules, formées uniquement à partir du 5,6 $\alpha$ -EC, font partie d'une nouvelle famille : les alkylamino-oxystérols. Deux molécules, parmi les 16 nouvelles molécules produites, ont montré un effet plus important que les autres. La dendrogénine A ou DDA (5 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 $\beta$ -ol) (Figure 24), molécule correspondante à l'adduit histamine sur le cholestérol, induit la différenciation et le contrôle de la prolifération sur des lignées représentantes de différents types de cancers, mais ces effets sont très importants sur des cellules de mélanome ou de cancer mammaire. La dendrogénine B ou DDB (5 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -

[3-(4-aminobutylamino)propylamino]cholest-7-en-3 $\beta$ -ol) (Figure 24), correspond à l'adduit spermidine fixé par sa partie aminopropyl sur le cholestérol, permet la différentiation neuronale et la survie des cellules (De Medina, Paillasse, et al. 2009). De plus, ces molécules ont récemment été montrées comme induisant la prolifération de cellules souches neurales (Khalifa et al. 2014). Ainsi, les propriétés de ces molécules, en font de nouvelles molécules très prometteuses, permettant d'envisager une utilisation de ces molécules pour le traitement de cancers (Article 1) ou de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou bien la surdité (De Medina, Paillasse, et al. 2009).



Figure 26: Structure de l'adduit EC-GSH (glutathion conjugué au 5,6-EC) et des aminostérols naturels : la qualamine, la Dendrogénine A ou la Dendrogénine B.

### d) 5,6-EC métabolites et cancer

L'idée que des produits oxydés du cholestérol puissent être impliqués dans les cancers, vient du fait que l'exposition aux UV induit des cancers de la peau et que le cholestérol soit sensible à la photo-oxydation menant à la formation d'oxyde de cholestérol (Roffo 1933). Une autre équipe a proposé que les UV étaient responsables de la formation de 5,6-EC (Figure 27.A.) dans la peau des souris ; que ces molécules étaient impliquées dans les cancers induits par les UV, et que l'activité ChEH était augmentée par les UV(Black & Douglas 1973; Chan & Black 1974; Black 1980). Ces données et les observations faites au laboratoire, nous laissent penser que le CT (Figure 27.A.), le produit de la ChEH, ou des métabolites du CT

peuvent être impliqués dans la carcinogénèse induite par les UV (Poirot & Silvente-Poirot 2013).

D'un autre coté, il a été montré que les 5,6-EC, principalement le 5,6 $\beta$ -EC, sont accumulés dans différents types de tumeurs (Küçük et al. 1994; Gruenke et al. 1987; Sporer et al. 1982) et que la ChEH est suractivée dans les cancers (Morin et al. 1991; Silva et al. 1988). Des métabolites du CT sont décrits comme mutagènes (Cheng et al. 2005) alors que les 5,6-EC ne le sont pas (Smith et al. 1979). Cheng *et al.*, ont démontré que la présence de ROS était nécessaire pour induire la génotoxicité du CT, ce qui suggère qu'une ou des espèces oxydées du CT sont impliquées dans ces effets (Cheng et al. 2005). De plus, le 5,6 $\beta$ -EC est plus toxique (ligand préférentiel de la ChEH) que le 5,6 $\alpha$ -EC, et moins toxique que le CT (Raaphorst et al. 1987). Ceci permet d'exclure que les 5,6-EC puissent être directement des carcinogènes, mais appuie le fait que des métabolites oxydés puisse être liés à la carcinogénèse.

Ainsi, il a été montré que les cholestéryl esters (de Medina, Genovese, et al. 2010; Paillasse et al. 2009) ou les esters de 5,6-EC (Figure 27.B) sont des promoteurs de tumeurs (Poirot & Silvente-Poirot 2013; Peck & Schulze 2014; Yue et al. 2014) et que le CT pouvait être métabolisé en OCDO (6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol) (Aringer & Eneroth 1974) ou en  $3\beta$ , $5\alpha$ , $6\beta$ -trihydroxy-cholanic acid (Figure 27.C) (Kikuchi et al. 1968). Il semble donc important d'étudier les effets que pourraient avoir ces molécules sur l'induction de cancers. Des données préliminaires de l'équipe, ont montré que le CT pouvait être transformé en 6-oxo-cholestane- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol (OCDO) dans différentes cellules cancéreuses et qu'il était capable d'augmenter la prolifération et la croissance tumorale (Silvente-Poirot et al. 2012; Silvente-Poirot & Poirot 2012a). C'est pourquoi durant ma thèse, je me suis intéressée à l'étude de l'oxydation du CT en OCDO, et j'ai étudié ses effets biologiques dans le cancer du sein (Article 2 et 3).



**Figure 27:** Métabolisme des 5,6-EC et cancer. A. Les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC sont hydrolysés par la ChEH en CT. B. Les cholestéryl esters et le 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -trihydroxy-cholanic acid sont associés au développement de cancers. C. Métabolites issus du CT qui pourraient être impliqués dans les cancers.

Il apparaît donc qu'un métabolisme issu de l'oxydation du cholestérol, centré sur les 5,6-EC soit impliqué dans les cancers. Ce métabolisme mène à la formation d'une molécule capable d'induire la différenciation et le contrôle de la prolifération cellulaire, la DDA, et à la formation du CT, issu de la production par la ChEH, molécule dont un métabolite oxydé l'OCDO, est impliquée dans la cancérogénèse. Il semble donc nécessaire de mieux comprendre ce métabolisme et surtout, son implication et sa possible dérégulation dans les cancers (Figure 28).



**Figure 28: Métabolisme centré sur la ChEH.** Les 5,6-EC mènent à la formation de la DDA, molécule qui contrôle la différenciation et la prolifération cellulaire; ou à la production de CT grâce à leur hydrolyse par la ChEH. Des études préliminaires de l'équipe, ont montré que le CT était oxydé en OCDO dans des lignées cancéreuses. Au cours de mon doctorat, nous nous intéresserons à ce métabolisme dans les cancers du sein et plus particulièrement à la production de l'OCDO et de la DDA dans des lignées cancéreuses mammaires ou dans des échantillons de patientes, ainsi qu'à la caractérisation de leurs propriétés dans les cancers.

# Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2 (11HSD1 et 11HSD2)

Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2

Le cholestérol est le précurseur d'hormones stéroïdes, tels que les androgènes, les œstrogènes, les progestatifs, les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Le premier glucocorticoïde fut découvert dans les années 1930 par Kendall et Reichstein après son isolation à partir du cortex des glandes surrénales et sa caractérisation structurale. A la fin des années 40, Hench fut le premier à le tester pour le traitement des arthrites rhumatoïdes, cette molécule prendra le nom de « cortisone » (Hench & Kendall 1949; Hench & Slocumb 1949). S'ensuivirent de nombreuses études montrant les effets « miraculeux » de cette molécule, principalement sur les maladies inflammatoires, les problèmes rénaux et certains cancers, comme les lymphomes. En 1950, Kendall, Reichstein et Hench recevaient le prix Nobel de physiologie ou médecine pour leur découverte. Un an plus tard, le cortisol (hydrocortisone) a été montré comme étant le métabolite actif de la cortisone (Hollander et al. 1951). Différentes équipes se sont intéressées à étudier le métabolisme de ces molécules et ont étudié la conversion du cortisol dans les microsomes de différents tissus. La cortisone est transformé en cortisol par une enzyme dans les microsomes de foie, qui fût caractérisé plus tard comme la 11β-hydroxystéroïde deshydrogénase de type 1 (Chapman et al. 2013).

# A. Métabolisme des glucocorticoïdes

## **1.** Cortisone et cortisol

#### a) Synthèse et rôle

Les glucocorticoïdes naturels présents chez l'homme, sont le cortisol, la cortisone et la corticostérone (forme minoritaire, mais l'unique forma présente chez le rat et la souris) (Figure 29), et son donc synthétisés principalement dans les glandes surrénales à partir du cholestérol. Il a également été montré que les glucocorticoïdes pouvaient être synthétisés localement, par les cellules épithéliales intestinales (Cima et al. 2004), la peau, le cerveau, le cœur et les organes lymphoïdes primaires (la moelle osseuse et le thymus), pour une action locale plus spécifique (Taves et al. 2011).



**Figure 29: Structure des glucocorticoïdes naturels présents chez l'homme.** Le cortisol est la forme active et la cortisone la forme inactive. La corticostérone est une espèce très minoritairement produite chez l'homme mais est la forme majoritaire chez la souris.

Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2

Le cholestérol est transformé en prégnenolone par le cytochrome CYP11A1 ou P450 CYP-scc (Cholesterol side chain cleavage enzyme). La pregnenolone est convertie en 17ahydroxyprogesterone par deux réactions parallèles mettant en jeu la 3HSD (3Bdéshydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4-isomérase) et le CYP17A1. 17αhydroxysteroïde La hydroxyprogestérone est hydroxylée par le CYP21A2 pour former le 11-désoxycortisol, qui sera ensuite converti en cortisol par le CYP11B1. La conversion du cortisol en cortisone par la (11HSD211<sup>β</sup>-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2) peut être réalisée dans différents tissus, notamment dans le foie (Figure 30) (Payne & Hales 2004). Le taux des glucocorticoïdes varie naturellement de manière dépendante du cycle circadien chez l'homme, avec un pic le matin et un faible taux durant la nuit (Weitzman et al. 1971). Cependant, l'organisme peut augmenter la formation de ces molécules, en cas de « stress », c'est-à-dire de lésion cellulaire, d'invasion pathogène, d'émotions comme la peur, l'anxiété ou des émotions qui peuvent être anticipées et qui sont généralement liées à l'environnement ou à un facteur social. Les glucocorticoïdes sont des régulateurs très importants, de nombreux processus biologiques fondamentaux comme l'homéostasie métabolique (Asensio et al. 2004; Giustina & Wehrenberg 1992; Dallman et al. 1993; Reddy et al. 2012), l'inflammation (Hardy et al. 2014; Rhen & Cidlowski 2005; Baschant & Tuckermann 2010; Tait et al. 2008), la réponse immune (Webster et al. 2002; Homo-Delarche et al. 1991; Tait et al. 2008; Franchimont 2004), la prolifération cellulaire (Baschant & Tuckermann 2010; Ligr et al. 2012), le développement (Gesina et al. 2004; Vyas & Maatouk 2013; Chapman et al. 2013; Eijken et al. 2006; Sun et al. 1998), et la reproduction (Tilbrook et al. 2000; Whirledge & Cidlowski 2010).



Figure 30: Synthèse des glucocorticoïdes à partir du cholestérol. Adapté de Payne & Hales, 2004.

La production de ces molécules est régulée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA, Hypothalamic-Pituitary-Adrenal). L'hormone corticolibérine (CRH, Corticotropin-Releasing Hormone) est synthétisée par l'hypothalamus en cas de stress, puis libérée. Dans l'hypophyse, cette hormone stimule la synthèse de l'hormone corticotrope hypophysaire (ACTH, adrénocorticotrophine), qui une fois libérée dans la circulation sanguine se lie aux récepteurs de l'ACTH (melanocortin type II receptor) des glandes surrénales (Vyas & Maatouk 2013; Sanderson 2006). Ces hormones stimulent ainsi la synthèse de glucocorticoïdes grâce notamment à la régulation transcriptionnelle des enzymes régulant leur biosynthèse (Rainey 1999; Stocco 2001). Un problème de contrôle de leur production peut

Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2 engendrer un syndrome de fatigue chronique (MacHale et al. 1998), des insomnies (Backhaus et al. 2004) et des syndromes d'épuisement professionnel « burn-out » (Pruessner et al. 1999).

Il existe de nombreux glucocorticoïdes de synthèse (une dizaine) utilisés à des fins thérapeutiques en tant qu'anti-inflammatoires stéroïdiens, comme par exemple la prednisone, la prednisolone ou la dexaméthasone (Figure 31), dont certains sont plus efficaces que le cortisol. Ces molécules diffèrent du cortisol du point de vue de leurs propriétés pharmacocinétiques (absorption, temps de demi-vie, distribution et élimination) et pharmacodynamiques (différentes activités sur les récepteurs). Du fait de leur nature lipophile, il est admit qu'il peuvent diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires et exercer leurs effets biologiques (Vandevyver et al. 2014). Ils peuvent également franchir facilement la barrière intestinale ou la peau, c'est pourquoi ils sont administrés per os ou par voie topique. Tout comme le cortisol, ils se lient à des protéines comme la corticosteroidbinding globulin ou l'albumine, qui permet leur transport sérique (Breuner & Orchinik 2002). Ces molécules sont utilisées dans le cas d'allergie (Wilder et al. 1993), d'asthme (Barnes 1995), de problèmes inflammatoires (Barnes 2014; Barnes 2006; Tait et al. 2008; Montón et al. 1999) mais aussi pour leurs effets immunosuppresseurs (Barnes 2014; Wilder et al. 1993), avec notamment leur utilisation après une transplantation (Chast 2013). Ils sont également utilisés pour diminuer les effets secondaires des traitements des cancers (Ettinger & Portenoy 1988; Bruera et al. 1985; Coleman 1992; Dietrich et al. 2011) ou comme thérapie de certains cancers, comme les cancers hématopoïétiques, du cerveau, de la prostate et du sein (Keith 2008; Cleary 2014; Walsh & Avashia 1992; Vilasco et al. 2011).



Figure 31: Structures de quelques glucocorticoïdes de synthèses comparées au cortisol.

## b) Leurs effets via les récepteurs nucléaires

## (1) Les récepteurs aux glucocorticoïdes

Les effets des glucocorticoïdes, comme leurs propriétés anti-inflammatoires, passent par la modulation de l'expression de certains gènes sous dépendance des GR (Glucocorticoid Receptor) notamment.

Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2

Tout comme le ER, le GR est une protéine de la famille des récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription ligand-dépendant. Le gène codant pour le GR humain (NR3C1) est situé sur le chromosome 5 (5q31Y32) (Figure 32). Ce gène est formé de 9 exons, dont les exons 2 à 9 codent pour la protéine et l'exon 1 forme la région 5' non traduite. L'épissage alternatif de l'exon 9, permet la formation des isoformes GR $\alpha$  et du GR $\beta$  qui diffèrent au niveau de la partie C-terminal. D'autres isoformes des récepteurs GR $\alpha$  et GR $\beta$ , sont formés à partir de différents sites d'initiation de la transcription sur l'exon 2 (Figure 32) (Vandevyver et al. 2014). Chacune de ces formes lie avec la même affinité les glucocorticoïdes et l'élément de réponse des glucorticoïdes (GRE, Glucocorticoid Receptor responsive Element), mais n'ont pas la même capacité à induire l'activité biologique après liaison des glucocorticoïdes (I. Wu et al. 2013).

Les GR peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Ainsi les GR peuvent être phosphorylés sur certaines sérines par des kinases comme la cyclin-dependant kinase, MAPK ou la caseine kinase II (Galliher-Beckley et al. 2011) ; acétylés sur certaines lysines par des histones acétylase ; ubiquitinylés par des ubiquitine E ou sumoylés sur des lysines par l'addition de SUMO-1 (small ubiquitin-related modifiez-1) (Kadmiel & Cidlowski 2013). Ces modifications covalentes des GR affectent sa stabilité, et son interaction avec d'autres protéines, donc son activité transcriptionnelle (Vandevyver et al. 2014).





**Figure 32: Représentation et organisation de l'ADN, ARN et des protéines du GR. A.** La diversité d'expression et de fonction des GR provient de la présence d'épissage alternatif de l'ARNm sur l'exon 9: 9 $\alpha$  ou 9 $\beta$ . Cet épissage alternatif génère les isoformes GR $\alpha$  et GR $\beta$ . **B.** L'exon 1, forme la région 5' non traduite. D'autres changements dans la structure et la fonction des protéines proviennent de sites alternatifs de l'initiation de la transcription, positionné sur l'exon 1, qui permettent la formation de 8 isoformes différentes des GR $\alpha$  et GR $\beta$ . **C.** Le GR contient un domaine N-terminal qui contient une fonction d'activation de la transcription (AF-1) ; un domaine de liaison à l'ADN (DBD) ; un domaine « hinge » qui sépare le DBD du LBD ; et un domaine C-terminal comprenant le site de liaison du ligand (LBD) qui lui-même est possède une autre fonction d'activation de la transcription (AF-2). **D.** Des modifications post-traductionnelles sur le GR sont possibles, par des phosphorylations (P), ubiquitinations (U) , acétylations (A) et sumoylations (S). Adapté de *Kadmiel & Cidlowski, 2013* 

Le cortisol principalement, puisque la cortisone est moins active biologiquement (Hollander et al. 1951), induira ces effets après sa diffusion à travers la membrane cellulaire (l'intervention de transporteurs n'a pas encore été démontrée mais n'est pas à exclure) et sa liaison au GR présent dans le cytoplasme. Le GR, dans le cytoplasme, est lié à des protéines chaperones, comme hsp90 (heat shock protein-90), qui protègent le récepteur et préviennent son intégration dans le noyau (B. Wu et al. 2004). La liaison du cortisol induit la dissociation de ces protéines, ce qui permet le transport du GR activé vers le noyau où il se liera, sous forme d'homodimère, à la séquence d'ADN spécifique dans la région du promoteur (GRE). La liaison du GR sur le GRE conduit à l'augmentation de la transcription de gènes impliqués dans des processus anti-inflammatoires, grâce à son interaction avec des co-activateurs Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2

(Figure 33) (Baschant & Tuckermann 2010; Blind et al. 2012). Le cortisol peut donc par des effets génomiques induire la transcription de gènes codants des protéines anti-inflammatoires comme l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ ); l'annexin-1, qui en inhibant la PLA2, bloque la production de prostaglandines; l' IL-10 (Interleukine-10); la mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MAKP-1, qui conduit à la déphosphorylation et à l'inactivation des facteurs de transcription c-Jun, ou de P38 MAPK; ou la protéine GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper), qui inhibera les facteurs de transcription pro-inflammatoires que sont NF- $\kappa$ B ou AP-1 (Barnes 2006; Baschant & Tuckermann 2010; Kadmiel & Cidlowski 2013).

Le cortisol peut également réprimer l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Ainsi, le GR activé, pourra se fixer sur un élément de réponse particulier appelé « negative GRE » (nGRE), qui permettra le recrutement de co-répresseurs, inhibant la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation et le métabolisme. Les gènes de l'insuline, ou du récepteur à l'insuline, par exemple, sont associés aux effets secondaires liés aux traitements par les glucocorticoïdes, et ont été montrés comme contenant un nGRE (non représenté Figure 33) (Hudson et al. 2013).

Le GR après liaison du cortisol peut aussi interagir avec d'autres facteurs de transcription, sans liaison directe à l'ADN. Ainsi le cortisol peut inhiber les effets de facteurs de transcription pro-inflammatoires, comme NF- $\kappa$ B, AP-1, ou CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) et bloquer leur activité transcriptionnelle, qui régule l'expression de gènes codant pour de nombreuses protéines inflammatoires comme des cytokines, des protéines inflammatoires, des enzymes inflammatoires, ou des chemokines (Figure 33) (De Bosscher et al. 2003a), mais aussi réprimer la transcription de la COX2 (Cyclooxygénase 2), une enzyme essentielle pour la production de prostaglandines.

Il apparait donc que le cortisol peut réguler l'inflammation de manière très rapide par des mécanismes non génomiques (Figure 33). Ainsi, ils stimuleraient entres autres, l'activation des voies de signalisation MAPK (Ayroldi et al. 2012).



**Figure 33:** Mécanismes d'action des glucocorticoïdes. Ils peuvent réguler l'expression de gènes de différentes manières. Les corticostéroïdes entrent dans la cellule et se lient au GR présent dans le cytoplasme, qui sera ensuite transporté vers le noyau. Les homodimères de GR se lient au GRE dans la région promotrice de gènes sensibles aux stéroïdes, qui peuvent coder pour des protéines aux propriétés anti-inflammatoire. Les GR nucléaires peuvent aussi interagir les facteurs de transcription pro-inflammatoires, tels que NF-κB, et ainsi empêcher la transcription de gènes anti-inflammatoires. Les GR peuvent agir de manière non génomique et induire l'activation de protéines anti-inflammatoires. *D'après Rhen & Cidlowski, 2006.* 

Il a été montré que la forme GR $\alpha$ , lie le cortisol, se transloque vers le noyau et recrute des corégulateurs pour contrôler la transcription, alors que le GR $\beta$  est principalement présent dans le noyau et agirait comme un « inhibiteur » du GR $\alpha$ . Le GR $\beta$  peut réguler directement des gènes qui ne sont pas régulés par le GR $\alpha$  (Kadmiel & Cidlowski 2013). De plus, il semblerait que le GR $\beta$  ne pourrait pas lier les agonistes ou antagonistes du GR $\alpha$ , à part le RU-486 (Mifépristone) un antagoniste du GR $\alpha$ , qui lui pourrait se lier au GR $\beta$  et réguler son activité transcriptionnelle (Lewis-Tuffin et al. 2007; Ligr et al. 2012). Ceci soutient le fait que le GR $\beta$ régule négativement le GR $\alpha$  et qu'il possède sa propre activité indépendante (Kadmiel & Cidlowski 2013).

## (2) Les récepteurs aux minéralocorticoïdes

Le cortisol peut lier, en plus du GR, le MR (Mineralocorticoid Receptor), NR3C2. Le rôle essentiel du MR est le contrôle de l'homéostasie du sodium et de la pression sanguine. Le MR, comme les ER et le GR, est un récepteur nucléaire. Il pourra donc, après la liaison de son ligand dans le cytoplasme, se lier à MRE (Mineralocorticoid Receptor responsive Element) et activer la transcription de gènes grâce au recrutement de co-régulateurs (Glass & Rosenfeld 2000; Fuller 2015). Des gènes comme la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ou le ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel) pourront être activés, ce qui permet le contrôle du transport du sodium dans les reins (Dooley et al. 2012). Contrairement au GR, le MR ne semble pas induire de trans-répression de gènes par interaction protéine-protéine sur d'autres facteurs de transcription, puisqu'il ne se lie pas directement à l'AP-1 ou NF- $\kappa$ B (Pearce & Yamamoto 1993; Terada et al. 2012). Cependant, il a été montré qu'à l'inverse du GR, le MR induit l'activation de NF-kB par voie génomique (Leroy et al. 2009; Chantong et al. 2012) et peut être pro-inflammatoire dans les reins et le système cardiovasculaire notamment (Young & Rickard 2012). Comme pour le GR, un troisième mécanisme des MR, non génomique, au niveau de la membrane cellulaire, permet la modification de la réponse de voies impliquant des seconds messagers. Par example, des interactions avec l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ont ainsi été caractérisées (Grossmann & Gekle 2012), ce qui active les voies des PKC (protéine kinase C), ERK1/2 et MAPK (Dooley et al. 2012).

De plus, le MR et le GR partagent 90% d'homologie du DBD (DNA binding domain) et 50% du LBD (ligand binding domain). Il a également été montré que le MR et le GR sont issus d'un ancêtre commun et qu'ils se sont séparés durant l'évolution (Kassahn et al. 2011).

Le MR est un récepteur stéroïdien unique, puisqu'il possède deux ligands (agonistes) physiologiques : l'aldostérone, qui elle, lie très faiblement le GR et le cortisol (ou corticostérone chez la souris) (Figure 34). Ceci suggère que le GR et le MR ne peuvent discriminer les glucocorticoïdes, à l'exception de l'aldostérone (Frey et al. 2004). Le MR a une haute affinité, comparable pour les deux molécules (Kd ~ 2nM) bien que le GR ait une plus faible affinité pour le cortisol (Kd~20nM), mais ce récepteur est sélectif des glucocorticoïdes (Odermatt & Kratschmar 2012; Arriza et al. 1987). Cependant, le cortisol est présent en quantité beaucoup plus importante dans l'organisme que l'aldostérone (100 fois plus) (Fuller 2015; Frey et al. 2004). Il a été montré par deux équipes différentes en 1988, que la spécificité de l'aldostérone pour le MR pouvait s'expliquer par la présence d'un « control pré-récepteur », effectué par les 11HSD1 et 11HSD2 qui permettent le contrôle de la concentration en cortisol (Figure 34) (Funder et al. 1988; Funder 1990; Edwards et al. 1988).
La 11HSD2 et le MR sont co-exprimés dans certains tissus, notamment dans le rein, ce qui permet à la 11HSD2, de transformer le cortisol, actif, en cortisone inactive et donc de protéger le MR de fortes concentrations en cortisol, ce qui le rend spécifique de l'aldostérone et de réguler l'activité biologique des glucocorticoïdes (Hunter & Bailey 2015; Odermatt & Klusoňová 2014; Odermatt & Kratschmar 2012).



**Figure 34:** Le cortisol comme ligand du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et aux minéralocorticoïdes (MR) dont la concentration est régulée par les 11β-hydroxystéroides déhydrogénase type 1 et 2 (11HSD1 et 11HSD2). Le GR et le MR sont des facteurs de transcription ligand dépendants. Après liaison avec leurs ligands, ils sont transloqués dans le noyau, où ils se fixeront sur leur éléments de réponse (GRE ou MRE) et induiront la transcription de gènes. Ainsi l'aldostérone est un ligand du MR. Cependant la concentration intracellulaire de cortisol est régulés par les 11HSD1 et 11HSD2. La 11HSD1 transforme la cortisone, qui n'a aucune affinité pour le MR ou le GR, en cortisol, qui est un ligand de ces deux récepteurs. La 11HSD2 transforme le cortisol en cortisone , ce qui permet la protection de l'activation du MR par le cortisol. *Adapté de Frey et al., 2004.* 

# B. Les 11β-Hydroxystéroides déshydrogénases de type 1 et de type 2 (11HSD1 & 11HSD2)

#### 1. Deux enzymes distinctes

A la fin des années 1980, l'activité 11β-Hydroxystéroide déshydrogénase (11HSD) a été caractérisée dans le laboratoire du Dr. Monder. L'enzyme fut purifiée à partir de foie de rat, et l'ADN codant pour la protéine a été isolée (Lakshmi & Monder 1985b; Lakshmi & Monder 1985a; Agarwal et al. 1989; Lakshmi & Monder 1988). L'activité enzymatique issue de l'homogénat de foie de rat, était bidirectionnelle, c'est-à-dire qu'il comportait l'activité 11βdéshydrogénase (permettant la formation de la cortisone) et l'activité 11β-réductase (régénérant le cortisol à partir de la cortisone), associé au co-facteur NADP(H) permettant l'activité enzymatique (Figure 35) (Lakshmi & Monder 1988).

Cependant, différentes évidences comme, la non co-localisation du MR et de l'enzyme, ou le manque de corrélation entre l'expression en ARN et l'activité de l'enzyme dans le rein (mais non dans le foie) ; laissaient à penser, qu'au lieu d'une seule enzyme, il pouvait en exister deux (Chapman et al. 2013). En 1993, une nouvelle enzyme à l'activité 11β-Hydroxystéroide déshydrogénase a été caractérisée et isolée dans le placenta humain et le rein de rat (Rusvai & Naray-Fejes-Toth 1993; Brown et al. 1996; Low et al. 1993). Cette enzyme était différente de la première, d'un point de vue physicochimique et par sa taille. En effet, cette enzyme était de poids moléculaire de 41 kDa, alors que la première identifiée était de 34 kDa. De plus, elle possèdait uniquement une activité 11β-dehydrogénase, associée au co-facteur NAD<sup>+</sup> plutôt que NADP(H) et une affinité beaucoup plus forte pour la corticostérone que la première enzyme (environ 100 fois) (Rusvai & Naray-Fejes-Toth 1993). Elle fut appelée 11HSD type 2 (11HSD2), pour la distinguer de la première, 11HSD type 1 (11HSD1) (Figure 35).

Plus récemment, l'existence d'une nouvelle 11HSD a été suggérée. L'activité 11HSD3 a d'abord été observée dans des reins de mouton. Cette enzyme permettrait grâce au NADP<sup>+</sup> la déshydrogénation du cortisol (Gomez-Sanchez et al. 1997; Ohno et al. 2013; Huang et al. 2009). Avec 48 % d'homologie comparé à la 11HSD1 de poulet ou de poisson, l'enzyme humaine, serait un ancêtre de la 11HSD1 (Baker 2004). En plus, des reins, cette enzyme semble être fortement exprimée dans le cerveau, mais son rôle physiologique reste encore inconnu (Huang et al. 2009).



**Figure 35: Transformation du cortisol et de la cortisone par les 11β-hydroxystéroide déshydrogénases (11HSD1 et 11HSD2).** L'interconversion du cortisol et de la cortisone est réalisée par le 11HSD1 et 11HSD2. La 11HSD2 catalyse, grâce au NAD+ l'inactivation du cortisol, par sa transformation en cortisone, principalement dans les reins. Dans le foie majoritairement, la 11HSD1 possède principalement l'activité réductase, catalysée par le NADPH qui sera ensuite régénéré par l'Hexose-6-Phosphate (H6PDH), mais peut dans certains cas réaliser la déshydrogénation en utilisant le NADP.

#### 2. Gènes et protéines des 11HSD1 & 11HSD2

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement aux 11HSD1 et 11HSD2, enzymes clés de la régulation du métabolisme des glucocorticoïdes.

#### a) Gènes codant pour les 11HSD1 & 11HSD2

#### (1) Structure des gènes codant pour les 11HSD1 &11HSD2

Les 11HSD1 et 11HSD2 sont présentes chez les vertébrés et les requins. A l'inverse de la 11HSD1, la 11HSD2 est présente chez le poisson, où elle pourra jouer son rôle de « prérécepteur » du MR (Jiang et al. 2003; Baker 2004).

Le gène *HSD11B1*est situé sur le chromosome 1, 1q32-q41(Tannin et al. 1991) et comprend 7 exons (Figure 40.A.). Le gène peut être transcrit à partir de trois promoteurs différents P1, P2, P3, mais la transcription est initiée principalement à partir du P2 dans la plupart des tissus dont le foie, le cerveau et les tissus adipeux (Staab et al. 2011). Il a été montré que différents sites de liaison des facteurs de transcription C/EBP sont situés au niveau du promoteur P2 (Figure 36.A). Ces sites sont conservés entre les formes humaine ou murine du gène (Williams et al. 2000). Le C/EBP $\alpha$  régule le métabolisme des lipides et des protéines, et est régulé par les glucocorticoïdes de manière tissu dépendante (Ramos et al. 1996; McKnight et al. 1989). Dans le foie, le taux de C/EBP $\alpha$  est élevé, permettant un fort taux de transcription

de la 11HSD1, ce qui augmente le taux de cortisol (Seckl & Walker 2001). C/EBP $\beta$  permet la régulation de la 11HSD1 par certains régulateurs comme, des cytokines pro-inflammatoires, qui induisent l'activation de la transcription de *HSD11B1* dans les adipocytes, mais semble aussi réprimer l'expression de la 11HSD1 dans le foie, par la formation d'hétérodimère avec le C/EBP $\alpha$  (Williams et al. 2000). C/EBP $\beta$  est un régulateur important de l'inflammation et du métabolisme (Arizmendi et al. 1999), ce qui implique que *HSD11B1* pourrait jouer un rôle important dans ces phénomènes. C/EBP $\beta$  est lui-même régulé par les glucocorticoïdes durant l'inflammation et la différenciation des adipocytes (Baumann et al. 1992; Tomlinson et al. 2006; Sai et al. 2008). Ceci indique qu'un rétro-contrôle des glucocorticoïdes au niveau de leur activation par la 11HSD1 est possible. Des effets du facteur de transcription HNF1 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox A) serait également impliqué dans le contrôle de la transcription du gène *HSD11B1* (Odom et al. 2004) ; tout comme des effets indirects du fait d'une dérégulation de l'homéostasie des acides biliaires (Ackermann et al. 1999).

Le gène *HSD11B2* est situé sur le chromosome 16, 16q22 (Krozowski, Baker, et al. 1995) et comprends 5 exons (Figure 36.B.). Un seul promoteur est présent sur l'exon 1 (Agarwal et al. 1995). Ce gène comprend différents sites de liaisons aux facteurs de transition SP1 (Specificity Protein 1), SP3 (Specificity Protein 3), NF1 (Nuclear Factor 1), NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) et Egr-1 (Early growth response protein 1). La liaison de ces facteurs de transcription, est corrélée au niveau d'expression de la 11HSD2, de manière cellule-dépendante (Kostadinova et al. 2005; Alikhani-Koupaei et al. 2007; Nawrocki et al. 2002). Dans les cellules de cancer du colon, la répression de *HSD11B2* par le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), est associée à la liaison de Egr-1 et NF- $\kappa$ B sur le promoteur de *HSD11B2* (Kostadinova et al. 2005).



**Figure 36: Structures de gènes codant pour les 11HSD1 et 11HSD2. A.** Représentation schématique du gène *HSD11B1*. Les flèches représentent les positions des promoteurs. Des sites de liaison des C/EBP sont représentés en vert. **B.** Représentation schématique du gène *HSD11B2*. La flèche représente la position du promoteur. Différents sites de liaison de facteurs de transcription sont représentés en violet pour NF-κB, en vert pour Sp1/Sp3 et en rose pour NF1. Les astérisques indiquent les positions de deux polymorphismes qui réduisent la liaison des facteurs de transcription et l'activité des promoteurs. Pour chacun des deux gènes, la partie rouge sur les exons représente la séquence 5'-non traduite (en fonction du promoteur pour *HSD11b1*) et la partie bleue la séquence 3'-non traduite. *D'après Chapman et al., 2013* 

### (2) <u>Polymorphismes et mutations des gènes codant pour les</u>

#### <u>11HSD1 et 11HSD2</u>

Il semble évident que des facteurs génétiques inter-individuels peuvent moduler la production de cortisol. Pour chacune des protéines, de nombreux SNP (Single-Nucleotide polymorphisme) ont été caractérisés (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/). Certains, comme le SNP présent sur la région 5' non codante (rs846910, G-A) ou le SNP situé sur l'exon 3 du gène HSD11B1 (rs12086634, T-G) sont associés à certaines pathologies comme la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 ou l'hypertension, sans être associé à l'obésité (Nair et al. 2004; Franks et al. 2004). L'allèle G du rs12086634, induit une diminution de la transcription de la 11HSD1 in vitro, associée à un hyperandrogénisme chez les patientes souffrant du syndrome des ovaires polykystiques sans obésité (Gambineri et al. 2006). Les pomymorphismes rs846910 A et rs12086634 T ont été associées à l'augmentation de la transcription de la 11HSD1 dans les tissus adipeux et permettent l'augmentation de la régénération du cortisol dans le corps associé au syndrome métabolique (Gambineri et al. 2011). Des mutations sur l'exon 3 sont associées à une diminution de l'activité de la protéine, associée aux symptômes liés à une déficience de la réduction de la cortisone (Draper et al. 2003). De plus, des polymorphismes génétiques sur HSD11B1 (rs11807619 et rs932335) ont été montrées comme augmentant le risque de développer un cancer du sein chez les femmes ménopausées (Feigelson et al. 2008).

La réduction de l'activité de la 11HSD2 peut être due à différents mécanismes comme des mutations (Ferrari 2010; Carvajal et al. 2003), des changements épigénétiques (Friso et al. 2008), ou la présence d'inhibiteurs de la 11HSD2 (Ma et al. 2011). La majorité des mutations 100

présentes sur HSD11B2 sont situées sur les exons 3,4 ou 5 (Campino et al. 2012), à l'exception de quelques mutations retrouvées sur l'exon 1 (Quinkler et al. 2004; Alikhani-Koupaei et al. 2007) et d'une autre sur l'exon 2 (Odermatt et al., 2001). Il a été montré que la répétition des bases CA sur *HSD11B2* est hautement polymorphique et associée avec une diminution de l'activité 11HSD2, au syndrome d'excès apparent des minéralocorticoïdes et à l'hypertension (Mune et al. 2013; Carvajal et al. 2003). Un polymorphisme sur l'exon 3 (G534A), a été montré comme impliqué dans l'hypertension chez une population Suédoise (Williams et al., 2005), alors que des études Française, Italienne et Chilienne n'ont établi aucune corrélation (Mariniello et al. 2005; Brand et al. 1998; Campino et al. 2012). Ceci semble indiquer que l'existence de polymorphismes au sein de certaines populations peut induire de l'hypertension.

#### b) Protéines 11HSD1 & 11HSD2

#### (1) <u>Structures des protéines 11HSD</u>

Chez l'humain et la souris, la 11HSD1 est une protéine de 292 acides aminés, de poids moléculaire de 34 kDa. La 11HSD2 humaine comprend 405 acides aminés, avec un poids moléculaire de 44kDa, alors que la protéine de souris est plus courte et donc de poids moléculaire inférieur, 42kDa. Ces deux protéines ne partagent que 18% de leurs séquences, mais possèdent un motif nucléotidique structurellement conservé dans une même famille de protéine, permettant la liaison avec leur cofacteur (NAD<sup>+</sup> pour la 11HSD2 et NADPH pour la 11HSD1): le pli Rossmann dans la région N-terminal (de la Thr88 à la Gly 95) ainsi qu'un motif Tyr-[Xaa]<sub>3</sub>-Lys dans le site actif (Tyr183 et Lys187 pour la 11HSD1 humaine et Tyr232 et Lys236 pour la 11HSD2 humaine) (Chapman et al. 2013). Ces deux enzymes pourraient aussi agir en homodimère (Maser et al. 2002; Obeyesekere et al. 1997). Il existe un domaine N-terminal fortement hydrophobe qui permet à l'enzyme de s'ancrer dans la membrane du réticulum endoplasmique. Une enzyme mutante dépourvue de ce domaine est inactive et instable (Obeid et al. 1993).

Deux patients atteints d'un déficit de la cortisone réductase ont été identifiés comme étant hétérozygotes pour des mutations dans la séquence codante de *HSD11B1*. Une mutation (Arg137Cys) réduit l'activité de l'enzyme, et une autre (Lys187Asn) bloque le site actif et supprime donc l'activité 11HSD1 (Lawson et al. 2011).

La protéine 11HSD1 peut être glycosylée sur trois résidus asparagine (Asn123, Asn162, et Asn207) mais n'est pas une condition nécessaire à sa stabilité et à son activité (Blum et al. 2000).

Différents cristaux de la 11HSD1 ont été déposés sur le site Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/gene/). Ces cristaux obtenus par diffraction des rayons X montrent l'interaction de la protéine, liée au cofacteur NADP(H), avec différentes classes d'inhibiteurs. La Figure 37 est un exemple et représente un cristal de la 11HSD1 lié à un inhibiteur, ici le 4-cyclopentyl-N-[(1S,3R)-5-oxidanyl-2-adamantyl]- 2-[[(3S)-oxolan-3-yl]amino]pyrimidine-5-carboxamide, et à une molécule de NADP (Goldberg et al. 2012). Le NADPH se liera en premier, puis le substrat, ce qui induira sa réduction puis son départ du site catalytique suivi de celui du cofacteur (Hosfield et al. 2005).



**Figure 37: Structures de la 11HSD1 humaine lié avec un NADP et un inhibiteur.** Structure cristallographique d'un dimère de 11HSD1 avec une molécule de NADP cosubstrat et d'inhibiteur (le 4-cyclopentyl-N-[(1S,3R)-5-oxidanyl-2-adamantyl]- 2-[[(3S)-oxolan-3-y]]amino]pyrimidine-5-carboxamide) dans chacune des protéines. *Image provenant de http://www.rcsb.org/pdb/gene/(PBD1D:4BB6); Goldberg et al., 2012* 

Cependant, aucun cristal de la 11HSD2 n'a pu être obtenu, mais des structures produites par modélisation moléculaire *in silico* de la protéine ont pu réalisées, permettant ainsi de mieux comprendre son fonctionnement (Manning et al. 2010; Yamaguchi et al. 2012) ainsi que son implication dans le syndrome de AME (Apparent Mineralocorticid Excess) (Figure 42.) (Arnold et al. 2003).

La plupart des mutations de la 11HSD2, induisant un syndrome de AME, se trouvent dans la moitié C-terminale de la protéine 11HSD2 (Morineau et al. 2006). Les mutations qui affectent la catalyse ou la liaison du cofacteur, produisent les phénotypes les plus sévères. Ceux-ci comprennent par exemple, la mutation du site actif Tyr232, la suppression des Leu114 et

Glu115, prévues pour contraindre le site de liaison du cofacteur et la mutation sur la Tyr226 affectant la liaison du substrat (Arnold et al. 2003; Lavery et al. 2003). De plus, il existe une corrélation entre la perte d'activité de la 11HSD2 et le phénotype du gène codant pour l'enzyme chez les patients souffrant du syndrome AME (White et al. 2000; Morineau et al. 2006).



**Figure 38: Structures** *in silico* **de la 11HSD2 humaine basé sur la 17HSD1.** Structure *in silico* d'un dimère de 11HSD2 avec une molécule de cortisol et de NAD dans chacun des monomères (l'un en gris clair, l'autre en gris foncé). Les parties en rouge représentent des anomalies de modélisation. D'après Manning et al., 2010.

#### (2) Localisation tissulaire des protéines 11HSD

Chez l'homme, la 11HSD1 est exprimée dans de nombreux tissus comprenant les tissus adipeux, le système vasculaire, les reins, le cerveau, l'utérus, les ovaires, les testicules, le poumon, le cœur, le côlon et le foie, ce dernier est l'organe exprimant le plus fortement cette enzyme (Figure 40.) (Benediktsson et al. 1992; Walker et al. 1991; Burton et al. 1998; Bujalska, Kumar, et al. 1997; Moisan et al. 1990). Dans le foie, cette enzyme est exprimée plus particulièrement dans les tubules proximaux et les cellules interstitielles (Castello et al. 1989). La 11HSD1 n'est exprimée dans le fœtus qu'à la fin de la gestation, lorsque le taux de cortisol est élevé dans les organes où l'activité des glucocorticoïdes est nécessaire pour la maturation tardive, juste avant la naissance, notamment dans le poumon et le foie (Speirs et al. 2004).

La 11HSD2, chez l'homme comme chez la souris ou le rat, est exprimée dans les tissus cibles des minéralocorticoïdes, dans les reins principalement, mais aussi dans le colon et le placenta, alors qu'elle n'est pas exprimée dans le foie, le cerveau ou les testicules (Figure 40.) (Albiston et al. 1994). Dans les reins cette enzyme est co-exprimée avec le MR, dans le néphron et les tubes collecteurs (Krozowski, MaGuire, et al. 1995). Au début de la grossesse, la 11HSD2 est largement exprimée chez le fœtus et dans le placenta. De plus, de nombreuses 103

Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2 cellules néoplasiques expriment l'enzyme, ce qui reflète leur état moins différencié. Ceci suggère que dans le placenta, la 11HSD2 est idéalement située pour protéger le fœtus d'un fort taux de glucocorticoïdes maternel et son expression chez le fœtus semble indiquer l'implication de cette enzyme dans le développement fœtal (Stewart et al. 1995).



**Figure 39: Expression des 11HSD1 et 11HSD2 dans différents tissus.** La 11HSD1 est fortement exprimée dans le foie et moyennement exprimée dans le rein et le colon. La 11HSD2 est exprimée très fortement dans les reins, le colon et le placenta, et faiblement exprimée dans le foie. *Source www.proteinatlas.org* 

#### (3) <u>Contrôle de l'activité des 11HSD</u>

De nombreux facteurs endocriniens, inflammatoires ou métaboliques, régulent l'activité de la 11 HSD1, généralement de manière temps et tissu-dépendante. Par exemple, les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine IL-1 et TNF (Tumor necrosis factor), augmentent l'expression de l'ARNm 11HSD1 mais pas celle de la 11HSD2 (Hardy et al. 2006; Friedberg et al. 2003). Il a été montré que les glucocorticoïdes sont capables d'augmenter l'expression de la 11HSD1 dans différents types cellulaires, via les C/EBP (Sun & Myatt 2003; Sai et al. 2008; Michailidou et al. 2007; Smith et al. 1982). Tandis que l'expression de la 11HSD2 est augmentée dans des cellules de poumon (Suzuki et al. 2003), et diminuée dans le placenta (Clarke et al. 2002; Kerzner et al. 2002) par les glucocorticoïdes. Comme le GR, le PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) et le LXR sont à l'interface du métabolisme et de l'inflammation. Les agonistes de ces trois récepteurs nucléaires semblent diminuer l'expression de la 11HSD1 dans le foie et le tissu adipeux brun (Hermanowski-Vosatka et al. 2000; Stulnig et al. 2002).

Différentes hormones, en dehors des glucocorticoïdes, ont été montrées comme induisant un contrôle de l'activité 11HSD1. Ainsi *in vitro*, des niveaux élevés d'insuline diminuent l'expression de la 11HSD1, probablement par l'intermédiaire du récepteur à l'IGF-1 (Liu et al. 1996; Jamieson et al. 1995), tandis que des concentrations plus faibles d'insuline ne sont pas capables d'induire de tels effets (Napolitano et al. 1998; Balachandran et al. 2008). Chez l'homme, l'insuline augmente l'activité de la 11HSD1 dans les adiposites sans changement de l'expression de l'ARNm (Fan et al. 2011; Koistinen et al. 2004). Parallèlement à cela, il a été montré que l'insuline réduisait l'activité 11HSD2 dans des cellules de cancer du colon à un niveau transcriptionnel, et de manière temps et dose dépendant (T Andrieu et al. 2014). L'œstradiol aux doses pharmacologiques, réprime fortement l'activité 11HSD1 dans le foie et les reins de rats (Low et al. 1993; Jamieson et al. 1995) mais augmente l'expression de la 11HSD2 (Gomez-Sanchez et al. 2003). Des troubles du métabolisme des glucocorticoïdes chez les patients présentant un dysfonctionnement de la thyroïde, sont également reliés au fait que l'hormone thyroïdienne réprime la 11HSD1 (Zumoff et al. 1983).

Comme vu précédemment, le C/EBP, régulateur de la signalisation inflammatoire et métabolique, est le seul facteur qui permet la modulation de l'activité et de l'expression de la 11HSD1 et de la 11HSD2 en se liant directement au promoteur du gène pour moduler la transcription de ces gènes (Ramos et al. 1996; McKnight et al. 1989; Seckl & Walker 2001).

### c) Souris invalidées pour l'expression de la HSD1B1 et HSD11B2

Des avancées concernant le rôle des 11HSD1 et 11HSD2 ont pu être réalisées grâce à la création de souris déficientes dans l'expression de ces enzymes (knockout, KO).

Kotelevtsev *et al.*, ont été les premiers à créer des souris homozygotes 11HSD1 KO, générées à partir de la recombinaison génomique du gène (coupure des exons 3 et 4) dans des cellules souches embryonnaires murines (Kotelevtsev et al. 1997). Ces souris KO ne présentent aucune activité réductase dans le foie ou le cerveau et sont incapables de transformer le 11-dehydrocorticostérone en corticostérone active. Aucune variation de l'activité 11HSD2 dans les reins n'a été observée, comparée aux souris sauvages. Ces souris sont fertiles et produisent une descendance normale (Kotelevtsev et al. 1997).

Les études sur les souris 11HSD1 KO ont mis en évidence l'importance de la 11HSD1 dans l'activation des enzymes de la néoglucogenèse et la régulation de la production hépatique de glucose. Le taux de glucose plasmatique est plus faible chez les souris 11HSD1 KO, que chez les souris contrôles, suite à un régime alimentaire riche. Les glucocorticoïdes stimulent la Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2 néoglucogenèse, grâce à leurs effets sur des enzymes clés comme la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) et la G6Pase (Glucose-6-Phosphatase). Lors de périodes de jeune, ces enzymes sont activées par les glucocorticoïdes. Il a été montré que les souris 11HSD1 KO ne peuvent induire l'activité de ces enzymes, puisque le glycogène est accumulé dans le foie, ce qui est le reflet de l'absence d'activation de la néoglucogenèse par les glucocorticoïdes. Ainsi les souris 11HSD1 KO sont capables de résister à l'hyperglycémie observée chez les souris sauvages obèses (Kotelevtsev et al. 1997).

La taille des glandes surrénales des souris mâles 11HSD1 KO est augmentée, ce qui suggère une hyperplasie surrénalienne. Cela pourrait être expliqué par la stimulation de l'axe HPA afin de restaurer le niveau de corticostérone. La surcompensation de l'axe HPA, conduit à des niveaux de corticostérone supérieurs à ceux de souris sauvages, expliqués par l'absence de la 11HSD1 dans le cerveau, qui est un des niveaux de régulation de la formation de glucocorticoïdes par l'HPA (Holmes et al. 2001).

Un KO de la 11HSD2 a été obtenu, comme pour le KO 11HSD1, par un remplacement génomique des exons 3 et 4 par une séquence codant la résistance à la néomycine, dans des cellules souches embryonnaires murines (Kotelevtsev et al. 1999). Seulement une faible proportion de souris naissent homozygotes (16%). Celles-ci n'expriment pas la 11HSD2 au niveau des reins en plus des autres organes. Ces souris sont normales à la naissance, mais 50% des souriceaux meurent dans les 48h. La mort est précédée de faiblesse motrice et de diminution de l'allaitement. Les souris 11HSD2 KO survivantes sont fertiles mais souffrent de graves troubles de l'hypertension, d'hypocalcémie et leur production d'urine est augmentée, ce qui est caractéristique du syndrome de AME chez l'homme (Kotelevtsev et al. 1999; Draper & Stewart 2005). De plus, il a été montré que l'aorte de souris 11HSD2 KO est plus sensible à la contraction induite par la noradrénaline, de manière indépendante de la rétention rénale de sodium, ce qui contribue à l'hypertension chez ces souris (Hadoke et al. 2001; Christy et al. 2003).

#### 3. 11HSD1 & 11HSD2 : sens de réaction et substrats

#### a) Activité 11HSD1

#### (1) <u>Dépendance du co-facteur</u>

Les lysats exprimant la 11HSD1 recombinante, issus de foie de rat ou des cellules HEK 293 exprimant de manière stable la 11HSD1, ont une activité déshydrogénase et réductase (Km =  $1.8\mu$ M pour le cortisol et Km = 270 nM pour la cortisone dans les HEK 293 exprimant la 11HSD1) (Agarwal et al. 1990; Bujalska, Shimojo, et al. 1997); alors que dans les hépatocytes et les macrophages intacts, cette enzyme fonctionne principalement comme une réductase (Km ~ 382 nM pour la cortisone dans des hépatocytes human) (Figure 35) (Low et al. 1993; Ricketts et al. 1998). Les études cinétiques menées sur l'enzyme ont mis en évidence que la disponibilité du co-facteur pour l'enzyme déterminait le sens de la réaction de la 11HSD1 (Agarwal et al. 1990). La détermination de la localisation intracellulaire de la 11HSD1, a révélé qu'elle est située dans la membrane du réticulum endoplasmique et que le site actif est face à la lumière (Frick et al. 2004; Odermatt et al. 1999). L'identification de la H6PD (hexose-6-phosphate déshydrogénase) dans la lumière du réticulum endoplasmique a permis de fournir une explication quant au sens de réaction préférentiel de la 11HSD1 dans les cellules (Atanasov et al. 2004; Y. L. Zhang et al. 2009). En effet, la H6PD catalyse la première étape de la voie des pentoses phosphates, conversion du glucose-6-phosphate en 6phosphogluconolactone, générant ainsi le NADPH à partir du NADP<sup>+</sup> (Figure 35) (Clarke & Mason 2003). A la différence de l'enzyme cytosilique, la H6PD dans le réticulum endoplasmique a une plus large spécificité de substrat, comprenant le glucose-6-sulfate, et le galactose-6-phosphate (White et al. 2007). Néanmoins, dans des conditions physiologiques, le glucose-6-phosphate est le substrat préférentiel de l'enzyme (Kulkarni & Hodgson 1982). Il a été montré que l'activité réductase de la 11HSD1 est dépendante d'un fort ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> (10 ou plus) (Dzyakanchuk et al. 2009). Dans la plupart des tissus exprimant la 11HSD1, la 11HSD1 et l'H6PD sont co-exprimées (Gomez-Sanchez et al. 2008) et l'existence d'une interaction protéine-protéine entre la 11HSD1 et l'H6PD a été démontrée (Atanasov et al. 2008; Y. L. Zhang et al. 2009). Il a été montré que dans des préadipocytes de l'omentum humain, la 11HSD1 agit principalement comme une déshydrogénase en absence d'expression de l'H6PD. L'activité de cette enzyme est modifiée lorsque les adipocytes deviennent matures. En effet, après la différenciation des préadipocytes, la 11HSD1 devient une réductase, permettant ainsi la régénération du cortisol et la promotion de l'adipogénèse et est associée au NADPH (Bujalska et al. 2002)

La co-transfection de cellules épithéliales de mammifères avec des plasmides codants pour la 11HSD1 et l'H6PD augmente l'activité réductase (Atanasov et al. 2004; Bujalska et al. 2005). Le remplacement de la H6PD par un plasmide codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ou l'utilisation de siRNA dirigée contre la H6PD diminue l'activité réductase dans les cellules entières. Ceci suggère que le NADPH doit être généré au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique. La réduction de la cortisone dans des cultures primaires d'adiposites a montré des variations inter-individus, corrélées à l'expression de l'ARNm de l'H6PD et non de la 11HSD1 (Bujalska et al. 2005). Chez la souris, ou l'humain, des mutations inactivant l'H6PD, induisent une modification de l'activité de réductase de la 11HSD1 vers une déshydrogénase (Lavery et al. 2006) et sont responsables chez l'homme du syndrome de AME (Lavery et al. 2008). Il est à noter que puisque l'H6PD est impliquée dans le métabolisme du glucose, celui-ci pourrait réguler l'activité 11HSD1.

Ces résultats montrent que la 11HSD1 possède principalement une activité réductase et que l'H6PD oriente son activité en lui fournissant le co-facteur NADPH nécessaire à cette réaction. Cependant, un défaut d'expression de la H6PD conduirait la 11HSD1 à avoir une activité de déshydrogénase comme reportée dans les adipocytes de l'omentum chez l'homme (Bujalska et al. 2002).

#### (2) Différents types de substrats et/ou inhibiteurs

L'étude de la fonction des 11HSD a commencé avec l'utilisation de deux inhibiteurs non sélectifs : la carbénoxolone et l'acide glycyrrhétinique, provenant de la réglisse, (Figure 40.A), dont les propriétés sont utilisées depuis longtemps dans la pharmacopée chinoise (Bickel & Kauffman 1981).

La 11HSD1 est une enzyme possédant une large variété de substrats et d'inhibiteurs. En plus de son rôle dans le métabolisme des glucocorticoïdes (Km =  $9.2 \pm 0.8 \mu$ M, Vmax =  $5.6 \pm 0.2 \text{ nmol.min}^{-1}$ .mg<sup>-1</sup> pour le cortisol, Km =  $1.9 \pm 0.1 \mu$ M, Vmax =  $0.75 \pm 0.1 \text{ nmol.min}^{-1}$ .mg<sup>-1</sup> pour la corticostérone (Km = $5.9 \pm 0.3 \mu$ M, Vmax =  $1.06 \pm 0.1 \text{ nmol.min}^{-1}$ .mg<sup>-1</sup> pour la corticostérone (Hult et al. 1998)) , la 11HSD1 catalyse la transformation de stérols et d'autres stéroïdes, mais aussi permet la détoxification de xénobiotiques (Maser & Oppermann, 1997; Odermatt & Klusonova, 2014; Odermatt & Nashev, 2010). Ceci sera développé dans la suite du paragraphe.

#### Les 11-oxystéroides et 11-oxystérols

En plus des glucocorticoïdes (cortisone, 11-déhydrocorticostérone ou glucocorticoïdes de synthèse), d'autres stéroïdes oxydés en position 11, comme les 11-oxyprogesterones, 11-

oxypregnenolones et 11-oxyandrogènes, sont des substrats ou inhibiteurs de la 11HSD1 (Figure 40.B.) (Odermatt & Nashev 2010; Odermatt & Klusoňová 2014). Par exemple, le Km de l'enzyme pour la 11-dehydrocorticostérone est de 0.3-20 $\mu$ M dans des extraits cellulaires de foie, avec des enzymes de foie purifiées ou pour l'enzyme 11HSD1 recombinante exprimée dans des bactéries et le Ki de l'enzyme pour la 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone est de 0.4 $\mu$ M dans des microsomes de foie humain (Diederich et al. 2000; Hult et al. 1998). Ces molécules peuvent, en plus d'activer le PR, se lier au MR et GR, permettant ainsi le contrôle transcriptionnel de gènes sous dépendance de ces récepteurs. Ces observations pourraient impliquer ces molécules, dans des situations de stress, d'inflammation, ou lorsque le taux de progestérone de ces métabolites est élevé, notamment durant la grossesse (Galigniana et al. 1997; Burton et al. 1995).

Il a été montré que la 11HSD1 a la capacité de catalyser l'interconversion des 11oxyandrogènes, comme les 11β-hydroxy et 11-keto des androstenedione et des androstérones. Les dérivés 11β-hydroxy des progestérone, allopregnanolone, testostérone et androstanediol (Figure 40.B.) sont des inhibiteurs de l'acticité déshydrogénase de la 11HSD1 (Odermatt & Nashev 2010).

#### Les 7-oxystéroïdes et 7-oxystérols

Les stéroïdes et stérols oxydés en position 7, sont retrouvés dans tous les systèmes vivants, comprenant les mammifères, les oiseaux, les poissons et les plantes (Odermatt & Nashev 2010). Leur métabolisme par la 11HSD1, est lié à la symétrie qui existe entre les positions 11B et 7 $\alpha$  sur le novau stéroïdien, selon l'axe de rotation en x (Figure 41). Cette symétrie est observée pour les stérols et les stéroïdes (Lathe 2002; Lathe & Kotelevtsev 2014). La 11HSD1 est responsable de la conversion du 7-keto- en 7-hydroxy- dehydroepiandrosterone (DHEA) (Km =  $1.15 \pm 0.04 \mu$ M, Vmax =  $0.55 \pm 0.01 \text{ pmol.min}^{-1} \mu \text{g}^{-1}$  et Km =  $1.13 \pm 0.09$  $\mu$ M, Vmax = 8.4  $\pm$  0,2 pmol.min<sup>-1</sup>. $\mu$ g<sup>-1</sup> pour la formation de la forme 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ respectivement, pour l'enzyme 11HSD1 recombinante exprimée dans des bactéries) (Muller et al. 2006), qui sont tous deux de meilleurs ligands de la 11HSD1 que les glucocorticoïdes (Figure 40.C.). D'autres stéroïdes comme les métabolites 7-keto de l'épiandrosterone (Km =  $0.57 \pm 0.03 \mu$ M, Vmax =  $12.3 \pm 0.33$  pmol.min<sup>-1</sup>. $\mu$ g<sup>-1</sup> et Km =  $0.52 \pm 0.09$   $\mu$ M, Vmax =  $3.1 \pm$ 0,12 pmol.min<sup>-1</sup>. $\mu$ g<sup>-1</sup> pour la formation de la forme 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -, pour l'enzyme humaine recombinante) (Hennebert, Pernelle, et al. 2007), du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -ol-17-one (Km = 5.1 ±  $0.57\mu$ M, Vmax = 14.5 ± 0,76 pmol.min<sup>-1</sup>.µg<sup>-1</sup> et Km = 6.8 ± 0.74 µM, Vmax = 1.5 ± 0,2 pmol.min<sup>-1</sup>. $\mu$ g<sup>-1</sup> pour la formation de la forme 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ - sur enzyme humaine recombinante) (Hennebert, Le Mée, et al. 2007) sont également des substrats de la 11HSD1 (Figure 40.C.) (Penno et al. 2014; Muller et al. 2006; Nashev et al. 2007; Hu et al. 2010). Comme pour les glucocorticoïdes, le sens de la réaction de la 11HSD1 est dépendante de la quantité de NADPH fournie par l'H6PD (Nashev et al. 2007). De plus, la 11HSD1 peut induire l'épimérisation des 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxy-stéroïdes en passant par la formation d'un intermédiaire 7-keto-hydroxy-stéroïdes. Cette expérience a été réalisée avec des bactéries transformées avec une protéine recombinante humaine 11HSD1, Km = 8.1 ± 1.3 $\mu$ M, Vmax = 0.8 ± 0,05 pmol.min<sup>-1</sup>. $\mu$ g<sup>-1</sup> de l'enzyme pour le 7 $\alpha$ - en 7 $\beta$ -hydroxy-epiandrosterone en condition d'oxydation (NADP<sup>+</sup>) (Hennebert, Pernelle, et al. 2007; Muller et al. 2006).

La capacité de la 11HSD1 humaine et murine à convertir le 7-KC (7-ketocholestérol) en 7β-OHC (7β-hydroxycholestérol) (Figure 40.C.) a été démontrée avec des protéines recombinantes purifiées humaines (Km =  $51 \pm 12$  nM, Kcat/Km =  $0.03\mu$ M<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), des lysats cellulaires de HEK 293 exprimant la 11HSD1 humaine (Km =  $564 \pm 62$  nM ; Vmax =  $0.21 \pm$  $0.04 \text{ nmol.h}^{-1}$ .mg<sup>-1</sup>), des cellules entières de HEK 293 exprimant la 11HSD1 humaine (Km =  $487 \pm 50$  nM; Vmax = 0.64 ± 0.06 nmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) et des homogénats de foies de rat (Km =  $572 \pm 157$  nM; Vmax = 2,2 ± 0,9 nmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) (Hult et al. 2004; Schweizer et al. 2004). Ces préparations permettent l'oxydation du 7 $\beta$ -OHC (et non du 7 $\alpha$ -OHC , 7 $\alpha$ hydroxycholestérol), alors que seulement la réduction du 7-KC a été retrouvée sur cellules entières (Schweizer et al. 2004). De plus, l'augmentation du rapport 7-KC/7-OHC est observée dans le foie de souris 11HSD1 KO, H6PD KO ou 11HSD1/H6PD double KO (Mitić, Andrew, et al. 2013; Mitić, Shave, et al. 2013). Ainsi, le rôle de la 11HSD1 dans le métabolisme des 7-KC a pu être établi grâce à une étude récente utilisant des souris 11HSD1 transgéniques. Le 7-KC est un des principaux oxystérols retrouvés dans les plaques d'athérome qui bouche les artères. La 11HSD1 en transformant au niveau des artères le 7-KC en 7-OHC, qui a moins d'effet sur la fonction vasculaire, permet le contrôle de la concentration de ces molécules et de leur effet sur la fonction artérielle (Mitić, Andrew, et al. 2013). De plus, les 7-kéto-stérol et 7 keto-stéroïdes inhibent le métabolisme des glucocorticoïdes de facon compétitive (Ki= 8.2 ±0.7 µM de l'enzyme pour le 7ketocholestérol dans des microsomes de foie humain, Ki= 29±5 µM pour le 7-keto-DHEA dans des microsomes de peau humaine, Ki= 5.4 ±0.5 µM pour le 7-keto-pregnenolone dans des HEK 293 exprimant la 11HSD1), et inversement (Nashev et al. 2007; Balazs et al. 2009; Wamil et al. 2008). Ceci suggère que certains oxystérols pourraient être des modulateurs importants des taux de glucocorticoïdes intracellulaires dans des tissus où ils s'accumulent, comme le foie, le cerveau et le tissu adipeux, par l'inhibition de la 11HSD1 (Wamil et al. 2008).

#### Les acides biliaires

En plus de permettre la régulation de l'homéostasie du cholestérol, les acides biliaires modulent différentes voies comme la lipogenèse, le métabolisme et le transport des lipoprotéines, la glycogénèse, et la sensibilité à l'insuline (Trauner et al. 2010). Récemment, le 7-oxoLCA (acide 7-oxolithocholique) (Figure 40.D.) a été montré comme substrat de la 11HSD1. Cette molécule est un acide biliaire secondaire qui est transformé en acide chenodeoxycholique et en acide ursodéoxycholique (Odermatt et al. 2011). La diminution de l'expression de la 11HSD1 dans le foie ou de manière globale, semble augmenter l'ensemble des acides biliaires et non seulement le taux de 7-oxoLCA. Cet effet est plus marqué lors du knock-out systémique de la 11HSD1 (Penno et al. 2014). L'altération de la concentration d'acides biliaires peut contribuer aux effets métaboliques de l'inhibition de la 11HSD1 (Odermatt & Klusoňová 2014).

#### Les xénobiotiques :

Au sein de la lumière du réticulum endoplasmique, l'ajout d'une fonction hydroxyle par des carbonyl réductase, sur certains xénobiotiques (médicaments, insecticides, carcinogènes) comprenant un groupement carbonyl (aldéhyde ou cétone), permet leur élimination (Oppermann 2007). Le rôle de la 11HSD1 dans le métabolisme des xénobiotiques, en tant que carbonyl réductase, à d'abord été décrit dans le foie de souris (Maser & Netter 1989). Ainsi, la 11HSD1 catalyse la réduction de métyrapone, un inhibiteur de la 11β-hydroxylase, CYP11B1 (Figure 40.E.) (Oppermann et al. 1995; Maser & Bannenberg 1994). Cette molécule est un puissant inhibiteur de la 11HSD1 et peut entrer en compétition au niveau de l'enzyme, avec les glucocorticoïdes (Maser & Bannenberg 1994; Sampath-Kumar et al. 1997). La 11HSD1 peut métaboliser le ketoprofène ou activer la prodrogue DFU-lactone, deux molécules anti-inflammatoires (Figure 40.E.) (Hult et al. 2001) ; ou bien rendre moins toxique par sa réduction, la nicotine-nitrosamine, dérivé cétone (NNK), molécule cancérigène retrouvée dans le tabac (Figure 40.E.) (Maser 2004). Pour finir, Kenneke *et al.*, ont mis en évidence le rôle de la 11HSD1 dans le métabolisme du triadimefon, un fongicide largement utilisé dans l'agriculture (Figure 40.E.) (Maser 2004).



**Figure 40: Structure des substrats et inhibiteurs de la 11HSD1. A.** Représentation de l'acide glycyrrhétinique et de la carbénoxolone comparé à la cortisone te à la 11-déhydrocorticostérone. **B.** Structures des principaux 11-oxystéroïdes et 11-oxystérols. **C.** Structures des principaux 7-oxystéroïdes et des 7-oxystérols. **D.** L'acides 7-oxolithocholique. E. Les composés carbonylés non stéroïdiens. En bleu on retrouve la structure du noyau stéroïdien oxydé en 7 ou 11, et en rose la structure que l'on peut trouver sur tous les composés carbonylés non stéroïdiens substrats de la 11HSD1, avec principalement deux cycles à 6 séparés par trois carbones dont un porte une fonction cétone.



Figure 41: Représentation des axes de symétrie présents sur le noyau stéroïdien, exemplifié sur l'oestradiol. Le noyau stéroïdien comprend 3 axes de symétrie différents : en x qui rend les positions 11 $\beta$  et 7 $\alpha$  équivalentes, en y pour les positions 11 $\beta$  et 7 $\beta$ , et en z pour les positions 3 $\alpha$  et 17 $\beta$ . D'après Lathe & Kotelevtsev, 2014

#### b) Activité 11HSD2

#### (1) <u>Substrats et inhibiteurs</u>

La 11HSD2 permet uniquement la déshydrogénation de l'hydroxyle en position C11 des glucocorticoïdes (Km =  $12.4 \pm 1.5$  nM, Vmax =  $8.0\pm 0.7$  pmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, pour la corticostérone Km =  $43.9 \pm 8.5$  nM, Vmax =  $4.8\pm 0.7$  pmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>pour le cortisol dans des lysat de cellules CHO (Chinese hamster ovary) transfectées par un plasmide codant la 11HSD2), de manière dépendante de son cofacteur, le NAD<sup>+</sup> (Brown et al. 1993; Obeyesekere et al. 1997; Brown et al. 1996; Zhou et al. 1995). En plus du cortisol et de la corticostérone (Km =  $43.9 \pm 8.5$  nM et Km =  $12.4 \pm 1.5$  nM dans des cellules CHO exprimant surexprimant la 11HSD2) , la 11HSD2 peut avoir comme substrat la déxaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse largement utilisé en clinique (Figure 40) (Km =  $119 \pm 15$  nM, Vmax =  $3.7\pm 0.5$  pmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, dans des cellules CHO exprimant surexprimant la 11HSD2) (Brown et al. 1996).

Les dérivés de réglisse, que sont l'acide glycyrrhétinique et la carbénoxolone, (Figure 40) sont de meilleurs inhibiteurs de la 11HSD2 que de la 11HSD1 (pour la 11HSD2 IC<sub>50</sub> = 11nM et IC<sub>50</sub> = 18nM et pour la 11HSD1 IC<sub>50</sub> = 1,5  $\mu$ M et IC<sub>50</sub> =1,8 $\mu$ M pour l'acide glycyrrhétinique et la carbénoxolone respectivement, dans des microsomes de rein humain pour la 11HSD2 ou des microsomes de foie humain pour la 11HSD1) (Brown et al. 1996; Chen et al. 2009; Song et al. 1992). D'autres inhibiteurs de la 11HSD2, avec des degrés de sélectivité variable, ont été identifiés. Par exemple, des perturbateurs endocriniens, comme des phtalates, utilisés dans les plastiques notamment, dont le plus abondant est le di(2-éthylhexyl) phtalate, qui est ensuite transformé dans l'organisme en mono-(2-éthylhexyl) phtalate (IC<sub>50</sub> = 110,8 ± 10,9 $\mu$ M sur des microsomes de rein humain (Zhao et al. 2010)), ou

les organostanniques (molécules organiques comprenant un atome d'étain) utilisés dans l'agriculture comme les triphenylétain ou tributylétain (IC<sub>50</sub> = 3.3 et 16.5 $\mu$ M, sur des enzymes humaines recombinantes respectivement (Atanasov et al. 2005)). Des alkyls phénols utilisés comme surfactants industriels inhibent aussi la 11HSD2, IC<sub>50</sub> = 8.9  $\mu$ M pour 4-t-octylphenol, IC<sub>50</sub> = 20.3  $\mu$ M pour le 4-nonylphenol, IC<sub>50</sub> = 23.5  $\mu$ M pour le 4-n-octylphenol et IC<sub>50</sub> = 26.2  $\mu$ M pour le 4-n-nonylphenol sur des microsomes de rein humain (Ohshima et al. 2005; Ma et al. 2011).



Figure 42: Structure des substrats et inhibiteurs de la 11HSD2. Le cortisol est le substrat naturel préférentiel. En bleu on retrouve la structure du noyau stéroïdien oxydé en 11.

Il est intéressant de noter que de nombreux inhibiteurs de ces protéines, sont en cours de développement dans le cadre de traitements de nombreuses maladies, lesquels seront développés dans le paragraphe suivant.

#### 4. La 11HSD1 et 11HSD2 comme cibles thérapeutiques ?

Comme nous venons de le voir au fur et à mesure de ce chapitre, les 11HSD1 et 11HSD2, du fait de leur rôle biologique, sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions essentielles et leur dérégulation est liée à de nombreuses maladies.

L'excès de glucocorticoïdes ou leur carence produisent des syndromes aux caractéristiques cliniques dramatiques, comme les syndromes de Cushing et d'excès apparent des minéralocorticoïdes (AME) respectivement. De plus les glucocorticoïdes contribuent à de nombreuses pathologies, dont certaines sont très communes, comme les troubles immuns ou inflammatoires, l'hypertension, l'obésité et le diabète de type 2. Comprendre le rôle

Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2 physiologique des 11HSD a conduit les chercheurs et cliniciens à aborder l'importance de ces pré-récepteurs du métabolisme des glucocorticoïdes.

Ainsi, dans les années 1930, Harvey Cushing a décrit chez des patients certains symptômes caractéristiques de ce que nous appelons maintenant le syndrome de Cushing (Cushing 1994; Arnaldi et al. 2003). Une exposition prolongée à de fortes doses de cortisol induit un certain nombre de troubles caractéristiques. Bien que le syndrome de Cushing soit rare, il a permis de mieux comprendre les effets du cortisol en excès, qui ont par la suite, servi à évaluer le rôle du cortisol et des 11HSD1 et 11HSD2 dans les différentes maladies.

Les premières évidences du rôle des glucocorticoïdes dans la régulation du métabolisme du glucose et le développement du diabète ont été décrites dans les années 1939-1940 (Long & Lukens 1936; Houssay et al. 1942). Par la suite, il a été montré que les glucocorticoïdes stimulaient la néoglucogenèse, inhibaient l'activité du glucose, et provoquaient une résistance à l'insuline. Physiologiquement, les glucocorticoïdes augmentent la glycémie et le taux d'acides gras à travers la stimulation de la gluconéogenèse hépatique et la lypolyse des tissus adipeux via le jeûne. Cependant, hors jeûne, ils sont capables de travailler ensemble avec l'insuline pour promouvoir le stockage des lipides et des glucides. La relation entre les glucocorticoïdes et la perturbation métabolique est le meilleur exemple dans le syndrome de Cushing. Les patients développent de l'obésité avec l'accumulation de graisse au niveau des viscères, une stéatose hépatique, de la dyslipidémie, de l'athérosclérose, et de l'hyperglycémie associée à la résistance à l'insuline provoquant ainsi une hyperinsulinémie (Ingle 1952; Ingle & Meeks 1952; Long 1952). Ces facteurs conduisent à une augmentation du risque de maladie métabolique puisque 50% des patients ont un défaut de glycémie ou un diabète de type 2, et une augmentation de la mortalité du fait de problèmes cardiovasculaires (Gathercole & Stewart 2010).

Des études épidémiologiques ont montré une incidence accrue de l'athérosclérose chez les patients ayant un excès de glucocorticoïdes, ce qui peut conduire à l'infarctus du myocarde et à des accidents vasculaires cérébraux (Pivonello et al. 2005).Il a été montré qu'ils peuvent augmenter la perméabilité endothéliale, ce qui permet l'initiation de la formation de la plaque d'athérome (Borski et al. 2002). D'un autre coté, du fait des propriétés anti-inflammatoires des glucocorticoïdes, ils ont la capacité de diminuer la formation de l'athérosclérose (Simoncini et al. 2000; Rhen & Cidlowski 2005). Les glucocorticoïdes inhibent l'initiation de problèmes inflammatoires. Les glucocorticoïdes inhibent la vasodilatation, augmentent la perméabilité vasculaire qui se

produit suite à une agression inflammatoire et ils diminuent la migration des leucocytes dans les sites enflammés (McLean et al. 2000). La plupart des actions anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des glucocorticoïdes sont attribuables directement ou indirectement à l'effet transcriptionnel des agonistes du GR, qui modifient la transcription de nombreux gènes dans les leucocytes (Ashwell et al. 2000; McEwen et al. 1997). La 11HSD1 est exprimée dans les cellules du système immunitaire, comme les macrophages (Coutinho & Chapman 2011) ou les lymphocytes (Hennebold et al. 1996), alors que la 11HSD2 n'est pas exprimée dans les cellules immunitaires (Freeman et al. 2005). La 11HSD1 et la 11HSD2 sont également présentes dans les macrophages synoviaux à la fois dans l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. La présence de macrophages exprimant la 11HSD2, peut refléter une adaptation, qui permet une prolifération cellulaire accrue ou une différenciation différente dans cet environnement inflammatoire chronique (Hardy et al. 2008).

La conversion accrue du cortisone en cortisol, dans l'ensemble des organes suggère que l'équilibre des 11HSD est modifié en faveur de la 11HSD1 chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire (Ichikawa et al. 1977). Il a été montré qu'il existait une régulation des 11HSD1 et 11HSD2 par des cytokines pro-inflammatoires dans les sites d'inflammation, avec une augmentation de la 11HSD1 et une diminution de la 11HSD2, qui elle, n'est généralement pas exprimée dans les leucocytes, ce qui permet d'augmenter les concentrations de cortisol (Chapman et al. 2009).

La diminution de l'expression de la 11HSD2, peut être due à des mutations du gène ou à son inhibition. Les symptômes résultant de la diminution de l'activité 11HSD2 sont l'hypertension, principalement causée par la rétention du sodium due à l'excès d'activation du MR par le cortisol (Ferrari et al. 2000). Le déficit héréditaire en 11HSD2 (très rare) diminue le métabolisme du cortisol, présentant un déficit en potassium. Cette forme d'hypertension est connue comme le syndrome de AME (Ulick et al. 1979; New et al. 1977). Les symptômes cliniques généralement observés sont un faible poids à la naissance, un retard de développement, une sévère hypertension avec un fort déficit en potassium et en aldostérone. La maladie est une maladie héréditaire autosomique récessive, et diverses mutations sur le gène HSD11B2 ont été montrées comme responsables de la perte d'activité de la 11HSD2. Les signes et les symptômes du syndrome peuvent être partiellement ou complètement inversés par traitement avec de la spironolactone, un antagoniste du MR (Ferrari et al. 2001; Mantero et al. 1995) ou une transplantation rénale (Palermo et al. 1998), ce qui met en évidence le rôle essentiel de la protection rénale de la 11HSD2 (Ferrari 2010).

#### 11- Hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 et de type 2 et cancer

La capacité des glucocorticoïdes à induire la mort cellulaire de cellules lymphoïdes a permis de les inclure, principalement la déxaméthasone, dans certains protocoles de traitement des leucémies. Ainsi les glucocorticoïdes induisent l'apoptose, qui est un mécanisme de mort cellulaire programmée, caractérisée par des modifications morphologiques typiques telles que le bourgeonnement de la surface membranaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation régulière de l'ADN, le maintien de l'intégrité des organites cellulaires et finalement la phagocytose de la cellule morte (Kerr et al. 1972). Ce phénomène est indispensable au bon fonctionnement des cellules. Wyllie a montré en premier, que le traitement à la déxaméthasone permet l'apoptose de thymocytes (cellules hématopoïétiques progénitrices présentes dans le thymus) (Wyllie 1980). Il a également été démontré que différentes lignées leucémiques (Bourgeois & Newby 1977; Norman & Thompson 1977; Baxter et al. 1971) et des lymphocytes T matures (Galili 1983) subissaient ce même type de mort cellulaire à la suite d'un traitement aux glucocorticoïdes. Cette capacité est dépendante de l'activation du GR, ce qui a été démontré dans des thymocytes de souris transgéniques pour le GR et dans des lignées humaines de leucémies lymphoblastiques aigües, mutées pour le GR (Hala et al. 1996; Reichardt et al. 1998). De plus, pour induire l'apoptose, le niveau d'expression du GR doit être suffisant, comme observé sur des souris transgéniques pour le GR (Pazirandeh et al. 2002; Geley et al. 1996), dans des lignées humaines de leucémies lymphoblastiques aiguës exprimant différents niveaux de GR (Geley et al. 1996) ou dans des lignées de myélomes sensibles ou résistantes aux glucocorticoïdes (Chauhan et al. 2002). La mort cellulaire induite par les glucocorticoïdes est donc dépendante de l'activation ou de la transrépression de gènes sous dépendance du GR. Ainsi, il a été montré que l'induction de l'apoptose peut être dépendante de la répression de l'activité du facteur de transcription AP-1 (Helmberg et al. 1995). De plus, la diminution de l'expression du proto-oncogène c-Myc est liée à l'induction de l'apoptose et à l'inverse, sa sur-expression inhibe l'apoptose due aux glucocorticoïdes (Thompson 1998). L'implication des protéines membres de la famille Bcl-2 semble être essentielle pour l'induction de l'apoptose par les glucocorticoïdes. Il a été montré une augmentation des protéines pro-apoptotiques (Wang et al. 2003; Han et al. 2001) et une diminution des protéines anti-apoptotiques (Casale et al. 2003; Chauhan et al. 2002) de la famille Bcl-2 dans des lignées leucémiques après traitement. Il est également possible d'observer la mort cellulaire induite par les glucocorticoïdes par la modification de voies Introduction - Chapitre III – Les 11-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2 impliquées dans la survie, comme l'induction de IκB, qui interagit et inactive NF-κB (Auphan et al. 1995).

Le rôle des glucocorticoïdes dans l'apparition, le développement et la réaction à la thérapie du cancer du sein, est complexe et ambigu. Dans des lignées cellulaires cancéreuses, y compris des lignées mammaires, la déxamethasone a été montrée comme étant un chimio-sensibilisant (Wang et al. 2004; Lu et al. 2005). Des études pharmacocinétiques sur xénogreffes de lignées cancéreuses mammaires ont démontré qu'un prétraitement à la déxamethasone augmentait l'activité anti-tumorale de cytotoxiques : carboplatine, ou gemcitabine, par une augmentation du taux de ces molécules dans les tumeurs. Ceci conduit à une diminution significative du volume tumoral et la prolifération cellulaire ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose (Wang et al. 2004; Wang et al. 2007).

D'un autre coté, toujours dans des lignées cellulaires de cancers du sein, le GR peut exercer des effets anti-apoptotiques par le biais de l'activation de la voie de signalisation de NF-KB. Le GR active indirectement les kinases IKK (IkB kinase), qui phosphoryleront et orienteront IκB, la protéine inhibitrice de NF-κB, conduisant à l'activation de NF-κB et à l'induction de gènes anti-apoptotiques, tels que les inhibiteurs des protéines de l'apoptose (IAP) (De Bosscher et al. 2003b; Herr et al. 2007). L'action du GR dans la survie a aussi été montrée par son interaction avec le facteur de transcription AP-1 (Feng et al. 1995). Les niveaux d'expression du GR diminuent dans les tumeurs de cancers mammaires selon le stade de la tumeur, du tissu normal au carcinome invasif (Perou et al. 2000; Lien et al. 2006; Buxant et al. 2010; Conde et al. 2008). Cette observation est corrélée avec une modification de la localisation du GR par immunohistochimie, du noyau au cytoplasme dans les tumeurs mammaires comparées aux tissus sains (Conde et al. 2008). De plus, de nombreuses études indiquent qu'à la fois in vitro et in vivo, le traitement aux glucocorticoïdes empêche l'apoptose induite par différentes molécules cytotoxiques ou par le traitement du cancer du sein, tels que le taxol (Sui et al. 2006; W. Wu et al. 2004), la doxorubicine (W. Wu et al. 2004), le cisplatine et le 5-fluorouracile (Zhang et al. 2006), ou le trastuzumab (Sumikawa et al. 2008).

En plus de ses effets directs sur la prolifération et l'apoptose, une interaction du GR avec d'autres récepteurs stéroïdiens est impliquée dans la régulation de l'homéostasie du tissu mammaire. Des croisements du métabolisme du GR et d'autres récepteurs stéroïdiens, comme le ERα ou le PR, ont été décrits. Ainsi, le ERα peut inhiber la signalisation du GR et réciproquement. Différentes études ont montré que les niveaux d'ARNm du GR étaient plus

élevés dans des lignées de cancers du sein ER-négatif que dans les cellules ER-positifs (deFazio et al. 1997; R. E. Hall et al. 1990). Une hypothèse serait que l'œstradiol pourrait diminuer l'expression de l'ARNm et de la protéine du GR, dans la lignée de cancer du sein MCF7 (Krishnan et al. 2001). Les œstrogènes pourraient aussi inhiber l'action du cortisol par une déphosphorylation de la sérine Ser211 du GR par l'induction de la protéine phosphatase 5 (Y. Zhang et al. 2009). De plus, les GR inhibent l'activité de l'œstradiol en augmentant l'activité de l'œstrogène sulfotransférase, qui diminue le taux d'œstradiol libre (Gong et al. 2008).

Les glucocorticoïdes et les GR peuvent donc jouer un rôle significatif dans la physiopathologie de cancer, or de nombreuses contradictions concernant leurs propriétés ont été démontrées, notamment dans les cancers du sein. C'est pourquoi la régulation de leur biosynthèse dans les cancers, semble être importante afin de mieux les traiter. En effet, dans des cellules leucémies lymphoblastiques aiguës, la 11HSD1 est augmentée par la déxaméthasone dans des cellules sensibles à l'apoptose induite par les glucocorticoïdes, mais diminuée dans les cellules résistantes (Sai et al. 2008). La 11HSD2 est également exprimée dans des lignées cellulaires leucémiques, dans lesquelles son inhibition augmente l'activité cytotoxique du cortisol (Sai et al. 2011), suggérant ainsi que la 11HSD2 est impliquée dans les effets pro-apoptotiques du cortisol. Ainsi, la dérégulation des 11HSD pourrait refléter la capacité des tumeurs à répondre ou non aux traitements des glucocorticoïdes (Brewer et al. 2002). Ces données appuient l'idée que l'expression de ces enzymes, peut être un biomarqueur de l'état cancéreux et de la réponse au traitement par les glucocorticoïdes utilisés dans certains cancers tels que les leucémies lymphoblastiques aiguës.

Il est reconnu que le cortisol possède des propriétés anti-prolifératives, en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, notamment dans des lignées cellulaires murines de cancer du foie ou lignées d'ostéosarcomes humains (Rogatsky et al. 1997; Sánchez et al. 1993). Il a été montré, sur des lignées de sarcomes de rats, que l'expression de la 11HSD1 diminue la prolifération alors que l'expression de la 11HSD2 l'augmente (Rabbitt et al. 2002). L'expression de la 11HSD2 a été observée dans différents types de cancers, comme par exemple les cellules leucémiques (Garbrecht & Schmidt 2013; Sai et al. 2011), des cellules de cancers du colon (M. Z. Zhang et al. 2009; Thomas Andrieu et al. 2014), des échantillons de patients atteints d'un cancer des poumons (Suzuki et al. 2000), des échantillons de patientes atteints d'un cancer des ovaires (Temkin et al. 2006) et ou des échantillons de patientes ou des

cellules de cancer du sein (Koyama et al. 2001; Rubiś et al. 2004). Il est intéressant de noter qu'une modification de l'expression de ces deux enzymes a été observée. En effet, dans les tissus exprimant la 11HSD1, elle est majoritairement exprimée dans le cytoplasme des tissus normaux, alors que dans les tumeurs c'est la 11HSD2 cytoplasmique qui est exprimée (Bland et al. 1999; Cooper et al. 2001; Eyre et al. 2001; Korbonits et al. 2001), avec une diminution de l'expression de la 11HSD1 dans ces tissus comme dans les cancers du sein par exemple (Lu et al. 2011). Dans chacun des cas, l'expression de la 11HSD2 est corrélée à l'expression du GR, plutôt qu'au MR, suggérant une fonction encore inconnue de l'enzyme, en plus de son rôle de « pré-récepteur » du MR. Du fait de la fonction fondamentale du GR, et de son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la différenciation, il semble évident que la surexpression de la 11HSD2 corrélée à l'expression du GR dans les tumeurs, permettrait aux cellules tumorales de proliférer et pourrait être impliquée dans l'initiation et/ou la progression des cancers (Draper & Stewart 2005).

Les 11HSD1 et 11HSD2 sont donc impliquées dans de nombreuses maladies et pourrait jouer un rôle important dans la survenue ou la progression des cancers. Dans ce contexte, la 11HSD2 qui contrôle l'activation essentielle des glucocorticoïdes, est une cible thérapeutique en puissance dans le cadre de traitement contre le cancer du sein, mais peut-être également pour d'autres cancers.

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

L'équipe du Docteur Sandrine Silvente-Poirot et du Docteur Marc Poirot, travaille sur le rôle du métabolisme du cholestérol dans la promotion des cancers du sein et des leucémies ou leur control.

Des travaux de l'équipe ont montré que le métabolisme du cholestérol est impliqué dans la pharmacologie des ligands du site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS), comme le Tamoxifène (Tam) (de Medina et al., 2009; Payré et al., 2008), qui est le traitement de référence pour les cancers du sein exprimant le récepteur des œstrogènes (ER). Deux enzymes cholestérogéniques sont impliquées dans la liaison des ligands d'AEBS, il s'agit de la DHCR7 et de la D8D7I qui constituent le site AEBS (Kedjouar, De Medina, et al. 2004). L'équipe a établi que le site AEBS porte l'activité enzymatique Cholestérol-5,6-Epoxyde Hydrolase (ChEH) (de Medina, Paillasse, Segala, Poirot, & Silvente-Poirot, 2010). La ChEH catalyse l'hydrolyse des cholestérol-5,6-époxydes (5,6-EC) en cholestane- $3\beta$ , $5\alpha$ , $6\beta$ -triol (CT) (Silvente-Poirot & Poirot 2012a). Ainsi les ligands d'AEBS inhibent la ChEH et induisent l'accumulation de 5,6-EC (de Medina, Paillasse, et al. 2010a; Sola et al. 2013), qui participe à leurs effets anti-tumoraux (Segala et al. 2013). L'accumulation des 5,6-EC est responsable de la re-différenciation des cellules cancéreuses et des effets cytotoxiques des inhibiteurs de la ChEH (Segala et al. 2013; Poirot & Silvente-Poirot 2013). Des données préliminaires de l'équipe, ont montré que le CT pouvait être transformé en 6-oxo-cholestane-3β,5α-diol (OCDO), dans les cellules cancéreuses et qu'il était capable d'augmenter la prolifération et l'invasivité tumorale (Silvente-Poirot et al. 2012; Silvente-Poirot & Poirot 2012a). Le premier objectif de ma thèse était de démontrer les effets pro-prolifératifs et invasifs de l'OCDO in vitro et in vivo dans le cancer du sein (Article 3). Le deuxième objectif de ma thèse était de caractériser les enzymes responsables de sa biosynthèse grâce à des études in vitro, in vivo et d'étudier leurs expressions sur échantillons de tumeurs et de tissus sains adjacents de patientes atteintes d'un cancer du sein (Article 3). Pour cela, j'ai développé différents outils, notamment la synthèse en une seule étape de substrats radioactifs, tels que le CT et l'OCDO (Article 2).

De plus, l'équipe a découvert et synthétisé la Dendrogénine A ou DDA (6histaminylcholestane-3,5-diol). La DDA fait partie d'une nouvelle classe de molécules qui appartient à la famille des alkaloïdes stéroïdiens, qui n'ont jamais été identifiés chez les mammifères. Cette découverte est fondée sur une hypothèse métabolique postulant qu'une réaction s'effectue, au niveau du site AEBS, entre le  $5,6\alpha$ -EC et l'histamine. La DDA possède une forte capacité à induire la différenciation cellulaire de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, notamment sur les cellules de cancers du sein et de mélanomes. A des concentrations plus élevées, la DDA a une activité cytotoxique sur tous les types cancéreux testés lors de sa découverte, incluant des lignées cellulaires de cancers du sein, de cancers du côlon, de cancers du poumon, de glioblastomes, de leucémies, et de mélanomes métastatiques d'origines murine et humaine (de Medina et al., 2009). Le troisième objectif de ma thèse était d'étudier, dans des échantillons de patientes atteintes d'un cancer du sein, la présence de DDA dans la tumeur ou dans le tissu sain adjacent.

Le quatrième objectif de ma thèse était d'analyser, d'après les différents résultats obtenus, le niveau des métabolites produits, dans des échantillons de patientes ayant un cancer du sein et dans le tissu sain adjacent. C'est-à-dire étudier la formation de la DDA et de l'OCDO, deux molécules aux effets opposés, ayant un précurseur métabolique commun, en parallèle à l'étude de l'expression des enzymes les produisant, dans une situation normale ou pathologique. Ces travaux ayant pour but de définir les dérégulations du métabolisme des 5,6-EC dans les cancers du sein comparé au tissu mammaire sain. Ces travaux devraient permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant d'améliorer les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées en clinique et de nouvelles pistes thérapeutiques.

# **RESULTATS**

## Article 1 :

## La Dendrogénine A, molécule à l'interface entre le métabolisme du cholestérol et de l'histamine, aux propriétés de différenciation cellulaire et anti- tumorales

Philippe de Medina, Michael R. Paillasse, Gregory Segala, <u>Maud Voisin</u>, Loubna Mhamdi, Florence Dalenc, Magali Lacroix-Triki, Thomas Filleron, Frederic Pont, Talal Al Saati, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Sandrine Silvente-Poirot & Marc Poirot

Nature Communication, 2013

Des travaux de l'équipe ont montré que le métabolisme du cholestérol est impliqué dans la pharmacologie des ligands du site de liaison des anti-œstrogènes (AEBS), comme le Tamoxifène (Tam) (de Medina et al., 2009; Payré et al., 2008). Deux enzymes cholestérogéniques sont impliquées dans la liaison des ligands d'AEBS, il s'agit de la DHCR7 et de la D8D7I qui constituent l'AEBS (Kedjouar, De Medina, et al. 2004). L'équipe a établi que le site AEBS porte l'activité enzymatique Cholestérol-5,6-Epoxyde Hydrolase (ChEH) (de Medina, Paillasse, Segala, Poirot, & Silvente-Poirot, 2010). La ChEH catalyse l'hydrolyse des cholestérol-5,6-époxydes (5,6-EC) en cholestane-3β,5α,6β-triol (CT). Ainsi les ligands d'AEBS inhibent la ChEH et induisent l'accumulation de 5,6-EC, qui participe aux effets anti-tumoraux du Tam et des ligands d'AEBS (Segala et al. 2013). Le Tam étant le traitement de référence pour les cancers du sein exprimant le récepteur aux œstrogènes (ER), il semble judicieux d'étudier le métabolisme des 5,6-EC. L'équipe a émis l'hypothèse que, du fait de leur proximité spatiale, les 5,6-EC accumulés pouvaient réagir avec l'histamine portée par l'AEBS. Celle-ci à été démontrée grâce à la production de nouvelles molécules issues de la réaction des 5,6α-EC et des amines, dans des conditions catalytiques (de Medina, Paillasse, Payré, Silvente-Poirot, & Poirot, 2009). Il est intéressant de noter que, contrairement aux autres époxydes, les 5,6β-EC ne réagissent pas spontanément avec des nucléophiles, ce qui les rend particulièrement stables (Paillasse et al. 2012). Il s'est avéré que le produit d'aminolyse formé à partir du 5,6 $\alpha$ -EC et de l'histamine : le 6-histaminylcholestane-3,5-diol, est un alcaloïde stéroïdien, possédant une forte capacité à induire la différenciation cellulaire de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Sa capacité à former des dendrites, caractéristiques de la différenciation de précurseurs neuronaux et des mélanocytes, a permis d'appeler cette molécule la Dendrogénine A (DDA) (de Medina et al., 2009). L'existence biologique de la DDA semble être possible puisque sa synthèse est motivée par une hypothèse métabolique qui repose sur la réaction entre le substrat de la ChEH, le 5,6-EC, et l'histamine. Dans ces travaux, nous décrivons l'identification, la caractérisation de la DDA et son dosage dans des extraits de tissus murins et humains pour détecter sa présence dans des organes de mammifères et dans des tumeurs. Enfin, nous avons mis en évidence son potentiel anticancéreux sur des tumeurs implantées chez la souris.

Cette étude nous permet de démontrer la découverte d'une nouvelle molécule naturellement présente dans l'organisme, aux propriétés anti-cancéreuses, qui semble être dérégulée dans les cancers.



## ARTICLE

Received 13 Nov 2012 | Accepted 4 Apr 2013 | Published 14 May 2013

DOI: 10.1038/ncomms2835

**OPEN** 

## Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties

Philippe de Medina<sup>1,2,\*</sup>, Michael R. Paillasse<sup>1,2,\*</sup>, Gregory Segala<sup>1,3,4</sup>, Maud Voisin<sup>1,3,4</sup>, Loubna Mhamdi<sup>2</sup>, Florence Dalenc<sup>1,3,4</sup>, Magali Lacroix-Triki<sup>3,4</sup>, Thomas Filleron<sup>4</sup>, Frederic Pont<sup>5</sup>, Talal Al Saati<sup>6</sup>, Christophe Morisseau<sup>7</sup>, Bruce D. Hammock<sup>7</sup>, Sandrine Silvente-Poirot<sup>1,3,4</sup> & Marc Poirot<sup>1,3,4</sup>

We previously synthesized dendrogenin A and hypothesized that it could be a natural metabolite occurring in mammals. Here we explore this hypothesis and report the discovery of dendrogenin A in mammalian tissues and normal cells as an enzymatic product of the conjugation of  $5,6\alpha$ -epoxy-cholesterol and histamine. Dendrogenin A was not detected in cancer cell lines and was fivefold lower in human breast tumours compared with normal tissues, suggesting a deregulation of dendrogenin A metabolism during carcinogenesis. We established that dendrogenin A is a selective inhibitor of cholesterol epoxide hydrolase and it triggered tumour re-differentiation and growth control in mice and improved animal survival. The properties of dendrogenin A and its decreased level in tumours suggest a physiological function in maintaining cell integrity and differentiation. The discovery of dendrogenin A reveals a new metabolic pathway at the crossroads of cholesterol and histamine metabolism and the existence of steroidal alkaloids in mammals.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> INSERM UMR 1037, Team 'Sterol Metabolism and Therapeutic Innovations in Oncology', Cancer Research Center of Toulouse, F-31052 Toulouse, France. <sup>2</sup> AFFICHEM, F-31052 Toulouse, France. <sup>3</sup> University Toulouse III, F-31052 Toulouse, France. <sup>4</sup> Institut Claudius Regaud, F-31052 Toulouse, France. <sup>5</sup> UDEAR, UMR 5165 CNRS-University Toulouse III, F-31059 Toulouse, France. <sup>6</sup> INSERM-US006 ANEXPLO/CREFRE, F-31024 Toulouse, France. <sup>7</sup> Department of Entomology and UCD Comprehensive Cancer Center, University of California, Davis, California 95616, USA. \* These authors contributed equally to the work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.P. (email: marc.poirot@inserm.fr) or to S.S.-P. (email: poirot.sandrine@hotmail.fr).

holesterol epoxide hydrolase (ChEH; EC 3.3.2.11) is a microsomal enzyme that is ubiquitous in mammalian tissues and selectively catalyses the hydrolysis of the cholesterol epoxides, 5,6α-epoxy-cholesterol (5,6α-EC) and 5,6βepoxy-cholesterol (5,6 $\beta$ -EC), into cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT)<sup>1</sup>. The ChEH activity is carried out by the anti-oestrogen binding site (AEBS), a high-affinity binding site for the anti-tumour drug Tamoxifen (Tam) and other selective oestrogen receptor (ER) modulators<sup>2-6</sup>. ChEH is a heterodimeric complex formed by 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -isomerase (D8D7I) and 3 $\beta$ hydroxysteroid- $\Delta^7$ -reductase (DHCR7)<sup>4</sup>. D8D7I and DHCR7 are involved in the biosynthesis of cholesterol<sup>4,6,7</sup>, organ development<sup>8</sup>, cell differentiation and cell death<sup>5,9,10</sup>. All AEBS ligands are inhibitors of ChEH, and this inhibition of ChEH results in an accumulation of 5,6-ECs that contributes to the anticancer pharmacology of AEBS ligands, including Tam<sup>2,3,7,9,11</sup>. Importantly, Tam is a major drug used in the treatment of ERpositive breast cancers, and consequently a great number of patients worldwide are taking Tam, which makes it very relevant to study 5,6-EC metabolism<sup>12</sup>. One peculiarity of epoxide-bearing substances is their instability due to the high reactivity of the epoxide ring towards nucleophiles including amines, thiols and hydroxyl groups that are found in bio-macromolecules and biological media<sup>13,14</sup>. Surprisingly, 5,6-ECs were found to be different from other epoxide-bearing substances in that they do not react spontaneously with nucleophiles, including amines, thus making 5,6-ECs extremely stable in biological media<sup>11,15</sup>.

Interestingly, several lines of evidence point to the existence of active metabolites of 5,6α-EC. Stereo-selective biosynthesis of 5,6α-EC occurs in the adrenal cortex by a currently unidentified cytochrome p450<sup>16</sup>. 5,6α-EC and its sulfated derivative 5,6 $\alpha$ -epoxy-5 $\alpha$ -cholestestan-3 $\beta$ -sulphate are modulators of the liver-X-receptor (LXR)<sup>9,17,18</sup>. 5,6 $\alpha$ -EC can also be metabolized  $3\beta_{,5\alpha}$ -dihydroxycholestan- $6\beta_{-yl}$ -S-glutathione<sup>19,20</sup>. into We reported that the aminolysis of  $5,6\alpha$ -EC, but not  $5,6\beta$ -EC, was possible under strong catalytic conditions and gave alkylaminooxysterols<sup>11,15,21</sup>. Among these steroidal alkaloids, dendrogenin A (DDA) (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1) was chemically synthesized<sup>21</sup> based on the hypothesis that DDA could be a natural metabolite in mammals and could result from the enzymatic conjugation of 5,6α-EC with histamine (His) at the level of the AEBS that binds both 5,6-ECs and His<sup>22</sup>. In vitro studies showed that DDA induced tumour cell re-differentiation and death in various tumour cells<sup>21</sup>. For example, we found that DDA triggered in vitro cell-cycle arrest in melanoma and breast cancer cells and activated melanogenesis and lactation, respectively, at lower concentrations than all trans-retinoic acids and Tam<sup>21</sup>. By contrast, the regioisomer of DDA, compound 17 (C17)<sup>21</sup> (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1), was inactive in these tests, thus showing a regio-selectivity of action for these compounds<sup>21</sup>. In the present study, we investigated whether DDA is a naturally occurring metabolite in mammals. More generally, this question was motivated by the fact that no steroidal alkaloid has been discovered in mammals, while some have been isolated from plants, amphibians and ancestral fishes<sup>23</sup>. These molecules, such as squalamine and other analogues that have been isolated from several tissues of the dogfish shark Squalus acanthias and the sea lamprey Petromyzon marinus, show important pharmacological and therapeutic functions. For example, squalamine exhibits host defence, anti-angiogenic and anti-tumour activities against different tumours<sup>24-27</sup>.

Here we describe the isolation and characterization of DDA in mammalian tissues and report the identification of its target and its anti-tumour activities in immunocompetent mice. The discovery of DDA reveals the presence of an uncharacterized metabolic pathway at the crossroads between cholesterol and His metabolism. Importantly, we showed that this metabolism could be deregulated during carcinogenesis.

#### Results

Identification of endogenous DDA in mouse brain. We first investigated whether DDA was detectable in mouse brain, a tissue rich in AEBS<sup>28</sup>. Homogenates of whole brain with the cerebella were extracted using organic solvent, and the extracts were analysed by liquid chromatography and nano-electrospray mass spectrometry (MS). The mass fragmentation profiles of synthetic DDA (sDDA) (Supplementary Fig. S2a-d and Supplementary Table S1) and its synthetic regioisomer C17 (Supplementary Fig. S3a-d and Supplementary Table S1) were used as references. Mass spectrometric analysis of the high-performance liquid chromatography (HPLC) fractions eluted at 18-21 min (Fig. 1b) showed the presence of a peak of m/z = 514, which corresponded to the expected mass of DDA (Fig. 1c). The MS/MS fragmentation of the m/z = 514 peak (Fig. 1d-f) resulted in profiles that were similar to sDDA (Supplementary Fig. S2a-d) and distinct from synthetic regioisomer C17 by the absence of the m/z = 367 fragment in MS (ref. 2) (Supplementary Fig. S3b) and Supplementary Table S1). These experiments showed that DDA was endogenously present in mouse brain extracts.

We next tested whether DDA was synthesized through an enzymatic process.  $[{}^{14}C]$ -5,6 $\alpha$ -EC or  $[{}^{14}C]$ -5,6 $\beta$ -EC were incubated with increasing concentrations of His and brain homogenate (Fig. 1g). We were able to measure the transformation of 5,6 $\alpha$ -EC and His into DDA at 37 °C (apparent  $K_m = 5.16 \pm$ 0.8 µM and apparent  $V_m = 0.12 \pm 0.04$  pmol per mg protein per min for His) (Fig. 1g and Table 1). In contrast, no reaction occurred between 5,6 $\alpha$ -EC and His in the absence of brain homogenate or when brain homogenate was boiled or treated with pronase (Table 1). Similarly, no reaction occurred when 5,6 $\beta$ -EC was incubated with His and brain homogenate at 37 °C (Table 1). These data established that DDA was generated through an enzymatic transformation of 5,6 $\alpha$ -EC with His, whereas 5,6 $\beta$ -EC was unreactive in similar conditions (Table 1 and Fig. 1h).

Quantification of DDA in mammalian tissues and tumours. Endogenous DDA was quantified through the establishment of a calibration curve (Supplementary Fig. S4) using deuterated DDA (d7-DDA) as an internal standard (Supplementary Fig. S5). DDA was present in mouse brain at a concentration of  $46 \pm 7$  ng per g of tissue (Table 2). Analysis of other tissues from mice and humans showed that DDA was present at concentrations ranging from  $66 \pm 9$  ng per g of tissue (human spleen) to  $263 \pm 49$  ng per g of tissue (mouse liver) (Table 2). The concentrations of DDA detected in human plasma and FBS were  $2.8 \pm 1$  and  $6.2 \pm 1.3$  nM, respectively (Table 2), indicating that DDA was also present in the circulation. Treatment of FBS with dextran-coated charcoal reduced the DDA content to below the limit of detection (Table 2). Because DDA was active against tumour cell lines at micromolar concentrations<sup>21</sup>, we quantified DDA in human and mouse cancer cells that were representative of several cancers. We used cell-culture conditions in which DDA was stripped from the serum with dextran-coated charcoal. In all the tumour cells analysed, DDA was below our limit of detection (Table 3 and Supplementary Table S2). In contrast, normal human mammary epithelial cells and normal human epidermal melanocytes produced DDA (Table 3). These data suggested a possible deregulation of DDA metabolism in tumour cells compared with normal cells. We subsequently quantified DDA in human breast tumours and in the adjacent normal tissue from patients. We determined that the mean amount of DDA was fivefold lower in human



**Figure 1 | Characterization and formation of DDA in mouse brain homogenates. (a)** Chemical structure of sDDA and synthetic C17. (**b**) HPLC profile from a total mouse brain extract. The extraction of sterols and HPLC separation were carried out as described in the 'Methods' section. Arrows indicate peaks corresponding to the authentic standards: His, sDDA, CT and 5,6-EC. The fractions collected between 18 and 21 min from HPLC purification of the mice brain extract were submitted to nano-electrospray ionization MS fragmentation. DDA (*m*/*z* 514) and deuterated d7-DDA (*m*/*z* 521) were fragmented simultaneously using the following parameters: parent ion mass, *m*/*z* 518; parent ion isolation width, *m*/*z* 8; and collision energy, 33%. MS<sup>3</sup> analysis of the DDA and d7-DDA fragments at *m*/*z* 496 (Supplementary Fig. S2) and 503 (Supplementary Fig. S5) was performed using the following parameters: parent ion isolation width, *m*/*z* 8; and collision energy, 45%. MS<sup>4</sup> analysis of the DDA and d7-DDA fragments at *m*/*z* 496 (Supplementers: parent ion mass, *m*/*z* 482; parent ion isolation width, 8 *m*/*z*; and collision energy, 50%. MS<sup>4</sup> quantification of DDA was calculated from the *m*/*z* 424/431 ratio obtained by averaging 100 spectra. (**c**) (MS<sup>1</sup>) resulted in a molecular ion of [M + H]<sup>+</sup> (*m*/*z* 514) obtained in MS<sup>1</sup>. (**d**) MS<sup>2</sup> fragmentation of the [M + H]<sup>+</sup> (*m*/*z* 514). (**e**) MS<sup>3</sup> fragmentation of the (*m*/*z* 478) peak obtained in MS<sup>3</sup>. (**g**) Michaelis-Menten plot of DDA formation. 2 μM of [<sup>14</sup>C]-5,6α-EC and His (0.5-200 μM) were incubated 10 min at 37 °C in the presence of mouse brain homogenate. Lipids were extracted and analysed by thin-layer chromatography, and DDA was quantified as described in the 'Methods' section. Experiments were repeated at least three times in duplicates. The data presented are the means ± s.e.m. of all experiments. (**h**) Schemes describing the transformation of 5,6α-EC and 5,6β-EC in the presence of His and brain extracts.

breast tumours ( $15 \pm 6$  ng per g of tissue) compared with matched normal tissue ( $72 \pm 28$  ng per g of tissue) (Fig. 2).

**DDA is a selective inhibitor of ChEH**. We previously reported that ligands of the AEBS were potent inhibitors of ChEH<sup>4</sup>, which is associated with their capacity to induce tumour cell differentiation and death<sup>5,9,10</sup>. We investigated whether DDA

could be an inhibitor of ChEH activity because we had previously shown that ring B oxysterols inhibited ChEH<sup>4</sup>. As shown in the thin-layer chromatography autoradiogram in Fig. 3a, the conversion of 5,6 $\alpha$ -EC into CT in human MCF-7 breast cancer cells was inhibited in a concentration-dependent manner by DDA with an IC<sub>50</sub> of 120 ± 20 nM, whereas C17 did not inhibit ChEH activity (Fig. 3a). Experiments on MCF-7 cell extracts<sup>4</sup> showed that the inhibition of ChEH by DDA was competitive because  $K_m$ 

Table 1   Determination of the enzymatic parameters for           DDA formation.						
5,6α-EC	5,6β-EC	His	Treatment of brain extracts	<i>К<sub>т</sub></i> (µМ) <sup>а</sup>	V <sub>max</sub> (pmol per mg protein per min) <sup>a</sup>	
+	_	+	37 °C	5.16 ± 0.8	$0.12 \pm 0.04$	
+	_	+	No brain extract	No reaction		
+	_	+	Boiled	No reaction		
+	_	+	Pronase	No reaction		
_	+	$^+$	37 °C	No reaction		
DDA, dendr	ogenin A; EC	, epoxy	/-cholesterol; His, histan	nine.		

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  s.e.m. values (see Methods).

Table 2   Quan	tification of endogenou	us DDA in mammalian
tissues and flu	ids.	

	DDA				
Tissue/fluids	ng per g tissue <sup>a</sup>	nM <sup>a</sup>	ng per mg protein <sup>a</sup>		
Brain (M)	46 ± 7	87 ± 14	1.06 ± 0.17		
Liver (M)	263 ± 49	485 ± 92	3.16 ± 49		
Lung (M)	36 ± 7	65 ± 13	0.54 ± 0.11		
Spleen (M)	112 ± 1.7	207 ± 31	1.51 ± 0.22		
Spleen (H)	66±9	126 ± 16	0.76 ± 0.10		
Fœtal serum (B)	3.1±0.6	6.2 ± 1.3	0.07 ± 0.01		
Charcoal-treated serum	N.M.	N.M.	N.M.		
Plasma (H)	$1.4 \pm 0.5$	$2.8 \pm 1.0$	$0.05 \pm 0.04$		

Table 3 | Quantification of endogenous DDA in normal and

<sup>a</sup>Mean ± s.e.m. values (see Methods).

tumor cells.		
Cell line	Cell type	DDA (ng per mg protein <sup>a</sup> )
HMEC	Normal mammary epithelial, human	$8.2 \pm 0.6$
MCF-7	Breast carcinoma, human	N.M.
TS/A	Breast carcinoma, mouse	N.M.
SKBr3	Breast carcinoma, human	N.M.
ZR75-1	Breast carcinoma, human	N.M.
BT474	Breast carcinoma, human	N.M.
HCC-1937	Breast carcinoma, human	N.M.
MDA-MB- 231	Breast carcinoma, human	N.M.
HEM	Normal epithelial melanocyte, human	$5.6 \pm 0.4$
SK-MEL-28	Melanoma, human	N.M.
B16F10	Melanoma, mouse	N.M.
SK-MEL-2	Melanoma, human	N.M.
A375	Melanoma, human	N.M
DDA, dendrogenin <sup>a</sup> Mean±s.e.m. valu	A; N.M., not measurable. Jes (see Methods).	

increased and  $V_{\text{max}}$  remained unchanged (Fig. 3b). The potency of DDA to inhibit ChEH in whole cells was compared with the natural ring B oxysterols,  $7\alpha$ -hydroxycholesterol ( $7\alpha$ -OHCh) and 7-ketocholesterol, that inhibited ChEH in microsomes from rat liver<sup>4</sup>. 25-OHCh that did not inhibit ChEH was used as control<sup>4</sup>.  $7\alpha$ -OHCh and 7-ketocholesterol inhibited ChEH in MCF-7 cells with IC<sub>50</sub> values that were 100-fold ( $12 \pm 2.9 \,\mu$ M) and 42-fold ( $5.09 \pm 1.4 \,\mu$ M) higher than DDA, respectively, whereas 25-OHCh was unable to inhibit ChEH in these conditions.



Figure 2 | Quantification of endogenous DDA in human breast tumours and normal tissues. Quantification of endogenous DDA from human breast tumours and adjacent normal tissues from 10 patients was carried out as described in Fig. 1 caption. Peaks m/z 496 (sDDA and C17) and 367 (C17) were used to determine the relative amounts of each molecule in samples before quantification. Each symbol represents the mean concentration of DDA determined in each normal or tumour sample that was analysed twice. The black lines indicate the group sample mean ± s.e.m., \*P<0.05 (Student's t-test).

We then determined the ability of DDA to inhibit ChEH in other cancer cell lines that responded to  $DDA^{21}$ . DDA inhibited ChEH activity with a high potency in all the cell lines tested, with an  $IC_{50}$  of  $284 \pm 70$  nM in murine mammary TSA cells, an  $IC_{50}$  of  $22 \pm 15$  nM in human melanoma SK-Mel-28 cells and an  $IC_{50}$  of  $252 \pm 81$  nM in murine melanoma B16F10 cells. In contrast, C17 was inactive against ChEH in all these cell lines. These data show that DDA is a direct inhibitor of ChEH and the most potent natural inhibitor of this enzyme to date. To determine if DDA was selective for ChEH compared with other epoxide hydrolases, DDA was tested on soluble epoxide hydrolase (sEH) and microsomal epoxide hydrolase (mEH) activities. DDA did not inhibit these enzymes, thus establishing its selectivity for ChEH (Supplementary Table S3).

DDA is not a modulator of the ER. Several AEBS ligands and oxysterols have been shown to modulate ER-dependent transcription<sup>29–31</sup>. We therefore examined whether DDA could function as an ER modulator using MELN cells, which are MCF-7 cells stably transfected with a plasmid that encodes an oestrogen-responsive promoter fused to the luciferase gene<sup>32</sup>. As shown in Fig. 3c, DDA did not stimulate the expression of luciferase in these cells and did not inhibit luciferase stimulation by 17β-estradiol (E2), whereas Tam, used as a positive control, completely inhibited luciferase expression. Therefore, DDA is not a modulator of the ER transcriptional activity, and its pharmacology is distinct from that of Tam.

**DDA exerts anti-tumour properties** *in vivo*. We previously established that DDA induced tumour cell differentiation and death *in vitro* in various tumour cell lines of different types of cancers, and in particular, DDA induced lactation characteristics in breast cancer cell lines and melanogenesis in melanoma cell lines<sup>21</sup>. Because DDA is endogenous in mammals, we assessed its anti-tumour activity against syngeneic tumours grafted onto a natural environment using immunocompetent mice. In a chemotherapeutic setting, mice were grafted subcutaneously (s.c.) with a melanoma (B16F10) or a mammary (TS/A) tumour and treated on the same day and subsequently with



**Figure 3 | DDA is the most potent natural inhibitor of ChEH.** MCF-7 cells were incubated with  $0.6 \,\mu$ moll<sup>-1</sup>[<sup>14</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC at 37 °C for 8 h with or without the indicated concentrations of DDA or C17. ChEH activity was assayed by measuring the conversion of [<sup>14</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC to [<sup>14</sup>C]-CT by thin-layer chromatography (TLC) and quantified by densitometric analysis. (a) On the left panel, a representative autoradiogram of a TLC run from three independent experiments; on the right panel, the dose-response curves of the inhibition of [<sup>14</sup>C]-CT formation measured by TLC with DDA (circle) or C17 (square) at the indicated concentrations. The curves represent the mean ± s.e.m. of three independent experiments and were used to calculate the IC<sub>50</sub>. (b) Modality of ChEH inhibition by DDA. The relationship between the conversion rates of 5,6 $\alpha$ -EC to CT and DDA concentrations is shown using 0.5, 1 and 5  $\mu$ M DDA with MCF-7 cell extracts. A double reciprocal plot of velocity versus [<sup>14</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC at the given DDA concentrations is presented. Experiments were repeated at least three times in duplicates. The data presented are the mean ± s.e.m. of all experiments. (c) Measurement of ER-dependent transcriptional activity in MELN cells. Cells were incubated with the solvent vehicle (control), 10 nM E2 or increasing concentrations of DDA with or without 10 nM 17 $\beta$ -estradiol (E2) or 1 $\mu$ M Tam with 10 nM E2. Experiments were repeated at least three times in duplicates. The data presented are the means ± s.e.m. of all experiments. *P*<0.001 compared with control cells.

DDA, or the indicated compounds or vehicle (control group). In B16F10-grafted mice, DDA at a concentration of  $0.37 \,\mu g \, kg^{-1}$ significantly inhibited tumour growth compared with the control (Fig. 4a), and prolonged animal survival: 40% survivors at day 50 compared with none in the control group (Fig. 4b). In TS/Agrafted mice, DDA treatment  $(0.37 \,\mu\text{g kg}^{-1})$  significantly reduced tumour growth (Fig. 4c) and prolonged animal survival up to 60% at day 50 (Fig. 4d) in comparison with the control group, whereas C17 did not significantly reduce tumour growth (Fig. 4c) or improve animal survival (Fig. 4d). A significant reduction in tumour volume was also observed with 5.6 mg kg  $^{-1}$ of Tam compared with the control group (Fig. 4c), however, Tam did not significantly improve animal survival compared with control animals (Fig. 4d). We then investigated the efficacy of DDA against established B16F10 and TS/A tumours (Fig. 4e,f, respectively). In this setting, immunocompetent mice were treated s.c. once a day with DDA or the indicated compounds or the vehicle (control group). As shown in Fig. 4e,  $3.7 \,\mu g \,kg^{-1}$  of DDA treatment resulted in a significant decrease in B16F10 tumour growth compared with the control group, whereas a

similar dose of C17 had no anti-tumour effect. A significant reduction in tumour volume was also obtained with 50 mg kg<sup>-1</sup> of dacarbazine. As shown in Fig. 4f, treatment of TS/A-grafted mice with 3.7  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> of DDA resulted in a significant reduction in tumour growth, whereas C17 and Tam did not significantly inhibit tumour growth compared with the control group.

DDA induces tumour cell differentiation and immune cell infiltration. Histological and immunohistochemical analyses of tumours isolated from control and DDA-treated animals showed that the inhibition of tumour growth by DDA was associated with increased tumour differentiation in both tumour models. Masson–Fontana's staining of B16F10 tumour sections showed there was an increased production of melanin (Fig. 5a), and TS/A tumour sections had an increased expression of milk fat globule (MFGE8)/lactadherin as assessed by immunohistochemistry and an increased accumulation of neutral lipid droplets stained with Oil Red O (ORO) (Fig. 5b). Similarly, cell differentiation was also observed after *in vitro* treatment of B16F10 and TS/A cells with


Figure 4 | DDA inhibited the growth of B16F10 melanoma and TS/A mammary tumours implanted into immunocompetent mice and enhanced animal survival. Immunocompetent mice were implanted s.c. with (a) B16F10 cells or (b,c) TS/A cells and animals (n = 10 mice per group) were treated every 5 days starting on the day of tumour implantation with the indicated doses of either dacarbazine (intraperitoneally (i.p.)), DDA (s.c.), C17 (s.c.), vehicle (s.c.) or Tam (i.p.). Animals were monitored for tumour growth (a,c), \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 (analysis of variance (ANOVA), Dunnett's post test), and survival (b,d), \*P < 0.05; \*\*P < 0.001 (log-rank tests). Immunocompetent mice were implanted s.c. with (e) B16F10 cells or (f) TS/A cells, and when the tumour reached a volume of 50-100 mm<sup>3</sup>, animals (n = 10 mice per group) were treated once per day with the indicated doses of dacarbazine (i.p.), DDA (s.c.), C17 (s.c.), vehicle (s.c.) or Tam (i.p.) and were monitored over time for tumour growth, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 (ANOVA, Dunnett's post tests). The mean tumour volume ± s.e.m is shown. The data are representative of three independent experiments.

DDA. In B16F10 cells treated with DDA for 24 h, the melanin content increased in a concentration-dependent manner up to 2.5 µM DDA (Supplementary Fig. S6a,b) and was associated with increased activity of tyrosinase, which is the enzyme that catalyses the initial and rate-limiting step of melanin production (Supplementary Fig. S6c). Moreover, TS/A cells treated for 24 h with 1 and 2.5 µM DDA showed a 2.4- and 3-fold increase in staining of neutral lipid droplets with ORO (Supplementary Fig. S7a,b) and a 7- and 9-fold increase in intracellular triglycerides (Supplementary Fig. S7c), respectively, compared with solvent vehicle-treated cells. In addition, MFGE8/lactadherin was increased after treatment with 2.5 µM DDA, as determined by immunostaining and flow-cytometry analysis (Supplementary Fig. S7d, left and right panels, respectively). Therefore, DDA treatment induces similar biological responses in vitro and in vivo. Interestingly, we observed that DDA-mediated tumour differentiation was accompanied by an increased infiltration of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells into B16F10 (Supplementary Fig. S8a) and TS/A (Supplementary Fig. S8b) tumours compared with the control groups, which indicated an enhanced recognition of the tumours by the immune system after DDA treatment.

#### Discussion

We describe here the isolation and structural characterization of DDA as the first endogenous steroidal alkaloid identified in

mammals. Using nano-electrospray MS after HPLC enrichment, we were able to measure DDA in various tissues. DDA was present at various concentrations, ranging from 46 to 263 ng per g of tissue in brain, lung, liver, spleen and breast tissues (between 65 and 485 nM). In comparison, the concentration of 5,6α-EC in mouse liver was reported to be 170 ng per g of tissue<sup>33</sup>, which indicates that DDA is present in the same concentration range as 5,6 $\alpha$ -EC in the liver. In plasma and serum, the concentration of DDA was between  $2.8 \pm 1.0$  and  $6.2 \pm 1.3$  nM. Numerous steroidal alkaloids have been isolated from plants (tomatidine in Solanum lycopersicum), amphibians (batrachotoxins in members of the genus Phyllobates and Dendrobates)<sup>23</sup> and fish (squalamine in S. acanthias and petromyzonamine in P. marinus)<sup>34,35</sup>. The structure of DDA is distinct from these steroidal alkaloids. DDA is a derivative of cholesterol, and the nitrogen source is from His, which is derived from the amino acid histidine. DDA is the first steroidal alkaloid reported to date in which the basic group is attached to ring B of the steroid backbone. We showed through pulse-chase metabolic studies that DDA is enzymatically formed in mammalian tissue extracts. It has to be noted that the reaction occurred only with 5,6α-EC, showing a stereoselectivity in 5,6-EC conjugation. Interestingly, this reaction showed the same selectivity as that we determined for 5,6-EC in chemical medium under catalytic conditions<sup>15</sup> (Supplementary Fig. S1). This shows that the presence of the  $\Delta 5$  double bond enables a stereospecific transformation to take place that leads to the biosynthesis of only one stereoisomer. This  $\Delta 5$  double bond



Figure 5 | DDA treatment induced in vivo differentiation of B16F10 and TS/A tumours implanted into immunocompetent mice. Histology of tumours resected from immunocompetent mice treated with vehicle (left panels) or DDA  $(3.7 \,\mu g \, \text{kg}^{-1})$  (right panels) and stained for specific markers of cell differentiation. Paraffin sections were stained with haematoxylin and eosin for histomorphological analyses. (a) B16F10 tumour sections from mice treated for 23 days were analysed for melanin production with Masson-Fontana staining (black labelling). (b) TS/A tumour sections from mice treated for 30 days were analysed for MFGE8 expression with a specific antibody (brown staining, indicated by arrows) and for neutral lipid production by ORO staining (red labelling, indicated by arrows). For lipid staining, frozen sections were fixed in 10% neutralbuffered formalin and then stained with ORO and counterstained with haematoxylin. Immunohistochemical staining was done on paraffinembedded tissue sections, using a specific hamster monoclonal to MFGE8 antibody (4  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Immunostaining of paraffin sections was preceded by an antigen retrieval technique by heating in 10 mM citrate buffer, pH 6, with a microwave oven twice for 10 min each. After incubation with the antibody for 1h at room temperature, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal anti-hamster immunoglobulin antibody followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA) and were then counterstained with haematoxylin. Negative controls were incubated in buffered solution without primary antibody. Magnification is  $\times$  200.

has been shown to contribute to the specific physicochemical properties of cholesterol that drive its membrane interactions<sup>36</sup>, to be required for the downregulation of hydroxymethyl glutaryl coenzyme  $A^{37}$  and for cell viability<sup>38</sup>. In addition, the accumulation of dihydrocholesterol (cholestanol), which lacks the  $\Delta 5$  double bond, is linked to severe genetic diseases, such as lathosterolosis associated with perinatal death<sup>8</sup> and cerebrotendinous xanthomatosis<sup>39</sup>; both syndromes lead to severe impairment in development. This supports our observation that an active metabolism of the  $\Delta 5$  double bond can generate products such as DDA with potent cell differentiation properties and that these products may be required for development.

Because we reported that other products of aminolysis from 5,  $6\alpha$ -EC can be produced and had different biological properties according to the nature of the biogenic amine that has been grafted<sup>21</sup>, it will be important to determine whether other steroidal alkaloids exist in mammals as well.

Pharmacological assays indicate that DDA is the most potent natural and selective inhibitor of ChEH found to date, with an IC<sub>50</sub> between 72 and 284 nM depending on the cell lines tested. This suggests that physiological tissue concentrations of DDA (between  $65 \pm 13$  and  $485 \pm 92$  nM) may control the activity of ChEH and the accumulation of 5,6-ECs. We recently reported that the inhibition of ChEH that leads to 5,6-ECs accumulation is likely to have a role in the chemopreventive and therapeutic effects of drugs that are of high clinical interest, such as Tam<sup>4,7,9</sup>. ChEH inhibition could represent a possible mechanism involved in the anti-cancer and animal survival action of DDA. Interestingly, the anti-tumour effects of DDA have been associated with an increased tumour infiltration of T lymphocytes and CD11c+ dendritic cells. Oxysterol metabolism has been linked to innate and adaptive immune responses through LXR signalling<sup>40,41</sup>, and 5,6 $\alpha$ -EC was reported to be a direct modulator of LXR<sup>17</sup>. In addition, 5,6α-EC is the substrate of cholesterol sulphotransferase SULT2B1b42,43, and the resulting  $5,6\alpha$ -EC-3-sulphate is a modulator of LXR<sup>9,11,18</sup>. A recent study showed that human and mouse tumours produce LXR agonists that inhibit CC chemokine receptor-7 expression on maturing DCs and the ability of DCs to initiate an immune T-cell response against tumours. Engineering the expression of SULT2B1b in these tumours reversed this process through inactivation of LXR agonists and resulted in tumour growth control, increased animal survival and inhibition of tumour immunoescape<sup>40</sup>. This work shed light on the importance of regulating LXR to mediate an anti-tumour response, immunity and animal survival. This could be achieved with DDA through the direct inhibition of ChEH, which generates LXR modulators<sup>9,11,18</sup>. Interestingly, we showed that DDA does not modulate the transcriptional activity of the ER compared with Tam. This excludes the risk of endometrial cancer that is increased with Tam treatment through an ER stimulationdependent mechanism<sup>12</sup>. Moreover, most immune cells, including myeloid progenitors and dendritic cells, express the ER, and oestrogen is recognized as a growth and/or differentiation factor for these cells<sup>44</sup>. By antagonizing the ER, Tam may depress immunity by impairing oestrogen-promoted dendritic differentiation and activation<sup>45</sup>, whereas DDA acts independently of the ER. We showed that DDA was not an inhibitor of mEH, another known target of Tam<sup>46</sup>, and of sEH, meaning that DDA is selective for ChEH over other known epoxide hydrolases.

Overall, these data suggest that DDA is an endogenous factor that may help to maintain cell integrity and differentiation. Consistent with these properties, DDA was measurable in normal cells but was undetectable in cancer cells of diverse origin. In addition, its level in human breast tumour samples was determined to be fivefold lower than in the adjacent normal tissue, suggesting that deregulation of DDA biosynthesis may occur during carcinogenesis.

We recently reported that  $5,6\alpha$ -EC is unreactive towards nucleophiles and extremely stable<sup>11,15,21</sup>, and its reaction with His was only possible under strong catalytic conditions to give sDDA<sup>21</sup>. Here we show that incubation of  $5,6\alpha$ -EC with His and brain homogenate at 37 °C is sufficient to produce DDA. In contrast, boiling or submitting brain homogenate to proteolysis completely abolished the formation of DDA. Together, these data indicate that the biosynthesis of DDA is catalysed by an enzyme that has yet to be identified. Its identification will be a major focus of our future efforts. Several lines of evidence indicate that cholesterol metabolism is involved in cancer development, aggressiveness and resistance to treatment<sup>47</sup>. In particular, it was reported that cholesterol metabolites such as cholesteryl fatty acid esters<sup>48</sup>, cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol metabolites<sup>7</sup>, biliary acids<sup>49</sup>, high and low density lipoproteins<sup>50</sup> and sex steroids such as estrogens and androgens can behave as tumour promoters<sup>51</sup>. The decreased level of DDA in tumours compared with adjacent tissues suggests that a default in DDA metabolism may contribute to tumour development, whereas DDA complementation induces tumour cell differentiation and an anti-tumour response. Thus, DDA appears as the first sterol metabolite with tumour-suppressor properties.

In conclusion, our results shed light on the existence of the first steroidal alkaloid described in higher vertebrates, including humans, with potentially important physiological functions in maintaining cell integrity, differentiation and possibly immune system surveillance. The anti-tumour effects of DDA, and its impact on animal survival, indicate that DDA may have clinical applications in the therapy and the chemoprevention of cancers.

Importantly, the discovery of DDA reveals the existence of a steroidal alkaloid metabolism in mammals at the crossroads of cholesterol and His metabolism, and opens new avenues of research.

#### Methods

Materials. Chemicals and solvents were from Sigma unless otherwise specified. [<sup>14</sup>C] cholesterol (58 Ci mol<sup>-1</sup>) was from GE Healthcare. [25,26,26,26,27,27,27-d7] cholesterol (99% D) was from Sigma-Aldrich. HPLC-MS grade acetonitrile was from Pierce. HPLC purifications were done on a Gilson HPLC or on a LC200 Perkin Elmer apparatus, equipped with a diode array UV or a beta radioactivity detector, using an Ultrasep C18 RP 100 column (Bischoff, Ge). Autoradiography experiments were done with GE Healthcare or Kodak phosphor screens, and images were generated with a STORM 840 Imager (Amersham Biosciences). A FACScalibur, Becton-Dickinson, was used for cytometry flux analyses. sDDA (5α-Hydroxy-6β-[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3β-ol) and C17 (5 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -(5-(2-amino-ethyl)-imidazol-1-yl]-cholestan-3 $\beta$ -ol) were prepared as previously described<sup>21</sup> and were 99% pure. Dacarbazine was from the Institute Claudius Regaud (France). 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)-urea, N-acetyl-S-farnesyl-L-cystein and 2-nonylsufanylpropionamide were prepared according to previously published procedures<sup>52,53</sup>. The antibodies used were from the following companies: the anti-MFGE8 used for in vitro studies was from Clinisciences (France) (clone 2422); the anti-MFGE8 used for immunohistology was from MBL International, MA (clone 18A2-G18); the anti-CD3 (ready to use) was from Dako (France); and anti-CD11c (clone N418) was from Tebu-bio (France).

**Animals**. Female C57BL/6 and BALB/c mice (6–8 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories (France). All mice were maintained in specific pathogen-free conditions and were included in protocols only following 2 weeks quarantine. All of the animal procedures for the care and use of laboratory animals were conducted according to the ethical guidelines of our institution and followed the general regulations governing animal experimentation.

**Cell culture**. TS/A cells were provided by Dr P.L. Lollini (Bologna, Italy)<sup>54</sup>. GL261 brain carcinoma cells were provided by Dr G Safrany (Budapest, Hungary)<sup>55</sup>. Normal human mammary epithelial cells were from Invitrogen (CA, USA) and were grown in the HuMEC ready medium. Normal human epidermal melanocytes were from the ECACC (Salisbury, UK) and were grown in the melanocyte growth medium provided by the ECACC. Other cells lines were from the American Tissue Culture Collection. All cell lines were grown in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. All culture media contained penicillin and streptomycin (50 Uml<sup>-1</sup> each) and 1.2 mM glutamine (3.2 mM glutamine for B16F10). MELN<sup>32</sup> and MCF-7 cells were grown in RPMI supplemented with 5% FBS. TS/A, A549, SK-N-SH, SH-SY5Y, SW620, HCT-8, HT29, SK-Mel-2, SK-Mel-28, U937 and NB4 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (FBS was heat-inactivated for SK-Mel-28 cells). SKBr3, MDA-MB-231, HCC-1937, ZR75-1, BT474, A375, B16F10, GL261, Neuro2A and U87 were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. KBS was replaced by steroid-free FBS 1 month before quantification of endogenous DDA.

**Preparation of tissues and cell extracts**. All human samples were collected with the approval of institutional review board of the Purpan University Hospital and of the Institut Claudius Regaud. Human plasma was recovered from buffy-coat

preparations from blood samples obtained at the Etablissement Français du Sang (Toulouse, France) from healthy donors. Organs from Balb/c mice (8 weeks old) were resected and kept at 4 °C to be prepared immediately. Normal and tumour human tissues obtained by surgical resection were stored frozen at - 80 °C and thawed in ice before use. Patients' clinical characteristics and tumour pathological features were obtained from the medical reports and followed the standard procedures in our institution. In the selected tumour or normal tissue samples, the percentage of tumour cells or normal epithelial cells was >50%. Tissues were homogenized at 4 °C in buffer A (50 mM Tris, 0.5% butylated hydroxytoluene  $(5 \text{ mg ml}^{-1})$ , 150 mM KCl, pH 7.4)  $(5 \text{ vol g}^{-1} \text{ of tissue})$  with a Polytron B homogenizer and centrifuged 5 min at 2,500 r.p.m. Homogenates and sera were diluted with buffer A to obtain samples at 10 mg protein per ml. To obtain cell extracts, cells were grown as described above and were washed with Ca<sup>2+</sup> - and Mg<sup>2+</sup>-free PBS. Three independent batches of 10<sup>7</sup> cells were prepared for each cell line. After harvesting, cells were homogenized in buffer A (vol/vol) to obtain samples at 5 mg protein per ml.

**Chemical synthesis.** [25,26,26,27,27,27-d<sub>7</sub>]-5α-Hydroxy-6β-[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3β-ol (d7-DDA): d7-DDA was synthesized according to the previously published procedure using [25,26,26,27,27,27-d7]-cholesterol instead of cholesterol<sup>21</sup>. The crude product was purified by column chromatography using triethylamine-deactivated silica and eluted with 0–10% methanol in an EtOAc gradient to give the expected product as a light yellow powder (3.5 mg, 35%). d7-DDA was further purified by HPLC using an acetonitrile gradient (40% B for 8 min, then to 100% B in 20 min; A was 95:5 water/acetonitrile, 0.1% TFA; B was 95:5 acetonitrile/water, 0.1% TFA) with a retention time of 18.5 min, a mass with the expected molecular ion (*m*/z 521.5 [M + H]<sup>+</sup>) and a purity >98%.

and a purity >98%.  $[4^{-14}C]$ -5 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 $\beta$ -ol ([1<sup>4</sup>C]-DDA): [1<sup>4</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC (58 Ci mol  $^{-1}$ ; 30 µCi; 0.52 µmol) and His (3 eq) in *n*BuOH (10 µl) were refluxed for 3 days. The mixture was evaporated under reduced pressure and resuspended in 40 µl of ethanol and then purified by HPLC to give [1<sup>4</sup>C]-DDA (7.0 µCi; 23%) with a purity >98%.

**Extraction, HPLC purification and MS analysis.** Tissues and cell homogenates were extracted as described previously<sup>6</sup>, and 0.1  $\mu$ Ci [<sup>14</sup>C]-DDAs were added in separate experiments for determination of the yield of DDA extraction. The samples were dried under Argon, dissolved in 200  $\mu$ l MeOH and passed through a C18 Sep-Pak cartridge (Waters). HPLC purification was carried out as described for sDDA. The 18–21 min fractions were dried *in vacuo* and stored at – 80 °C under argon until use. The percentage recovery of [<sup>14</sup>C]-DDA was 91 ± 6%. d7-DDA standard was added at a final concentration of 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. MS was performed using an LCQ ion-trap mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, CA) as previously described <sup>56</sup>. Samples were analysed in the positive ion mode.

**DDA neosynthesis assay.** The evaluation of DDA biosynthesis was done with mouse brain tissue extracts as described above using [<sup>14</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC and [<sup>14</sup>C]-5,6 $\beta$ -EC. Homogenates (280 µg of protein per sample) were suspended in 140 µl buffer A and 10 µl acetonitrile (6.7%) containing His (from 0.5 to 200 µM) and 2 µM [<sup>14</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC or [<sup>14</sup>C]-5,6 $\beta$ -EC and incubated at 37 °C for 10 min. In some conditions, mouse brain homogenate was absent or boiled or pronase-treated before incubation with 2 µM [<sup>14</sup>C]-5,6 $\alpha$ -EC and 100 µM His. The reaction was stopped by immersing the samples in ice-water, 0.5 ml of H<sub>2</sub>O was added and lipids were extracted using 1.5 ml chloroform/methanol (2:1).

**ChEH**, **sEH and mEH activity assays**. ChEH, N-terminal-epoxide hydrolase of sEH and mEH activities were carried out as described in de Medina *et al.*<sup>4</sup>, Rose *et al.*<sup>52</sup> and Morisseau *et al.*<sup>53</sup>, respectively.

Cell assays. Cells were plated on sterile coverslips in complete medium at 50% confluency and the next day treated for 24 h at 37 °C with the vehicle or DDA. Cells were then fixed with a methanol/acetone solution (1:1) for 15s and nuclei stained with propidium iodide. Immunostaining of MFGE8 was done exactly as described<sup>5</sup>. The slides were then washed with PBS and mounted with Moviol 4-88 reagent (Calbiochem). Cells were observed using confocal fluorescence microscopy (Leica DMRE). Images were prepared using a Zeiss LSM Image Viewer. For flowcytometry studies, cells (250,000) were seeded onto 100-mm plates and the next day treated for 24 h with vehicle or DDA at the indicated concentrations. Cells were then washed, fixed with 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with 0.05% saponin in PBS containing 1% BSA for 10 min. Cells were incubated at 4 °C for 1 h with primary antibodies against MFGE8 (1:500) or control isotypes (1:100) and then with secondary antibodies (1:500). Cells were then washed and analysed using flow cytometry. ORO staining<sup>5</sup>, lipid<sup>5</sup> and melanin<sup>57</sup> quantification, tyrosinase activity<sup>58</sup> and luciferase assays<sup>59</sup> were done exactly according to published procedures.

**Analysis of tumours.** Exponentially growing B16F10 and TS/A cells were collected, washed twice in PBS and resuspended in PBS (35,000 cells in 150 µl PBS). B16F10 and TS/A tumours were prepared by subcutaneous transplantation into the flanks of C57BL/6 or BALB/c mice, respectively. Animals were examined daily, and body weights were measured twice per week. In all the experiments, the tumour volume was determined by direct measurement with a caliper and was calculated using the formula (width<sup>2</sup> × length)/2. The Kaplan–Meier method was used to compare the mice survival. Tumours were resected at the indicated time and either frozen in liquid nitrogen or fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin for immunohistochemical analysis.

**Statistical analysis**. Tumour growth curves in animals were analysed for significance by analysis of variance with Dunnett's multiple comparison tests. Animal survival curves were analysed by log-rank test. In other experiments, significant differences in the quantitative data between the control and the treated group were analysed using the Student's *t*-test for unpaired variables. In the figures, \*, \*\* and \*\*\* refer to P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001, respectively, compared with controls (vehicle) unless otherwise specified. Prism software was used for all the analyses.

#### References

- Newman, J. W., Morisseau, C. & Hammock, B. D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 44, 1–51 (2005).
- Poirot, M., Silvente-Poirot, S. & Weichselbaum, R. R. Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 683–689 (2012).
- de Medina, P. *et al.* Importance of cholesterol and oxysterols metabolism in the pharmacology of tamoxifen and other AEBS ligands. *Chem. Phys. Lipids* 164, 432–437 (2011).
- de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 13520–13525 (2010).
- Payre, B. et al. Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. Mol. Cancer Ther. 7, 3707–3718 (2008).
- Kedjouar, B. *et al.* Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J. Biol. Chem.* 279, 34048–34061 (2004).
- Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. Curr. Opin. Pharmacol. 12, 696–703 (2012).
- Porter, F. D. & Herman, G. E. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. J. Lipid Res. 52, 6–34 (2011).
- Segala, G. *et al.* 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* (e-pub ahead of print 7 March 2013; doi:10.1016/j.bcp.2013.02.031).
- de Medina, P. *et al.* Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ.* 16, 1372–1384 (2009).
- 11. Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie* **95**, 622–631 (2013).
- Jordan, V. C. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogenreceptor modulators. *Nat. Rev. Cancer* 7, 46–53 (2007).
- Guengerich, F. P. Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 59–71 (2003).
- 14. Parker, R. E. & Isaacs, N. S. Mechanisms of epoxide reactions. *Chem. Rev.* 59, 737–799 (1959).
- Paillasse, M. R. et al. Surprising unreactivity of cholesterol-5, 6-epoxides towards nucleophiles. J. Lipid Res. 53, 718–725 (2012).
- Watabe, T. & Sawahata, T. Biotransformation of cholesterol to cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol via cholesterol alpha-epoxide (5alpha,6alphaepoxycholestan-3beta-ol) in bovine adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 254, 3854–3860 (1979).
- Berrodin, T. J. *et al.* Identification of 5{alpha},6{alpha}-epoxycholesterol as a novel modulator of liver x receptor activity. *Mol. Pharmacol.* 78, 1046–1058 (2010).
- Song, C., Hiipakka, R. A. & Liao, S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66, 473–479 (2001).
- 19. Meyer, D. J. & Ketterer, B. 5 alpha,6 alpha-Epoxy-cholestan-3 beta-ol (cholesterol alpha-oxide): A specific substrate for rat liver glutathione transferase B. *FEBS Lett.* **150**, 499–502 (1982).
- Watabe, T., Sawahata, T. & Horie, J. Evidence for the formation of a steroid S-glutathione conjugate from an epoxysteroid precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 469–475 (1979).
- de Medina, P., Paillasse, M. R., Payre, B., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. J. Med. Chem. 52, 7765–7777 (2009).

- Brandes, L. J., Bogdanovic, R. P., Cawker, M. D. & LaBella, F. S. Histamine and growth: interaction of antiestrogen binding site ligands with a novel histamine site that may be associated with calcium channels. *Cancer Res.* 47, 4025–4031 (1987).
- 23. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach (John Wiley & Sons, Ltd, New York, 2002).
- Herbst, R. S. et al. A phase I/IIA trial of continuous five-day infusion of squalamine lactate (MSI-1256F) plus carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 4108–4115 (2003).
- 25. Li, D., Williams, J. I. & Pietras, R. J. Squalamine and cisplatin block angiogenesis and growth of human ovarian cancer cells with or without HER-2 gene overexpression. *Oncogene* **21**, 2805–2814 (2002).
- Williams, J. I. et al. Squalamine treatment of human tumors in nu/nu mice enhances platinum-based chemotherapies. Clin. Cancer Res. 7, 724–733 (2001).
- Sills, Jr. A. K. et al. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. *Cancer Res.* 58, 2784–2792 (1998).
- Gray, J. M. & Ziemian, L. Antiestrogen binding sites in brain and pituitary of ovariectomized rats. *Brain Res.* 578, 55–60 (1992).
- Umetani, M. et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. Nat. Med. 13, 1185–1192 (2007).
- Sato, H. *et al.* Oxysterol regulation of estrogen receptor alpha-mediated gene expression in a transcriptional activation assay system using HeLa cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1790–1793 (2004).
- de Medina, P., Favre, G. & Poirot, M. Multiple targeting by the antitumor drug tamoxifen: a structure-activity study. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 4, 491–508 (2004).
- 32. de Medina, P. *et al.* The prototypical inhibitor of cholesterol esterification, Sah 58-035 [3-[decyldimethylsilyl]-n-[2-(4-methylphenyl)-1-phenylethyl] propanamide], is an agonist of estrogen receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 139–149 (2006).
- Schroepfer, Jr. G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554 (2000).
- 34. Sorensen, P. W. et al. Mixture of new sulfated steroids functions as a migratory pheromone in the sea lamprey. Nat. Chem. Biol. 1, 324–328 (2005).
- 35. Moore, K. S. *et al.* Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 1354–1358 (1993).
- Beattie, M. E., Veatch, S. L., Stottrup, B. L. & Keller, S. L. Sterol structure determines miscibility versus melting transitions in lipid vesicles. *Biophys. J.* 89, 1760–1768 (2005).
- Lund, E. & Bjoerkhem, I. Down-regulation of hepatic HMG-CoA reductase in mice by dietary cholesterol: Importance of the DELTA.5 double bond and evidence that oxidation at C-3, C-5, C-6, or C-7 is not involved. *Biochemistry* 33, 291–297 (1994).
- Xu, F. et al. Dual roles for cholesterol in mammalian cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 14551–14556 (2005).
- Björkhem, I. & Hansson, M. Cerebrotendinous xanthomatosis: An inborn error in bile acid synthesis with defined mutations but still a challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 46–49 (2010).
- Villablanca, E. J. et al. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. Nat. Med. 16, 98–105 (2010).
- 41. Bensinger, S. J. et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. Cell **134**, 97–111 (2008).
- Fuda, H., Javitt, N. B., Mitamura, K., Ikegawa, S. & Strott, C. A. Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. J. Lipid Res. 48, 1343–1352 (2007).
- Chen, W., Chen, G., Head, D. L., Mangelsdorf, D. J. & Russell, D. W. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5, 73–79 (2007).
- Nalbandian, G. & Kovats, S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol. Res.* 31, 91–106 (2005).
- Nalbandian, G., Paharkova-Vatchkova, V., Mao, A., Nale, S. & Kovats, S. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J. Immunol.* 175, 2666–2675 (2005).
- Mesange, F. et al. Microsomal epoxide hydrolase of rat liver is a subunit of theanti-oestrogen-binding site. Biochem. J. 334(Pt 1): 107–112 (1998).
- 47. Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 673–676 (2012).
- Paillasse, M. R. *et al.* Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. *J. Lipid Res.* 50, 2203–2211 (2009).
- Baptissart, M. et al. Bile acids: from digestion to cancers. Biochimie 95, 504–517 (2013).
- 50. Danilo, C. & Frank, P. G. Cholesterol and breast cancer development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 677–682 (2012).
- Folkerd, E. J. & Dowsett, M. Influence of sex hormones on cancer progression. J. Clin. Oncol. 28, 4038–4044 (2010).

## ARTICLE

- Rose, T. E. *et al.* 1-Aryl-3-(1-acylpiperidin-4-yl)urea inhibitors of human and murine soluble epoxide hydrolase: structure-activity relationships, pharmacokinetics, and reduction of inflammatory pain. *J. Med. Chem.* 53, 7067–7075 (2010).
- Morisseau, C. *et al.* Development of metabolically stable inhibitors of mammalian microsomal epoxide hydrolase. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 951–957 (2008).
- Nanni, P., de Giovanni, C., Lollini, P. L., Nicoletti, G. & Prodi, G. TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 1, 373–380 (1983).
- Szatmari, T. et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. Cancer Sci. 97, 546–553 (2006).
- Vantourout, P. *et al.* Specific requirements for Vgamma9Vdelta2 T cell stimulation by a natural adenylated phosphoantigen. *J. Immunol.* 183, 3848–3857 (2009).
- 57. Lee, J. et al. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4hydroxy-3(2H)-furanone. Br. J. Dermatol. 157, 242–248 (2007).
- Ando, H. *et al.* Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J. Lipid Res.* 40, 1312–1316 (1999).
- 59. de Medina, P. *et al.* Auraptene is an inhibitor of cholesterol esterification and a modulator of estrogen receptors. *Mol. Pharmacol.* **78**, 827–836 (2010).

#### Acknowledgements

This work was funded by the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale', the 'Université de Toulouse III', the 'Institut Claudius Regaud', the 'Ministère Français de la Recherche' through a 3-year doctoral fellowship (G.S.), the 'Association pour la Recherche contre le Cancer' though a 1-year doctoral fellowship (G.S.), Partial funding came from the 'Fondation de France' grant 20349, the 'National Institute on Environment Health Sciences' Grant PA2 ES011269 and R01 ES002710CM. B.D.H. is a George and Judy Marcus Senior Fellow of the American Asthma Foundation. We thank the staff of the tumour bank of Claudius Regaud Institute (Dr P. Rochaix and L. Puydenus) for their technical support and helpful discussions, and F. Capilla for IHC technical support.

#### Author contributions

M.P. and S.S.-P. developed the concept, designed the study, wrote the paper, and contributed equally to the work. P.D.M. and M.R.P. did the synthesis and the structural characterization of compounds. P.D.M. performed and analysed the measurement of ChEH and the modulation of ER activity. M.R.P., M.V. and F.P. did the purification of DDA and conducted the MS experiments. M.P. did the fragmentation analysis on MS. P.D.M., M.R.P., G.S., L.M. and S.S.-P. did the cell cultures, the *in vitro* characterizations of DDA effects and analysed data. L.M. and S.S.-P. conducted the *in vivo* experiments. S.S.-P. Analysed the data. F.D. participated in collecting and analysing the patient samples. M.L.T. participated in performing and interpreting experiments on patient samples and in writing the corresponding text in the manuscript. T.A.S. performed the IHC. T.A.S and S.S.-P. analysed the data. T.F. did the statistical analysis. All the authors participated in writing the 'Methods' section of their corresponding work contribution.

#### Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/ naturecommunications

**Competing financial interests:** P.D.M., M.R.P. and L.M. are employees of the company Affichem of which S.S.-P. and M.P. are founders. The remaining authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/ reprintsandpermissions/

How to cite this article: de Medina, P. *et al.* Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat. Commun.* 4:1840 doi: 10.1038/ncomms2835 (2013).





Supplementary Figure S1 | Scheme describing the chemical synthesis of DDA under catalytic conditions. The reaction of 5,6 $\alpha$ -EC with histamine was possible in the presence of a catalyst to give DDA as the major product and C17 as a minor product <sup>21</sup>.



**Supplementary Figure S2 | NanoESI fragmentation of synthetic DDA (sDDA).** (a) NanoESI Mass spectrometry fragmentation (MS<sup>1</sup>) profile of sDDA and chemical structure of sDDA. (b) MS<sup>2</sup> fragmentation of the [M+H]<sup>+</sup> (m/z 514) peak obtained in MS<sup>1</sup>. (c) MS<sup>3</sup> fragmentation of the (m/z 496) peak obtained in MS<sup>2</sup>. (d) MS<sup>4</sup> fragmentation of the (m/z 478) peak obtained in MS<sup>3</sup>.



Supplementary Figure S3 | NanoESI fragmentation profiles of synthetic C17 (sC17). (a) nanoESI Mass spectrometry fragmentation (MS<sup>1</sup>) profile of C17 and chemical structure of C17. (b) MS<sup>2</sup> fragmentation of the [M+H]<sup>+</sup> (m/z 514) peak obtained in MS<sup>1</sup>. (c) MS<sup>3</sup> fragmentation of the (m/z 496) peak obtained in MS<sup>2</sup>. (d) MS<sup>4</sup> fragmentation of the (m/z 478) peak obtained in MS<sup>3</sup>.



**Supplementary Figure S4 | Calibration curve for quantification of DDA.** MS<sup>4</sup> nanoESI mass spectrometry was used to determine *m/z* 424 (DDA) (Figure S2) over 431 (d7-DDA (Figure S5) used as internal standard (IS) ratios. Increasing concentrations of DDA were used with a constant IS concentration to obtain the calibration curve. The calibration curve was constructed using a quadratic regression with 1/x weighting that was linear in the concentration range of DDA. HPLC fractions excluding the 18-21 min HPLC fractions from mouse brain homogenates, which lack traces of DDA, were used as a quality control matrix. The 18-21 min HPLC fractions from tissue and cell homogenates containing d7-DDA were then submitted to nano-ESI analysis. Samples from three separate experiments were prepared and each sample was analyzed twice.



**Supplementary Figure S5 | NanoESI fragmentation profiles of d7-DDA.** (a) nanoESI Mass spectrometry fragmentation (MS<sup>1</sup>) profile of d7-DDA and chemical structure of d7-DDA. (b) MS<sup>2</sup> fragmentation of the  $[M+H]^+$  (*m*/*z* 521) peak obtained in MS<sup>1</sup>. (c) MS<sup>3</sup> fragmentation of the (*m*/*z* 503) peak obtained in MS<sup>2</sup>. (d) MS<sup>4</sup> fragmentation of the (*m*/*z* 485) peak obtained in MS<sup>3</sup>.



Supplementary Figure S6 | DDA induces B16F10 cell differentiation *in vitro*. Cells were treated for 24 h with solvent vehicle or the indicated concentrations of DDA. (a) DDA stimulated melanin biosynthesis in cells in a concentration-dependent manner and the appearance of melanin containing vesicles (b) and increased the tyrosinase activity (c). The melanin content is expressed as the percentage of the control. Pellets of  $3.10^6$  cells were used to measure the melanin content or tyrosinase activity spectrophotometrically. The tyrosinase activity was measured during the first 10 min, and a correction for auto-oxidation of L-DOPA was made using L-DOPA in the enzyme buffer in the absence of cell lysates. Results are the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate.



**Supplementary Figure S7 | DDA induces TS/A cell differentiation** *in vitro.* TS/A cells were treated for 24 h with the solvent vehicle or the indicated concentrations of DDA. Neutral lipids were stained with ORO and (a) quantified after extracting the ORO-stained cells by measuring the absorbance at 492 nm and (b) ORO-stained cells were observed with light microscopy (×25) after counterstaining with Mayer's hematoxylin. (c) triglycerides were quantified. (d) MFGE8 was analyzed by confocal fluorescence microscopy (×63) using an anti-MFGE8 antibody and a fluorescein-labeled anti-mouse secondary antibody and the nuclei were stained with propidium iodide (left panel). MFGE8 expression was quantified by flow cytometry with an anti-MFGE8 antibody (white peaks) or control isotype (grey peaks). Values indicated in the panel are the percentage of cells positive for the antibody relative to the isotype staining. Data are representative of three independent experiments.

а



Supplementary Figure S8 | DDA induces intra-tumour immune cell infiltration in B16F10 and TS/A tumours implanted into immunocompetent mice. Histology of established tumours resected from immunocompetent mice treated with solvent vehicle (left panels) or DDA (3.7 µg/kg) (right panels). (a) B16F10 tumour sections from mice treated for 23 days and (b) TS/A tumours from mice treated for 30 days were analyzed for T lymphocytes (CD3) and DCs (CD11c) (brown staining) tumour infiltration. Paraffin-embedded tissue sections were incubated with the target retrieval solution S1700 (Dako) in a 95°C water bath for 40 min and then revealed using anti-CD3 antibodies to label T lymphocytes. anti-CD11c (1:25) that was used on frozen sections to label DCs in the cellular infiltrates. Following primary antibody incubation, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal secondary antibodies, followed by incubation with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA). Diaminobenzidine (DAB) chromogen solution was used to visualize the signal, and the sections were then counter-stained with haematoxylin.

	sDDA	sC17		
m/z	Relative abundance (%)			
514	6.5	2.6		
497		28.3		
496	100	7.6		
478	12.3	2.2		
396	0.7			
385		49.5		
368	1.5			
367		100		
159		12.6		

Supplementary Table S1 | Mass spectrometry fragmentation profile of the m/z 514 molecular ion of sDDA and synthetic C17.

Supplementary Table S2 | Quantification of endogenous DDA in tumour cells. Quantification of DDA was done by nanoESI mass spectroscopy, by determining the under peak-area ratio of DDA (m/z 424) and d7-DDA (m/z 431) used as internal standard. These peaks were obtained on MS<sup>4</sup> spectra (Figure S2 and S4) and quantification was achieved according to the equation obtained from the calibration curve drawn on Figure S5. N.M.: not measurable. Studies were done with three different samples analyzed twice.

Cell line	Cell type	[DDA]	
		ng/mg prot	
A549	Lung carcinoma, human	N.M.	
SK-N-SH	Neuroblastoma, human	N.M.	
SH-SY5Y	Neuroblastoma, human	N.M.	
Neuro2A	Neuroblastoma, mouse	N.M.	
U87	Glioma, human	N.M.	
GL261	Glioma, mouse	N.M.	
U937	Monocyte leukemia, human	N.M.	
NB4	Promyelocytic leukemia, human	N.M.	
KG1	Acute myeloid leukemia, human	N.M.	
HT29	Colon carcinoma, human	N.M.	
HCT-8	Colon carcinoma, human	N.M.	
SW 620	Intestinal carcinoma, human	N.M.	

Supplementary Table S3 | Impact of DDA and C17 on mEH and sEH activity. Human sEH and rat mEH inhibition was tested by increasing concentrations of 1trifluoromethoxyphe nyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl) urea (TFPPU), a selective inhibitor of sEH; 2-nonylsulfanyl-propionamide (2-NSP), a selective inhibitor of mEH; DDA and C17. The IC<sub>50</sub> corresponds to the concentration required to inhibit 50 % of the enzyme activity as described in the "Methods" section.

Compound	sEH	mEH		
	IC <sub>50</sub> (μΜ)*			
TFPPU	0.004 ± 0.001	-		
2-NSP	-	$6.5 \pm 0.8$		
DDA	> 100	> 100		
C17	> 100	> 100		

\*Mean ± S.E.M. values (see Methods)

## **Discussion**

Les travaux de l'équipe, ont démontré par la synthèse chimique la possibilité d'existence de nouveaux métabolites issus de la conjugaison des 5,6 $\alpha$ -EC et des amines, dans des conditions catalytiques. Un des produits ainsi formés, la DDA, a montré des résultats très encourageant du fait de sa capacité à induire la différenciation cellulaire de différentes lignées cancéreuses (de Medina et al., 2009) et de progéniteurs neuronaux (Khalifa et al. 2014). Du fait de la présence d'un site de liaison de l'histamine sur AEBS, nous avons émis l'hypothèse que la DDA pouvait être produite naturellement dans différents tissus ou types cellulaire. La production de la DDA de synthèse et d'un analogue deutéré nous a permis de mettre au point une méthode de purification par HPLC ainsi qu'une méthode de dosage par spectrométrie de masse. L'utilisation de cette méthode appliquée à des homogénats de tissus de mammifères, nous a permis de découvrir cette molécule chez les mammifères.

En effet, nous avons développé une méthode analytique de quantification de la DDA, grâce à la synthèse de DDA deutéreé, utilisée comme étalon interne. L'injection, en spectrométrie de masse nano-electrospray, de la fraction enrichie en DDA obtenue par HPLC, nous permet de la mesurer dans différents extraits biologiques à partir de sa fragmentation MS/MS caractéristique. La concentration de DDA est comprise entre 65 et 485nM pour les tissus humains ou murins, testés : poumon, cerveau, rate, sein, et foie ; alors que la concentration dans le plasma (humain) et le sérum (bovin) est de 3 et 6nM respectivement. De manière intéressante, la DDA n'est pas présente dans les différentes lignées cellulaires de cancers du sein et de mélanomes testés, mais a pu être dosée dans des cellules mammaires épithéliales normales humaines et dans des mélanocytes épithéliaux normaux humains, respectivement  $8,2 \pm 0,6$  et  $5,6 \pm 0,4$ ng par mg de protéines. La diminution (d'un facteur 5) de sa concentration dans des tumeurs de patientes atteintes de cancers du sein, comparée aux tissus normaux adjacents, suggère qu'un défaut de production de la DDA et donc une dérégulation du métabolisme de la ChEH, pourrait contribuer au développement de tumeurs.

La production de DDA, à partir de 5,6 $\alpha$ -EC et d'histamine, n'est pas spontanée car elle nécessite un catalyseur chimique ou un extrait tissulaire, ce qui suggère l'existence d'une enzyme responsable de sa production. Des expériences de dénaturation des extraits tissulaires par la chaleur ou par une protéase suggèrent que cette enzyme est probablement de nature protéique, puisqu'une perte de production de DDA a été observée dans ces conditions. Cette réaction présente une sélectivité de substrat, puisqu'aucune réaction n'est observée avec le 5,6 $\beta$ -EC. Des études d'inhibition de la ChEH par la DDA ont été conduites, car nous avions déterminé que les oxystérols portant une fonction oxygénée en position 6 ou 7 étaient des inhibiteurs de cette enzyme (de Medina et al, PNAS, 2010), et la DDA est un oxystérol modifié en position 5 et 6. Ces études on montré que la DDA est un inhibiteur de la ChEH et qu'elle est l'inhibiteur naturel le plus puissant, parmi les oxystérols testés. En effet, sur cellules MCF7 intactes, l'IC<sub>50</sub> est de 120 ±20nM pour la DDA et de 5.09 ±1.4 ou de 12 ± 2.9µM µM pour le 7-KC et 7 $\alpha$ -OHC respectivement. La ChEH appartient à la famille des Epoxides hydrolases qui comptent la sEH (soluble Epoxyde Hydrolase) et la mEH (microsomal Epoxyde Hydrolase) (Kodani & Hammock 2015). Nous avons établi que la DDA n'inhibe pas ces enzymes démontrant une sélectivité de la DDA pour la ChEH dans cette famille.

La concentration active de la DDA pour inhiber la ChEH est voisine des concentrations tissulaires déterminées, suggérant que les concentrations physiologiques de la DDA peuvent permettre un contrôle de l'activité ChEH et induire l'accumulation de 5,6-EC. L'équipe à montré que l'inhibition de ChEH par le Tam, conduit à l'accumulation de 5,6-EC, ce qui induit le contrôle de la pousse tumorale et de la différenciation cellulaire. Ainsi, l'inhibition de la ChEH pourrait être un des mécanismes associés aux effets anti-tumoraux de la DDA.

Le traitement à la DDA diminue considérablement la croissance des tumeurs implantées en sous-cutané chez des souris immunocompétentes, et leur survie est augmentée. Ces résultats suggèrent que la DDA puisse être un métabolite suppresseur de tumeurs dont le métabolisme est affecté au cours de l'oncogenèse. Ses propriétés et la diminution de sa présence dans les tumeurs suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité et la différenciation cellulaire.

Des analyses histologiques de tumeurs implantées chez des souris immunocompétentes traitées avec la DDA montrent une induction de la différentiation des cellules cancéreuses constituant la tumeur. Ces résultats sont cohérents avec des expériences réalisées *in vitro*. Nous avons également observé que les effets anti-tumoraux et différenciants de la DDA sont associés à l'infiltration de cellules dendritiques et de lymphocytes T au sein des tumeurs. Ceci favoriserait une réponse immunitaire anti-tumorale. Cette observation pourrait être expliquée par le ciblage des LXR par le 5,6-EC ou son métabolite sulfaté par la SULT2B1b, le 5,6 $\alpha$ -EC-3-sulphate. Il a été montré que ces molécules sont impliquées dans les effets de la DDA et sont des modulateurs des LXR (Segala et al. 2013; Poirot & Silvente-Poirot 2013), qui ont été montrés comme étant impliqués dans le contrôle de l'immunité (Villablanca et al. 2010). A la différence du Tam, nous avons montré que la DDA n'était pas un modulateur du ER $\alpha$ . La

plupart des cellules immunitaires expriment le ER, comme les cellules dendritiques, ce qui implique que le Tam pourrait réprimer l'immunité par son interaction avec ce récepteur dans les cellules du système immunitaire (Nalbandian et al. 2005). L'absence de modulation de ER $\alpha$  par la DDA suggère que la DDA n'induirait pas de risque de développement des cancers de l'endomètre, qui constitue un des effets indésirables du Tam chez le patient.

En conclusion, ces travaux ont permis la découverte de la DDA chez les mammifères et de caractériser quelques unes de ses propriétés biologiques. Les possibles propriétés physiologiques importantes de la DDA, qui sont, en plus des effets anti-tumoraux et de différenciation cellulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire, et la surveillance du système immunitaire ; ainsi que son appartenance à une classe de molécules, les alcaloïdes stéroïdiens, encore jamais retrouvés au sein de ces organismes, ouvrent de nouveaux champs de recherche de la cancérologie à la biologie du développement, en passant par les maladies neuro-dégénératives. La diminution de sa concentration au cours de l'oncogenèse et son potentiel anticancéreux, rendent compte d'une dérégulation du métabolisme de la ChEH dans les cancers, mais aussi de l'importance de la découverte de cette nouvelle molécule naturelle dans la compréhension de la biologie humaine et de la physiopathologie des cancers. La possible utilisation de la DDA en tant que traitement et agent de prévention des cancers du sein, pourrait permettre une des avancées majeures et des plus originales, dans la lutte contre le cancer.

# Article 2 :

# Synthèse du 6-oxo-cholestan-3β,5α-diol en une seule étape

Maud Voisin, Sandrine Silvente-Poirot & Marc Poirot

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014

L'équipe à montré que le métabolisme du cholestérol centré sur la Cholestérol Epoxyde Hydrolase (ChEH) était impliqué dans les cancers (de Medina, Paillasse, et al. 2010a). La ChEH catalyse l'hydrolyse des cholestérol-5,6-époxydes (5,6-EC) en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ triol (CT) (Silvente-Poirot & Poirot 2012a), qui est caractérisé comme étant un génotoxique indirect (Cheng et al. 2005) L'équipe a montré que des composés anticancéreux comme le Tamoxifène, molécule largement utilisée pour le traitement et la prévention des cancers du sein, ou la DDA (cf Article 1), inhibent la ChEH et conduisent à l'accumulation de 5,6-EC dans les cellules tumorales (de Medina, Paillasse, et al. 2010a; Sola et al. 2013). L'accumulation des 5,6-EC est responsable de la re-différenciation des cellules cancéreuses et des effets cytotoxiques des inhibiteurs de la ChEH (Segala et al. 2013; Poirot & Silvente-Poirot 2013). Des données préliminaires de l'équipe, ont montré que le CT pouvait être transformé en 6-oxo-cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO), dans les cellules cancéreuses et qu'il était capable d'augmenter la prolifération et la croissance tumorale (Silvente-Poirot et al. 2012; Silvente-Poirot & Poirot 2012a). Il est donc très intéressant d'étudier le métabolisme de ces composés.

J'ai donc développé une méthode simple de synthèse chimique du CT et de l'OCDO non marqués, radiomarqués au 14C ou deutérés, en m'appuyant sur des données de la littérature décrivant la synthèse de dérivés acétylés du CT ou de l'OCDO, grâce à l'utilisation d'acide périodique, HIO<sub>4</sub> (Graber et al. 1956). Pour étudier ce métabolisme et en particulier l'identification de nouvelles enzymes, il était nécessaire de développer une méthode de synthèse du CT et de l'OCDO marqués au deutérium ou par un isotope radioactif car ces molécules marquées ne sont pas commerciales.

Contents lists available at ScienceDirect



**Biochemical and Biophysical Research Communications** 

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



CrossMark

## One step synthesis of 6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol

### Maud Voisin, Sandrine Silvente-Poirot, Marc Poirot\*

INSERM UMR 1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France Université de Toulouse III, Toulouse, France Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

#### ARTICLE INFO

Article history: Available online 4 February 2014

Keywords: Oxysterols Cancer Cholestanetriol OCDO Radiolabelled

#### ABSTRACT

Cholesterol metabolism has been recently linked to cancer, highlighting the importance of the characterization of new metabolic pathways in the sterol series. One of these pathways is centered on cholesterol-5,6-epoxides (5,6-ECs). 5,6-ECs can either generate dendrogenin A, a tumor suppressor present in healthy mammalian tissues, or the carcinogenic cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) and its putative metabolite 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (OCDO) in tumor cells. We are currently investigating the identification of the enzyme involved in OCDO biosynthesis, which would be highly facilitated by the use of commercially unavailable [<sup>14</sup>C]-cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and [<sup>14</sup>C]-6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol. In the present study we report the one-step synthesis of [<sup>14</sup>C]-cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and [<sup>14</sup>C]-6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol by oxidation of [<sup>14</sup>C]-cholesterol with iodide metaperiodate (HIO<sub>4</sub>).

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Sterols are unique lipids comprised of a rigid tetracyclic core linked to a flexible hydrocarbon side chain and are facile templates for oxygenation to oxysterols, through both enzymatic and nonenzymatic routes. Oxysterols, like steroid hormones, have specific physiological properties and deregulation of their metabolism is associated with several pathologies including cancer [1–6]. Some oxysterol metabolic pathways represent novel targets for the development of anticancer agents [2,5,7]. Working on cholesterol (1) metabolism and cancer, our team has recently established the molecular identification of the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) [8]. ChEH hydrolyzes 5,6α-epoxy-cholesterol  $(5,6\alpha-EC (2a))$  and  $5,6\beta$ -epoxy-cholesterol  $(5,6\beta-EC (2b))$  into cholestane- $3\beta$ , $5\alpha$ , $6\beta$ -triol (CT (**3**)) [9]. We found that 5, $6\alpha$ -EC was enzymatically metabolized into dendrogenin A (5\alpha-hydroxy-6\beta-[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3β-ol) in the presence of histamine [4], and dendrogenin A was found to be produced by several mammalian tissues, to display tumor suppressor properties [4,10] and to stimulate neural stem cell differentiation [11]. We showed that important drugs with anticancer and chemopreventive properties like the antiestrogen tamoxifen and natural products such as docosahexaenoic acid inhibit ChEH which led to the accumulation of 5,6-ECs in tumor cells [4,8,9,12–15]. We

E-mail address: marc.poirot@inserm.fr (M. Poirot).

subsequently reported that the accumulation of 5,6-ECs was responsible for the re-differentiation of cancer cells and the cytotoxic properties of ChEH inhibitors [12,13,15]. On the other hand, these drugs inhibit the production of CT (**3**) and its product of oxidation, 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO) (**4**) (Fig. 1). **3** was reported to be genotoxic [16], while **4** was reported to display tumor promoting properties [17], to inhibit natural killer cell mediated cytotoxicity [18], to inhibit the formation of E-rosette [19] and the cytotoxic activity of T lymphocytes [20]. It is thus important to study the metabolism of compounds **3** and **4** and to determine whether they are produced through an enzymatic process. This prompted us to develop a simple method for the synthesis of **3** and **4** in their unlabeled and <sup>14</sup>C-labeled forms to study and identify the enzyme that catalyzed the transformation of **3** into **4**.

#### 2. Materials and methods

5,6α-EC, 5,6β-EC were synthesized as reported before [8,10]. CT and OCDO were synthesized as reported in the present study. [<sup>14</sup>C]-cholesterol was supplied by Perkin–Elmer and all other reagents were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). All commercially available chemicals were used without further purification. The progress of the reactions was monitored by TLC using silica gel aluminum sheets and detection with 50% methanolic H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Atmospheric pressure column chromatography was performed on Merck-grade 7734 70–230 mesh silica and reversed-phase HPLC on a Perkin–Elmer LC200 series with Ultrasep ES 100 RP 18, 6.0 μm; Bischoff, Leonberg, Germany. Melting points

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Inserm UMR 1037, CRCT, Institut Claudius Regaud, 20, rue du pont Saint Pierre, F-31052 Toulouse, France. Fax: +33 (0)561424631.



Fig. 1. Oxidation of cholesterol by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can give 5,6-EC (2a and 2b) in mammalian cells. 2a and 2b are subsequently metabolized into CT (3) by ChEH. 3 is oxidized into OCDO (4) by a yet unknown enzyme.

were determined with a Kofler apparatus and are uncorrected. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer AC300. Solutions were prepared in deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD), with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. EI-MS and CI-MS spectra were obtained with a quadrupolar NERMAG R10-10 spectrometer. Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin–Elmer IR-881 spectrometer. Optical rotations were measured with a PerkinElmer 241 polarimeter. Elemental analyses were carried out at the Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne (France) with the MA-E2–01 method for carbon and hydrogen composition and the MA-E2-13 for oxygen.

# 2.1. General procedure for the oxidation of cholesterol and oxysterols with $\mathrm{HIO}_4$

Pure THF (15 mL) in aqueous iodide metaperiodate (5.5 mL, 10 mmol, 488 mM, 10 equivalents) was added with stirring to a solution of **1**, **2a**, **2b** or **3** (1 mmol, 48.8 mM). The mixture was stirred at room temperature and turned yellow, orange and brown in a day. The completion of the reaction was shown by TLC. The mixture was washed with excess 10% aqueous sodium thiosulfate and a white precipitate appeared in a colorless solution. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate (40 mL). The extract was washed with water, 5% aqueous sodium bicarbonate and brine. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (0–100% hexane in diethyl-ether and 0–100% diethylether in ethyl acetate) to obtain the product of interest as a white solid.

#### 2.2. Synthesis of $3\beta$ -cholestane- $5\alpha$ , $6\beta$ -triol (**3**) from cholesterol (**1**)

The reaction was completed in 26 h with an 85% yield. Rf 240 °C [EtOAc] = 0.26;mp (lit. 239–241 °C [22]);  $[\alpha]_D^{20} = +2.4^{\circ} \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mL} \text{ (EtOH) [ref. } [\alpha]_D^{20} = +2.4^{\circ} \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mL]};$ IR (cm<sup>-1</sup>): 3500–3100, 2939, 2867, 1467, 1375 and 1063; 1H NMR (CD<sub>3</sub>OD) 1: 4.03 (m, 1H, H-3),3.47 (t, 1H, H-6), 1.17 (s, 3H, CH3-19), 0.95 (d, 3H, CH3-21), 0.90 (d-d, 6H, CH3-26 & CH3-27), 0.73 (s, 3H, CH3-18); 13C NMR (CD<sub>3</sub>OD) 212.08, 80.87, 67.30, 56.37, 56.12, 44.56, 43.12, 42.44, 41.79, 39.59, 39.47, 37.29, 36.46, 36.10, 35.72, 30.38, 29.77, 28.06, 28.00, 23.92, 23.84, 22.81, 22.55, 21.44, 18.63, 14.08, 12.02; (MS (DCI/NH<sub>3</sub>) m/z: 420 (MH<sup>+</sup>), 438 MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>: C, 77.09; H, 11.50; O, 11.41; Found: C, 77.22; H, 11.77; O, 11.00.

#### 2.3. Synthesis of 6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol (4) from cholesterol (1)

The reaction was completed in 24 days with a 30% yield. Rf [EtOAc] = 0.67; mp 232 °C (lit. 231-232 °C [23]);  $[\alpha]_D^{20} = -35^{\circ} \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mL}$  (EtOH) [ref.  $[\alpha]_D^{20} = -35^{\circ} \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mL}$ ]; IR (cm<sup>-1</sup>):3500–3100, 2951, 2867, 1701, 1466, and 1375; 1H NMR (CD3OD) I: 3.92 (m, 1H, H-3), 0.96 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.90 (dd, 6H, CH<sub>3</sub>-26 & CH<sub>3</sub>-27), 0.8 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); NMR &C (75 MHz, DMSO-d6) 73.94, 65.77, 62.93, 56.16, 56.10, 55.90, 52.03, 50.43, 44.62, 42.94, 40.09, 38.01, 36.13, 35.73, 32.57, 31.24, 29.67, 28.32, 27.89, 27.33, 23.92, 23.73, 23.16, 22.89, 21.11, 19.92, 18.90, 16.34, 12.62; MS (DCI/NH<sub>3</sub>) *m/z*: 418 (MH<sup>+</sup>), 436 MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>: C, 77.46; H, 11.07; O, 11.46; Found: C, 77.24; H, 10.90; O, 11.86.

# 2.4. Synthesis of $[^{14}C]$ - $3\beta$ -cholestane- $5\alpha$ , $6\beta$ -triol (**5**) and $[^{14}C]$ -6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol (**6**) from $[^{14}C]$ -cholesterol

**5** and **6** were synthesized as described above. Briefly, [<sup>14</sup>C]-cholesterol (20 µci, 0.4 µmol) was dissolved in THF (150 µL), and a solution of aqueous iodide metaperiodate was added (55 µL, 4 µmol). The mixture was stirred at room temperature for 26 h for the production 5 (conditions A) and 24 days to produce **6** (conditions B). At the end of the reaction, the mixture was washed with excess10% aqueous sodium thiosulfate and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water, 5% aqueous sodium bicarbonate and water. The solvent was removed under reduced pressure. Under conditions A, **5** (18 µCi) was obtained with a radiochemical purity >95%. Under conditions B, the extract was purified isocratically by reversed-phase HPLC (Ultrasep ES 100 RP 18, 6.0 µm; Bischoff, Leonberg, Germany) with MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5) as eluant at a flow rate of 0.7 ml/min. We obtained 6 (7 µCi), with a >98% radiochemical purity.

# 2.5. Metabolism of $[^{14}C]$ -3 $\beta$ -cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (**5**) by MCF-7 cells

MCF-7 cells were from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured until passage 30. MCF-7 were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin (50 U/ml) in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. MCF-7 cells were seeded in 100 mm plates at  $1 \times 10^5$ , then incubated with [<sup>14</sup>C]-5 (final concentration 0.6  $\mu$ M; 20  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) in the presence of solvent vehicle (EtOH 0.1%) for 8 h. The cells were scraped and pelleted by centrifugation for 10 min at 1500 rpm, and then extracted as described above. Samples were spotted onto Fluka 20  $\times$  20 silica gel plates previously heated for 1 h at 100 °C and developed using EtOAc. The radioactive metabolites were identified on TLC plates by co-migration with authentic standards by autoradiography using Kodak Biomax

MS film (Sigma–Aldrich). The Rf for CT (**3** and **5**) and OCDO (**4** and **6**) were 0.26 and 0.67 respectively.

#### 3. Results and discussion

In the search for a simple and direct method to produce 3 and **4**, we chose to study the oxidation of cholesterol by  $HIO_4$ (Table 1). 1 is oxidized into 3 at room temperature using 3 equivalents of HIO<sub>4</sub>, while no **4** was found even after up to 20 days incubation, consistent with the Graber et al's report [21]. They found that the reaction could occur only for 3<sup>B</sup>-acetyl-cholesterol which adds waste generation acetylation/deacetylation steps that should be avoided in the context of <sup>14</sup>Clabelled compounds. Increasing the HIO<sub>4</sub> concentration to 10 equivalents improved the yield to 85% at 1 day and gave 4 at 32% yield after 20 days. The monitoring of the progress of the reaction by TLC showed the appearance of 5,6-ECs which are consumed during the reaction. Under the same conditions, 10 equivalents of HIO<sub>4</sub> in the presence of 2a and 2b gave both 3 at an 88% yield at 1 day and 4 at a 27% yield at day 20. Finally the oxidation of **3** by 10 equivalents of  $HIO_4$  gave **4** at a 45% yield. Increasing the temperature decreased the yield of the reaction, changing the concentration of HIO<sub>4</sub> does not improve the yield of the reaction, replacing HIO<sub>4</sub> by HClO<sub>4</sub> gave no reaction, establishing a specific action of HIO<sub>4</sub> as a catalyst to the production of **3** an **4** from **1** (Table 1). These data established that the synthesis of **3** and **4** is possible from **1** in one step with a good vield.

Based on these data, we have done the same experiments with  $[^{14}C]$ -cholesterol using 10 equivalents of HIO<sub>4</sub>. 1 day of incubation of  $[^{14}C]$ -cholesterol with HIO<sub>4</sub> gave  $[^{14}C]$ -CT (**5**) with a 80% yield with a radio-purity greater than 98% after HPLC purification. The iodide metaperiodate oxidation of  $[^{14}C]$ -cholesterol for 20 days gave  $[^{14}C]$ -OCDO (**6**) at a 30% yield with a radio-purity greater than 98% after HPLC purification. These data established that we succeeded in the synthesis of **5** and **6** in one step with a good yield.

As an illustration of the use of **5** and **6**, in Fig. 2 we show that the incubation of breast cancer cells with 5 gave a transformation product that co-migrated with 6 on TLC. This established that the metabolism of **5** and **6** can be carried out with a small number of cells using these labelled compounds. The use of **5** and **6** has enabled us to identify the enzymes involved in the biosynthesis of **6** from **5** and in the biosynthesis of **5** from **6** (Voisin et al., man-



**Fig. 2.** Metabolism of **5** in MCF-7 cells. (A) Synthetic compound **5**, (B) synthetic compound **6**, (C) extract of cells incubated in the presence of compound **5** gave compound **6**. 100,000 MCF-7 cells were incubated for 8 h in the presence of compound **5**. Cells were washed and lipids were extracted as described in Section 2. Sterols were separated by thin layer chromatography (TLC) and the TLC was revealed by autoradiography.

uscript in preparation). The same synthesis was used successfully to get deuterated CT and OCDO from deuterated cholesterol (data not shown).

In a previous study Graber et al. reported that  $3\beta$ -acetylated-**3** did not afford  $3\beta$ -acetylated-**4** using 3 equivalents of HIO<sub>4</sub> [21]. Our data show that using 10 equivalents of HIO<sub>4</sub>, free cholesterol (non acetylated) can give both **3** and **4** in good yields through the intermediate of **2**, establishing that a one step synthesis of 5 was possible. We found that compounds **1**, **2a**, **2b** and **3** react with HIO<sub>4</sub> to give **4** with the same yield. The fact that **3** can give **4** established that **3** is the probable intermediate after compounds **2a** and **2b** in the oxidation of **1** into **4** following a route of chemical transformation as shown in Fig. 3.

The iodide metaperiodate oxidation of  $[^{14}C]$ -cholesterol is a simple and direct way to obtain **5** and **6** in good yield.

In conclusion, a one step synthesis of cholestane- $3\beta$ , $5\alpha$ , $6\beta$ -triol **2** and 6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol **3** from cholesterol is presented and constitutes an easy synthesis of [<sup>14</sup>C]-cholestane- $3\beta$ , $5\alpha$ ,  $6\beta$ -triol (**5**) and [<sup>14</sup>C]-6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol (**6**) from [<sup>14</sup>C]-cholesterol.

#### Table 1

Synthesis of CT (3) and OCDO (4) from cholesterol (1), 5,6α-EC (2a), 5,6β-EC (2b) and CT (3) in various conditions. r.t.: room temperature.

-						
Sterol	Catalist	Equivalent	Temperature	Product	Incubation time (day)	Yield %
1	HIO <sub>4</sub>	3	r.t.	3	1	12
				4	20	0
			Reflux	3	1	0
				4	1	0
		10	r.t.	3	1	85
				4	20	32
			Reflux	3	1	0
				4	1	0
		20	r.t.	3	1	6
2a		10	r.t.	3	1	88
				4	20	27
2b		10	r.t.	3	1	88
				4	20	27
3		10	r.t.	4	20	45
				4	20	0
1	HClO <sub>4</sub>	3	r.t.	3	1	1
				4	20	0
			Reflux	3	1	1
				4	1	0
		10	r.t.	3	1	0
		-		4	20	0
				-		0



Fig. 3. Chemical synthesis of 3 and 4 by HIO<sub>4</sub> from 1.

#### Acknowledgments

MP and SSP are supported by internal grants from the "Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale", the University of Toulouse III and an external grant from the "Fondation de France". SSP is in charge of research at the Centre National de la Recherche Scientifique. MV is funded by the "Ministere de la Recherche".

#### References

- L. Raccosta, R. Fontana, D. Maggioni, C. Lanterna, E.J. Villablanca, A. Paniccia, et al., The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumorpromoting neutrophils, J. Exp. Med. 210 (2013) 1711–1728.
- [2] M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Oxysterols and related sterols: implications in pharmacology and pathophysiology, Biochem. Pharmacol. 86 (2013) 1–2.
- [3] E.R. Nelson, S.E. Wardell, J.S. Jasper, S. Park, S. Suchindran, M.K. Howe, et al., 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology, Science 342 (2013) 1094–1098.
- [4] P. de Medina, M.R. Paillasse, G. Segala, M. Voisin, L. Mhamdi, F. Dalenc, et al., Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties, Nat. Commun. 4 (2013) 1840.
- [5] S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly, Curr. Opin. Pharmacol. 12 (2012) 673–676.
- [6] A. Sukhanova, A. Gorin, I.G. Serebriiskii, L. Gabitova, H. Zheng, D. Restifo, et al., Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGF receptor inhibitors via increased EGF receptor degradation, Cancer Discov. 3 (2013) 96–111.
- [7] L. Gabitova, A. Gorin, I. Astsaturov, Molecular pathways: sterols and receptor signaling in cancer, Clin. Cancer Res. 20 (2014) 28–34.
- [8] P. de Medina, M.R. Paillasse, G. Segala, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (2010) 13520–13525.
- [9] S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Cholesterol epoxide hydrolase and cancer, Curr. Opin. Pharmacol. 12 (2012) 696–703.
- [10] P. de Medina, M.R. Paillasse, B. Payre, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities:

identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases, J. Med. Chem. 52 (2009) 7765–7777.

- [11] S.A. Khalifa, P. de Medina, A. Erlandsson, H. Elseedi, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, The novel steroidal alkaloids dendrogenin A and B promote proliferation of adult neural stem cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 446 (2014) 680–685, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.134.
- [12] B. Sola, M. Poirot, P. de Medina, S. Bustany, V. Marsaud, S. Sivente-Poirot, et al., Antiestrogen-binding site ligands induce autophagy in myeloma cells that proceeds through alteration of cholesterol metabolism, Oncotarget 4 (2013) 911–922.
- [13] G. Segala, P. de Medina, L. Iuliano, C. Zerbinati, M.R. Paillasse, E. Noguer, et al., 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells, Biochem. Pharmacol. 86 (2013) 175–189.
- [14] J. de Weille, C. Fabre, N. Bakalara, Oxysterols in cancer cell proliferation and death, Biochem. Pharmacol. 86 (2013) 154–160.
- [15] M. Poirot, S. Silvente-Poirot, R.R. Weichselbaum, Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen, Curr. Opin. Pharmacol. 12 (2012) 683–689.
- [16] Y.W. Cheng, J.J. Kang, Y.L. Shih, Y.L. Lo, C.F. Wang, Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation, Food Chem. Toxicol. 43 (2005) 617–622.
- [17] P. de Medina, M. Paillasse, M. Poirot, S. Silvente-Poirot. Methods for determining the oncogenic condition of cell, uses thereof, and methods for treating cancer. US Patent 2012; US2012100124.
- [18] O. Kucuk, J. Stoner-Picking, S. Yachnin, L.I. Gordon, R.M. Williams, LJ. Lis, et al., Inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity by oxysterols, Cell Immunol. 139 (1992) 541–549.
- [19] R.A. Streuli, J. Chung, A.M. Scanu, S. Yachnin, Inhibition of human lymphocyte E-rosette formation by oxygenated sterols, J. Immunol. 123 (1979) 2897–2902.
- [20] O. Kucuk, J. Stoner-Picking, S. Yachnin, Ll. Gordon, R.M. Williams, LJ. Lis, et al., Inhibition of cytolytic T lymphocyte activity by oxysterols, Lipids 29 (1994) 657–660.
- [21] R.P. Graber, J.C.S. Snoddy, H.B. Arnold, N.L. Wendler, Notes the oxidation of cholesterol by periodic acid, J. Org. Chem. 21 (1956) 1517–1518.
- [22] K. Zhao, Y. Wang, L. Han, 4,5-Epoxycholestane-3,6-diols: templates for generating the full set of eight cholestane-3,5,6-triol stereoisomers in multigram scales, but not for a cholestane-3,4,6-triol, Steroids 72 (2007) 95– 104.
- [23] L.F. Fieser, S. Rajagopalan, Selective oxidation with N-Bromosuccinimide. II. Cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol, J. Am. Chem. Soc. 71 (1949) 3938–3941.

## **Discussion**

Dans le but de synthétiser le CT et l'OCDO de manière simple et avec un bon rendement, nous nous sommes intéressés à l'oxydation du cholestérol par l'acide périodique (HIO<sub>4</sub>). Dans une précédente étude, Graber et al., ont montré que le 3ß-acétyl-cholestérol pouvait être oxydé à température ambiante, en 3β-acétyl-cholestane-triol, en utilisant 3 équivalents de HIO<sub>4</sub> (Graber et al. 1956). En s'appuyant sur ces résultats, nous avons montré que dans les mêmes conditions, le cholestérol pouvait être oxydé en CT, avec un rendement de 12%, mais sans production d'OCDO. L'utilisation de 10 équivalents de HIO<sub>4</sub> à permis d'augmenter le rendement à 85% après 24h de réaction. Une réaction de 20 jours, nous a permis d'obtenir de l'OCDO en une seule étape, avec 32% de rendement. Durant le suivi de ces réactions, nous avons observé la formation de 5,6-EC en tant qu'intermédiaire de synthèse et montré que les 5,6α-EC et 5,6β-EC en présence de 10 équivalents de HIO<sub>4</sub>, formaient du CT et de l'OCDO au bout de 1 jour ou 20 jours, respectivement, avec des rendements comparables à ceux obtenus en utilisant le cholestérol. De plus, dans ces conditions, le CT peut donner de l'OCDO, ce qui indique que les 5,6-EC et le CT sont des intermédiaires de l'oxydation chimique par HIO<sub>4</sub>, du cholestérol en OCDO. Les mêmes résultats ont été obtenus à partir du cholestérol radiomarqué au 14C ou deutéré.

Ce travail décrit une nouvelle méthode de synthèse simple en une seule étape, du CT ou de l'OCDO à partir du cholestérol. Cette méthode est très intéressante pour la synthèse de molécules deutérées ou radiomarquées, non commerciales, puisqu'elle permet d'obtenir simplement ces molécules pures et avec un haut rendement. Ces travaux ont permis le développement de nouveaux outils, que j'ai pu utiliser au cours de mon projet de thèse, permettant d'étudier le métabolisme des 5,6-EC, du CT et de l'OCDO.

# Article 3 :

# Nouvelles fonctions des 11-Hydroxystéroïde déshydrogénases : production et régulation de l'oxystérol OCDO, un métabolite promoteur de tumeur

<u>Maud Voisin</u>, Florence Dalenc, Magali Lacroix-Triki, Talal Al Saati, Marc Poirot & Sandrine Silvente-Poirot

### Article en préparation,

Brevet Sandrine Silvente-Poirot, Maud Voisin, Florence Dalenc, Magali Lacroix-Triki, Marc Poirot, Method of diagnosing and treating cancer. Patent Inserm. European Patent 2014/14306364

Récemment, des dérégulations du métabolisme des stérols ont été impliquées dans le développement et la résistance des cancers du sein au Tam et ont été corrélées à une survie plus faible des patientes atteintes d'un cancer du sein (Pitroda et al. 2009; Nelson et al. 2013; Silvente-Poirot & Poirot 2012b; Silvente-Poirot & Poirot 2014). En accord avec ces observations, l'équipe a caractérisé une nouvelle voie issue du métabolisme du cholestérol centrée sur la Cholestérol Epoxyde Hydrolase (ChEH). Cette voie métabolique est impliquée dans le contrôle de la différenciation cellulaire et de la pousse tumorale, et serait dérégulée dans les cancers du sein (Silvente-Poirot et al. 2012; de Medina et al. 2013; Silvente-Poirot & Poirot 2014). La ChEH catalyse l'hydrolyse des cholestérol-5,6-époxides (5,6-EC) en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) (de Medina, Paillasse, Segala, Poirot, & Silvente-Poirot, 2010) et est la cible de composés anti-tumoraux comme le Tam ou la DDA (de Medina, Paillasse, et al. 2010a; de Medina et al. 2013; Sola et al. 2013). Pitroda et al., ont montré que Mucin1, une glycoprotéine surexprimée dans les cancers, induisait une signature transcriptionnelle, comprenant des gènes du métabolisme du cholestérol et des lipides, et qu'elle était prédictive de la résistance des patientes à l'hormonothérapie et associée à un mauvais pronostic (Pitroda et al. 2009; Poirot et al. 2012). Parmi ces gènes, est retrouvée la 7-déhydrocholestérol réductase (DHCR7), une des deux sous unités de la ChEH. Ceci suggère qu'une dérégulation

du métabolisme de la ChEH, peut mener à la progression et à la résistance des cancers du sein au Tam.

En accord avec ces résultats, des travaux de l'équipe ont mis en évidence que l'activité ChEH, générait un métabolite inattendu dans différentes lignées de cancer. Ce métabolite, issu de l'oxydation du CT, fut identifié comme le 6-oxo-cholestan- $3\beta$ , $5\alpha$ -diol (OCDO). Des données préliminaires montrent que l'OCDO stimule la prolifération tumorale et l'invasion *in vitro* et *in vivo* (Silvente-Poirot et al. 2012; Silvente-Poirot & Poirot 2012a).

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'OCDO sur la promotion de tumeurs de lignées cellulaires représentatives de différents cancers du sein. Il nous est apparu pertinent d'étudier la production de cette molécule dans les cancers du sein chez le patient. En effet, nous avons confirmé l'implication de l'OCDO dans les processus tumoraux. Ainsi, nous avons cherché à caractériser ses effets de promoteur de tumeur sur des lignées cellulaires représentatives de différents cancers du sein. Par la suite, il nous avons étudié la production de cette molécule dans les cancers du sein. Des données obtenues dans l'équipe, suggéraient l'existence d'une enzyme distincte de la ChEH responsable de la transformation du CT en OCDO. Du fait de la structure de ces molécules et du type de réaction qui les lie (réactions de déshydrogénation ou de réduction), nous avons supposé que des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) pouvaient catalyser la déshydrogénation de la fonction alcool en position 6 du CT, en cétone positionnée sur l'OCDO, et inversement. Trois grandes classes de HSD ont été décrites, les  $3\beta$ -,  $17\beta$ - et  $11\beta$ -hydroxystéroïdes déshydrogénases. La présence d'un axe de symétrie sur le squelette stéroïdien rend les positions 11 $\beta$  et 7 $\alpha$  équivalentes (Lathe & Kotelevtsev 2014). Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse que les 11HSD pourraient être des candidates responsables de la biotransformation du CT en OCDO. Les 11HSD existent sous deux formes enzymatiques, la 11HSD de type 2 (11HSD2) qui catalyse la déshydrogénation du cortisol en cortisone, et la 11HSD de type 1 (11HSD1) qui catalyse la réduction de la cortisone en cortisol, de manière dépendante de la régénération de son cofacteur par l'H6PD (Chapman et al. 2013; Gathercole et al. 2013). Il est intéressant de noter que la 11HSD1 accepte différents types de substrats, dont des stérols et stéroïdes oxydés en position 7, comme le 7-ketocholesterol qui sera transformé en 7-hydroxycholestérol (Odermatt & Nashev 2010). De plus, il a été montré que la 11HSD2 est exprimée dans les MCF7, ou dans des tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein, tandis que la 11HSD1 n'est pas détectée, suggérant une possible dérégulation de l'équilibre entre l'expression de la 11HSD1 et de la 11HSD2 (Lu et al. 2011; Koyama et al. 2001) dans les cellules tumorales, ce qui favoriserait la production d'OCDO. Nous nous sommes également intéressés à étudier l'implication de ces enzymes dans la promotion et l'invasion des cancers du sein ainsi que leur expression dans des échantillons de patientes atteintes de cancer du sein et dans le tissu normal adjacent.

Dans cette étude, nous avons démontré l'implication des 11HSD dans le contrôle de la biosynthèse de l'OCDO à partir du CT, en plus d'avoir confirmé que l'OCDO est un promoteur de tumeur dans des lignées cellulaires tumorales mammaires.

# New functions for 11-beta-hydroxysteroid hydrolases in producing and regulating the oxysterol OCDO, a cancer promoter metabolite

Maud Voisin<sup>1,2</sup>, Florence Dalenc<sup>1,3</sup>, Magali Lacroix-Triki<sup>3</sup>, Léonor Chaltiel<sup>3</sup> Thomas Filleron<sup>3</sup>, Talal Al Saati<sup>4</sup>, Marc Poirot<sup>1,2,3\*</sup> and Sandrine Silvente-Poirot<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Team « Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations», Cancer Research Center of Toulouse, UMR 1037 INSERM-University Toulouse III, Toulouse, France; <sup>2</sup>Université Paul Sabatier, <sup>3</sup>Institut Claudius Regaud, Toulouse, France; <sup>4</sup>INSERM-US006 ANEXPLO/CREFRE, Toulouse, France.

\*Corresponding authors: <u>Sandrine.poirot@inserm.fr</u> and <u>marc\_poirot@hotmail.com</u>

## Abstract

We previously established that the activity of the cholesterol epoxide hydrolase (ChEH) in tumor cells generated an onco-metabolite from  $5\alpha$ -cholestan- $3\beta$ , 5,  $6\beta$ -triol (CT) in cancer cells. We identified the structure of this unknown metabolite as being 6-oxo-cholestan- $3\beta$ ,  $5\alpha$ diol (OCDO), a product of oxidation of CT, and characterized that OCDO promotes tumor proliferation and invasion in vitro and in vivo. The aim of the present study was to identify the enzymes involved in the production of OCDO from CT, to determine their role in tumor promotion/invasion in breast cancer and their expression in patient samples. We demonstrate here that the interconversion of CT/OCDO is mediated by the enzymes 11β-hydroxysteroid dehydrogenase of type 1 and 2 (11\beta HSD2 and 11\beta HSD1). These enzymes are known to regulate the interconversion of cortisol/cortisone. Importantly, 11BHSD2 was shown to be involved in tumor cell proliferation and invasion through OCDO production and 11BHSD1 in the reversion of these events through the transformation of OCDO into CT. Moreover, we found that the expression of the enzymes involved in OCDO production (ChEH, 11βHSD2) are increased in human breast tumors compared with normal tissue. Moreover, the histopathological studies revealed that the enzymatic equilibrium between 11BHSD2 and 11βHSD1 is shifted toward the production of OCDO in breast tumors.

Taken together, this study highlights new functions for the enzyme  $11\beta$ HSD1 and  $11\beta$ HSD2 in cancer progression, and as new biomarkers of cancer.

## Introduction

Breast cancer (BC) is the most common female cancer. It affects more than 1 million women worldwide and about 400 000 patients die due to this disease every year. Despite the use of aromatase inhibitors and Fulvestrant, Tamoxifen (Tam) is still one of the major drugs used over the world for the therapy and prevention of breast cancers. In clinical practice, levels of estrogen and progesterone receptors (ER, PR) are the only used predictors of Tam response. However, 25% of ER+/PR+ tumors, 66% of ER+/PR- tumors, and 55% of ER-/PR+ tumors fail to Tam treatment <sup>1, 2</sup>. The mechanisms responsible for these treatment failures still remain unclear, indicating that it is necessary to characterize the molecular actors involved in BC etiology and resistance that will help to improve BC phenotyping, treatment efficacy and to develop new anticancer compounds and biomarkers.

Major findings recently highlight that sterol metabolism can produce new targets for cancer progression and resistance <sup>2-6</sup>. Consistent with these results, we characterized a new pathway in cholesterol metabolism involved in the control of cell differentiation and growth and showed that it is deregulated in breast cancers at the level of Cholesterol Epoxide Hydrolase (ChEH) metabolism <sup>6-8</sup>. ChEH catalyses selectively the hydrolysis of cholesterol 5,6-epoxides  $\alpha$  and  $\beta$  ( $\alpha$ -EC and  $\beta$ -EC) into 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ ,5,6 $\beta$ -triol (CT) <sup>3, 9, 10</sup> and it is the target of anti-cancer compounds such as Tam and Dendrogenin A<sup>3, 7, 10-12</sup>. Interestingly, mucin1, a glycoprotein aberrantly overexpressed in numerous cancers, induces a lipid and sterol metabolism transcriptional signature in breast cancer tissue that is predictive of resistance to Tam treatment and is associated with an increased risk of patient death<sup>2</sup>. Among the genes over-expressed are the one coding 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7) one of the subunit of the ChEH<sup>10</sup>, suggesting that deregulations at the level of ChEH metabolism may lead to BC progression and resistance to Tam treatment. Consistent with these results, we established that the activity of ChEH in tumor cells generated an unexpected metabolite from CT in cancer cells<sup>8</sup>. We identified the structure of this unknown metabolite as being 6-oxocholestan-38,5a-diol (OCDO), a product of oxidation of CT and characterized that OCDO promotes tumor proliferation and invasion *in vitro* and *in vivo*<sup>8</sup>.

The aim of the present study was to identify the enzymes involved in the production of OCDO from CT, to determine their role in cancer promotion/invasion and to study the

expression of the enzymes regulating OCDO production in BC patient samples and normal tissue.

We demonstrate here that the interconversion of CT/OCDO is mediated by the enzymes 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of type 1 and 2 (11 $\beta$ HSD2 and 11 $\beta$ HSD1), known to regulate the interconversion of cortisol/cortisone <sup>13, 14</sup>. Importantly, 11 $\beta$ HSD2 was shown to be involved in tumor cell proliferation through OCDO production. Moreover, we found that the expression of the enzymes producing OCDO is deregulated in breast tumors compared with normal tissues. Taken together, this study highlights new functions for the enzyme 11 $\beta$ HSD1 and 11 $\beta$ HSD2 in cancer progression and as new biomarkers of cancer.

## Results

**OCDO is a metabolite of CT.** We studied the production of OCDO in breast tumors by incubating MCF7 tumor cells during increasing time with either  $[^{14}C]\alpha$ -EC,  $[^{14}C]\beta$ -EC or  $[^{14}C]$ -CT. At the indicated time the cells and the media were collected and analyzed separately. As shown in the thin layer chromatography (TLC) autoradiograms of Fig. 1a and 1c,  $\alpha$ -EC and  $\beta$ -EC were converted to CT as a result of ChEH activity however, with prolonged incubation times, OCDO production was observed. The formation of OCDO continued when  $\alpha$ -EC or  $\beta$ -EC was totally metabolized to CT at 72 h (Fig. 1a and 1c), indicating that OCDO is formed from CT. Similar experiment performed with [<sup>14</sup>C]-CT confirmed that OCDO is a metabolite of CT (Fig. 1e).

**OCDO** stimulates tumor cell proliferation and invasion. We studied the effects of OCDO on breast tumor cell proliferation and invasion. As shown in Fig 2A and 2B, the growth rate of tumor cells expressing the estrogen receptor (ER), such as the human MCF7 and mouse TS/A cells, was increased in a concentration-dependent manner upon OCDO treatment and reached respectively 1.3-fold and 1.7-fold the control. This increased in proliferation was in the same range than with 1 nM estradiol (E2). The invasiveness of MCF7 and TS/A cells treated with OCDO was also increased in a concentration-dependent manner compared with the control (Fig 2C and 2D).

**OCDO stimulates the proliferation of breast tumors implanted into mice.** We then assayed whether OCDO stimulates the growth of mammary tumors implanted into mice. OCDO treatment significantly increased the growth of human MCF7 (Fig. 2E) and murine TS/A tumors grafted into immunodeficient or immunocompetent mice respectively compared with the control group (Fig. 2E and 2F). Histological analysis of MCF7 or TS/A tumors

indicated that the proliferative marker Ki67 was increased in OCDO-treated tumors compared with control-treated tumors in both tumor models (Fig. 2G and 2H). In addition, OCDO stimulates the growth of tumor models which do not express the ER such as the mouse E0771 and the human MDA-MB231 and MDA-MB468 cells (Fig. 2I, 2J and 2K respectively).

**OCDO** reverses the tumor growth inhibition effect of ChEH inhibitors in mice. We then assayed the anti-growth effect of Tam or DDA against TS/A tumors in the absence and presence of OCDO. As above, TS/A tumors implanted into immunocompetent mice were treated s.c. every day with either the solvent vehicle (control), OCDO (50  $\mu$ g/kg), Tam (56 mg/kg), DDA (20 mg/kg) or the combination of Tam (56 mg/kg) + OCDO (50  $\mu$ g/kg) or DDA (20 mg/kg) + OCDO (50  $\mu$ g/kg). As shown in Fig. 2L, after 13 days of treatment, OCDO enhanced TS/A tumor growth by 140 % compared with that of the control group (p<0.01). Treatment with Tam or DDA alone significantly inhibited the growth of tumors by 31 % (p<0.05) and 33 % (p<0.01) respectively compared with the control group. When animals were treated with OCDO and Tam, or OCDO with DDA, the growth of tumors was not statistically different from that of the control group, indicating that the growth inhibitory action of Tam or DDA was reversed by OCDO. These data indicate that the inhibition of OCDO production contributes to the anti-tumor effects of both Tam and DDA.

Identification of the enzymes that regulate the production of OCDO from CT. Since the data we obtained argued for the existence of an enzyme distinct from ChEH that metabolizes CT into OCDO, we hypothesized that a hydroxysteroid dehydrogenases (HSD) would catalyze the dehydrogenation (or oxidation) of the alcohol function in position 6 of CT into a ketone in OCDO. Three main classes of HSD has been described  $(3\beta, 17\beta)$  and  $11\beta$  -hydroxy steroid dehydrogenase). A symmetry axis on the steroid backbone makes equivalent the positions 11 $\beta$  and 7 $\alpha$ <sup>15</sup>, which suggest us that 11 $\beta$ HSD could be a good candidate for this reaction. 11β-HSD exist as two enzymes, 11β-HSD type 2 (11HSD2) which catalyzes the dehydrogenation of cortisol into cortisone and 11β-HSD type 1 (11HSD1) which realizes the reverse reaction and catalyzes the hydrogenation of cortisone into cortisol <sup>13, 14, 16</sup> (Fig. 3A). Interestingly 11BHSD1 accepts also as substrate 7-ketocholesterol which is transformed into 7-hydroxycholesterol<sup>16</sup>. Importantly, 11BHSD2 is expressed in MCF7 while 11BHSD1 is not detected <sup>17</sup>, suggesting a possible deregulation of the equilibrium between 11βHSD1 and 11BHSD2 expression in tumor cells, that would favor OCDO production. In accordance with this hypothesis, we characterized significant levels of 11BHSD2 at the mRNA and protein level in various human BC cell lines reflecting different BC subtypes as well as in cell lines
resistant to Tam, and all the cell lines tested produced OCDO. In contrast,  $11\beta$ HSD1 expression was not detectable either at the mRNA or protein levels (Table 1).

To confirm the implication of 11 $\beta$ HSD2 in the production of OCDO from CT, we transfected HEK-273 cells, a cell model previously used to study cortisol/cortisone metabolism <sup>18</sup>, with a plasmid encoding either the 11 $\beta$ HSD2 (HSD2) or the empty vector (mock). Immunoblot analysis of mock transfected HEK-273 cells did not detect endogenous 11 $\beta$ HSD2 (Fig 4A). In contrast, in 11 $\beta$ HSD2-transfected HEK-273 cells, 11 $\beta$ HSD2 was well detected (Fig. 4A). We first measured the capacity of the 11 $\beta$ HSD2-transfected HEK-273 cells to produce cortisone when incubated 8 h with <sup>3</sup>H-cortisol. As observed in Fig. 4B, 11 $\beta$ HSD2-transfected HEK-273 cells produced 3-fold more cortisone (3.3 pmol/10<sup>6</sup> cells/h) than mock-transfected cells (1.1 pmol/10<sup>6</sup> cells/h), indicating that the encoded enzyme was functional. We then measured the production of OCDO after incubating transfected HEK-273 cells induced a 7-fold increase production of OCDO (195 pmol/10<sup>6</sup> cells/h) compared with mock-transfected HEK-273 cells (29 pmol/10<sup>6</sup> cells/h). Together these data indicate that 11 $\beta$ HSD2 is able to produce significant levels of OCDO in addition to cortisone.

To study the implication of 11BHSD1 in the transformation of OCDO into CT, HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding the  $11\beta$ HSD1 (HSD1) or the empty vector (mock) and with or without a plasmid coding the H6PDH, the enzyme that produces the cofactor NADPH necessary for the 11βHSD1 reductase activity as reported in <sup>18</sup> (Fig. 3A). No endogenous expression of 11BHSD1 or H6PDH was detected in HEK293 cells transfected with the empty vector (mock) by western blot analysis (Fig 4D). In contrast, in 11BHSD1 and H6PDH transfected-HEK293 cells, the proteins were well detected (Fig. 4D). We then measured the capacity of the HEK293 transfected cells to produce cortisol after incubating with <sup>3</sup>H-cortisone. As shown in Fig. 4E, low production of cortisol was measured in the mock-transfected cells or in H6PDH-transfected cells (about 0.20  $\text{pmol}/10^6$  cells/h). In contrast, 11BHSD1-transfected cells produced 5-fold more cortisol than mock-transfected cells (1.1  $pmol/10^6$  cells/h), and this production was increased twice by co-transfecting 11H $\beta$ SD1 and H6PDH (2 pmol/10<sup>6</sup> cells/h). Together the data indicated that the transfected enzymes 11BHSD1 and H6PDH are functional. We then measured the production of CT after incubating transfected HEK293 cells with [<sup>14</sup>C]-OCDO for 24 h. As shown in Fig. 4F, the production of CT was of about 1  $pmol/10^6$  cells/h in cells transfected with the empty plasmid or with H6PDH while the transfection of the plasmid coding 11BHSD1 induced a 3-fold increased production of CT and the co-transfection of H6PDH and 118HSD1 further increased 168

CT production that reached 8-fold (8.5 pmol/ $10^6$  cells/h) the levels of the mock-transfected cells. These data indicate that  $11\beta$ HSD1 is able to produce significant levels of CT in addition to cortisol.

Ectopic expression of 11 $\beta$ HSD1 in MCF-7 cells induces CT production and decreases cell proliferation and OCDO treatment reverses this effect. We transfected MCF7 cells with a plasmid expressing the 11 $\beta$ HSD1 (Fig. 5A) and evaluated the impact of its expression on CT production and cell proliferation. As shown in Fig. 5B, the expression of 11 $\beta$ HSD1 in MCF7 cells significantly stimulated OCDO to CT conversion compared with the control (73 ± 12 against 8.5 ± 2.5 pmol/10<sup>6</sup> cells/h). In addition, the expression of 11 $\beta$ HSD1 in MCF7 cells significantly decreased cell proliferation by 45 % and OCDO treatment reversed this effect (Fig. 5C), indicating that 11 $\beta$ HSD1 inhibits cell proliferation through transformation of OCDO into CT.

Knock-down of 118HSD2 decreases cell proliferation, invasion and survival in MCF7 cells as well as tumor growth and OCDO reverses these effects. To confirm the activity of 11BHSD2 to produce OCDO and to stimulate tumor cell proliferation, we knocked down the expression of 11BHSD2 in MCF7 cells by using shRNA against the enzyme or control shRNA. Two stable clones were selected in which the expression of  $11\beta$ HSD2 was significantly decreased at both protein and mRNA level (sh11HSD2 A and sh11HSD2 B) and compared with shRNA control clones (shC A and shC B) (Fig. 6A). A significant decrease in cortisone and OCDO production was measured in sh11HSD2 A and B clones compared with shC A and B control clones (Fig. 6B and 6C respectively). Basal cell proliferation of the two sh11HSD2 clones was significantly decreased (Fig. 6D) and their doubling time was increased by 142 % and 150 % (Fig. 6E) compared with control clones. Moreover, the knockdown of 11BHSD2 expression also significantly decreased cell survival in a clonogenic assay (Fig. 6F). Importantly, we determined that OCDO was able to reverse the inhibition of cell proliferation induced by decreasing the expression of 11\betaHSD2 in sh11HSD2 cells (Fig. 7A) while cortisone did not (Fig. 7B). Similarly, OCDO reversed the inhibition of cell invasion (Fig. 7C) and cell survival (Fig. 7D) mediated by the knock-down of 11BHSD2. Together these results indicate that 11BHSD2 controls cell proliferation, invasion and survival through OCDO production.

We then tested the impact of  $11\beta$ HSD2 knock-down *in vivo* on sh11HSD2-transfected cells xenografted into immunodeficiente mice. As shown in Fig. 7E, the basal growth of sh11HSD2 tumors was significantly decreased (by 40 %) compared with that of shC tumors. Importantly, treatment with OCDO rescues the growth inhibition of sh11HSD2 tumors to a

level similar to the growth of shC tumors treated with OCDO. Ki67 staining of the tumors indicated that cell proliferation was increased in ShC tumors through OCDO treatment and decreased in sh11HSD2 tumors, and OCDO reversed the growth inhibition of sh11HSD2 tumors. Together, these date indicate that  $11\beta$ HSD2 controls tumor growth through OCDO production.

Expression of the enzymes regulating OCDO production in breast cancer samples and **normal matched tissue.** We then explored the expression of the enzymes regulating or producing OCDO in breast cancer patient samples and normal adjacent tissues by immunohistochemistry. The patient characteristics are summarized in Table S1. As shown in Table 2, immunohistology analyses indicated that the 11BHSD2 was mainly expressed in breast tumors (97.8 % in tumor samples versus 19 % in normal samples) and its expression was significantly higher (p < 0.0001) in tumors than in normal tissues (Fig. 8A). 11 $\beta$ HSD2 was also observed in the endothelial cells of blood vessels in 43 % of breast tumor samples (not shown). DHCR7 and D8D7I were found expressed both in tumors and normal tissues. However, a significant high expression of both enzymes was observed in tumors compared with normal tissues (p=0.0001 and p=0.0045 respectively). In addition, the expression of the DHCR7 was also higher in the adipocytes surrounding the tumors (78 % of the samples) (Fig. 8B), compared with the adipocytes that were distant. In contrast, the 11βHSD1 and H6PDH were weakly present in the tumors and normal tissues, and no significant difference in their expression was found between tumors and normal tissues (Table 2). Interestingly, a positive correlation was found between the expression of 11BHSD2, DHCR7 and D8D7I in tumors and the aggressiveness of tumor subtypes (estrogen and/or progesterone receptor negative, HER2 positive) and/or histological grade (Table 3). Together these results indicate that the expressions of the enzymes producing OCDO are high in tumors compared with normal tissues while that involved in the conversion of OCDO to CT are weakly expressed.

#### DISCUSSION

The present study identifies new functions for 11- $\beta$ HSD2 and 11- $\beta$ HSD1 as being the enzymes involved in the inter-conversion of OCDO and CT. Thus, several enzymes are involved in the production and regulation of OCDO production. Previously, we showed that the ChEH, that is carried out by D8D7I and DHCR7, and mediates the transformation of EC into CT that leads to the production of OCDO in tumors <sup>8, 10</sup>. The inhibition of ChEH by molecules such Tam or DDA blocks the production of OCDO and its proliferative effect in

cancer cells and tumors, while the addition of OCDO reverses these effects<sup>8, 10</sup> and present study. Here, we identified a new metabolic pathway by showing that 11-BHSD2 and 11-BHSD1, which are known to regulate the metabolism of the glucocorticoids, cortisol and cortisone, in human, are involved in the next step to produce OCDO from CT or to produce CT from OCDO respectively. Importantly, 11-BHSD2 controls both in vitro and in vivo tumor cell proliferation through OCDO production, in add back experiments in which 11-BHSD2 expression has been attenuated. Conversely, 11-βHSD1 re-expression in tumor cells lacking this enzyme inhibits cell proliferation through transformation of OCDO into CT and OCDO addition reverses this effect. Thus, activation of 11-BHSD2 not only promotes inflammation and decreases the inhibition of cell proliferation induced by the inactivation of cortisol into cortisone but also produces OCDO, an onco-metabolite, that actively participates to cancer proliferation and invasion. Importantly, OCDO increases the proliferation of estrogen-positive or estrogen-negative breast tumors, indicating that OCDO may contribute to stimulate tumor progression even in the absence of estrogens. The 11-βHSD2 enzyme is exclusively oxidative, converting the active cortisol to the inactive cortisone and requiring NAD as cofactor. 11βHSD1 presents a dual reductase and dehydrogenase activity, depending, for the deshydrogenase activity, of the presence of H6PDH that produces the co-factor NADP<sup>18</sup>. In absence of H6PDH expression, 11-βHSD1 will work as a dehydrogenase as reported in human omental preadipocytes <sup>19</sup>. According to our results, the absence or the decrease level of 11-BHSD1 in tissues expressing 11-BHSD2 would favour the production of OCDO in addition to converting cortisol to cortisone. Similarly, the decrease or the absence of H6PDH may favour the dehydrogenase activity of 11-BHSD1 and thus the production of OCDO and cortisone. In the present study, the immunohistology analyses indicate that the expressions of the enzymes producing OCDO, 11BHSD2, D8D7I and DHCR7, are increased or high in tumors compared with normal tissues and that the enzymatic equilibrium between 11BHSD2 and 11BHSD1/H6PDH is shifted toward the production of OCDO in tumors. These results are consistent with the pro-tumor and pro-invasive activity of OCDO that we report in the present study and its secretion by the tumor cells should contribute to tumor proliferation and aggressiveness. 11 $\beta$ HSD2 is also present in cells of the vasculature in 43 % of the tumor samples, indicating that OCDO may be secreted in the blood fluid to act at distance of the tumor in addition to an autocrine action and it may actively participate to tumor invasion. In accordance with these hypotheses, a positive correlation was found between the increased expression of 11BHSD2, DHCR7 and D8D7I and the aggressiveness of breast human tumors defined by the immunohistochemical profile (estrogen and progesterone receptor plus HER2 expression) and histological grade. Nonetheless, we need to confirm these results using a larger series of breast cancer including more detailed clinic-pathological characteristics. Therefore, the activation of OCDO production as well as the expression of the enzymes producing or regulating OCDO could be biomarkers of cancer and of the efficacy of anti-cancer compounds such as Tam or DDA, as well as therapeutic targets for the treatment of ER positive and ER negative breast cancers.

In conclusion, we characterized a new cholesterol metabolism in breast cancers involving the enzymes regulating the conversion of cortisol and cortisone. This discovery should have major impact in tumor biology and opens new avenues of research for breast cancer treatment and possibly other cancers.

# **Materials and Methods**

## Materials

Chemicals [3H]-cortisol, [3H]cortisone and [14C]cholesterol were purchased from Perkin Elmer. The radiochemical purity of the compounds was verified by thin-layer chromatography (TLC) and was greater than 98%. Autoradiography experiments were done with GE Healthcare or Kodak phosphor screens. Fulvestrant (ICI 182780) used *in vivo* was a generous gift from the Institute Claudius Regaud (France). The NEON Transfection system was from Invitrogen, the BrdU cell proliferation elisa was from Roche Diagnostics, all plasmids were from Origene (HSD1 sc109325, HSD2 sc122552, H6PDH sc117481, DHCR7 sc110871, EBP or D8D7I sc116006. Other compounds and chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and solvents from VW. The antibodies used for the immunoblot and for the immunohistochemistry are listed in Table S2.

#### Animals

Female C57BL/6 Charles River Laboratories (France), Balb/c and NMRI Nude mice (6 weeks old) Janvier (France) were maintained in specific pathogen-free conditions and were included in protocols only following 2 weeks quarantine. All of the animal procedures for the care and use of laboratory animals were conducted according to the ethical guidelines of our institution and followed the general regulations governing animal experimentation.

# **Cell Culture**

MCF-7, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HEK293T and E0771 cells were from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured until passage 30. TS/A cells were provided by Dr P.L. Lollini (Bologna, Italy) and MELN cells were a generous gift of Dr. G. Freiss (Montpellier, France). MCF-7 cells were grown in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Dutcher), SKBR3 cells in Mc Coy's medium (invitrogen) 10% SVF, TSA and MDA-MB-468 cells in RPMI 10%, E0771 in RPMI 10% SVF HEPES 10mM and HEK 293T and MDA-MB-231 in DMEM (Lonza) 10% SVF. All the cells lines were cultured in 1% penicillin and streptomycin (50 U/ml) (invitrogen) in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at  $37^{\circ}$ C.

## **Cell transfection**

MCF7 or HEK293T cells (5 x  $10^6$  cells) were transfected with 5 µg of the indicated plasmid using the NEON Transfection System and according to the manufacturer's recommendations. Stable clones were established after MCF7 cells were separately transfected with four different shRNA plasmids targeting 11βHSD2 (11βHSD2 shRNA) or with a control shRNA (11βHSD2 SureSilencing ShRNA plasmid, Qiagen). Cells were then cultured for 3 weeks in presence of 0.5 mg/ml puromycin (Life Technologies). Several clones were analyzed by immunoblot analysis and real time RT-qPCR for the knock down of the expression of the protein of interest.

## Analysis of tumors in mice

Exponentially growing MCF7, ShMCF7, E0771, MDA-MB231, MDA-MB468 and TS/A cells were collected, washed twice in PBS and resuspended in PBS. TS/A and E9771 tumors were prepared by subcutaneous transplantation of  $35 \times 10^3$  cells or  $3 \times 10^5$  cells respectively in 100 µl PBS into the flank of BALB/c or C57Bl6 mice. For other tumors, 5 to 10 x  $10^6$  cells in 200µL PBS/matrigel (1/1) were injected into the flank of NMRI nude mice. Animals were treated as indicated in the legends. Animals were examined daily, and body weights were measured twice per week. In all the experiments, the tumor volume was determined by direct measurement with a caliper and was calculated using the formula (width<sup>2</sup> × length)/2. Tumors were either frozen in liquid nitrogen or fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded

in paraffin for immunohistochemical analysis. Paraffin sections were stained with haematoxylin and eosin for histomorphological analyses. Immunohistochemical staining was done on paraffin-embedded tissue sections, using a specific Ki67 antibody (clone MIB1, Dako).

## **Chemical synthesis**

5,6 $\alpha$ -EC, 5,6 $\beta$ -EC were synthesized as reported <sup>10, 20</sup>. CT and OCDO were synthesized as reported <sup>21</sup>.

# Metabolic activity assay in intact cells

Cells were plated on six-well plates (1 x  $10^5$  cells/well) in the appropriate complete medium. One day after seeding, cells were treated with either <sup>14</sup>C-CT (1 µM, 10µCi/µmol-1µl/dish) or <sup>14</sup>C-OCDO (1 µM, 10µCi/µmol-1µL/dish) or <sup>3</sup>H-cortisol (200 nM, 89 Ci/mmol-1µL/dish) or <sup>3</sup>H-cortisone (200 nM, 89 Ci/mmol-1µL/dish) or <sup>14</sup>C- $\alpha$ EC or <sup>14</sup>C- $\beta$ EC (600 nM, 20 µCi/µmol-1µl/dish) at the indicated times. After incubation, cells were washed, scraped, and neutral lipids were extracted with chloroform-methanol as described in <sup>11</sup> and then separated by TLC using Ethyl Acetate as eluant for <sup>14</sup>C-CT and <sup>14</sup>C-OCDO or chloroform-methanol (87:13, v/v) for <sup>3</sup>H-cortisol or <sup>3</sup>H-cortisone adapted from <sup>22</sup>. The radioactive lipids were detected by autoradiography (KODAK, BioMax MS Film). The positions of the metabolite of interest were determined using purified <sup>14</sup>C or <sup>3</sup>H standards and the region corresponding of CT, OCDO, cortisol or cortisone was scraped and quantified using a beta counter.

# **Cell proliferation assay**

MCF7 (4x10<sup>3</sup>), MCF7-sh11bHSD2 (4x10<sup>3</sup>), SKBR3 (2.5x10<sup>3</sup>), TSA (2.5x10<sup>3</sup>), MDA-MB231 (5x10<sup>3</sup>) and MDA-MB468 (5x10<sup>3</sup>) cells were seeded in 96-well plates and cultured in complete medium for 24 h. Cells were then treated for 24 h with either the indicated concentration of OCDO, cortisol or cortisone or with 1  $\mu$ M RU486 or ICI182780 added 30 mn before other treatment. At the end of this time, cells were incubated with BrDU for an additional 8 h and then evaluated for proliferation using the ELISA kit, Roche Diagnostics, as indicated by the manufacturer.

# Cell invasion assay

Invasion assays were carried out using Bio-Coat migration chambers (BD Falcon) with 8  $\mu$ m filters previously coated with matrigel. MCF7-sh11 $\beta$ HSD2 or MCF7-shC (1x10<sup>3</sup>) cells were plated in the upper chambers in SVF free medium and the chemoattractant (10% FBS) was added in the lower chambers. After incubating cells in absence or presence of OCDO (5  $\mu$ M) for 72 h at 37°C in 5% CO2 incubator, cells that had migrated through the filters were fixed (3.7% PFA) and stained (aqueous crystal violet 0.05%). The entire membranes were mounted on glass slides, and were counted under a microscope. All experiments were performed in duplicate.

# **Clonogenic assay**

MCF7-sh11bHSD2 (5x10<sup>3</sup>), MCF7-shC (5x10<sup>3</sup>) or TSA (3x10<sup>3</sup>) cells were seeded in duplicate in 35 cm<sup>2</sup> diameter dish. Twenty four hours after, cells were treated either with OCDO 1  $\mu$ M or solvent vehicle and the treatment was repeated every 3 days. At day 10, colonies were fixed with 3.7% PFA, stained with an aqueous crystal violet solution (0.05%) and the number of colonies was counted.

# Immunoblotting

Cells treated or not as indicated were washed with ice-cold PBS, scraped, and centrifuged at 1200 rpm for 5 min at 4°C. The pellets were resuspended in 100  $\mu$ L of extraction buffer ( 50mM Tris pH 7.4; 5mM NaCl; 1% tritonX100; 10% glycerol) with 1% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich), vortexed and centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. Whole cell extracts were fractionated by SDS PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using a transfer apparatus according to the manufacturer's protocols (Life Technologies). After incubation with 5% nonfat milk in TBST (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Tween 20) for 60 min, the membrane was incubated with antibodies against 11βHSD2 (1:1000), 11βHSD1 (1:500), H6PDH (1:500), EBP (1: 500) and DHCR7 (1: 200) or actin (1:10000, Merck Millipore, C4) at 4 °C overnight. Membranes were washed three times for 10 min and incubated with a 1:10000 dilution of horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies for 1 h. Blots were washed with TBST three times and

developed with the ECL system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocols.

# **RNA** isolation and qPCR analysis

Total RNA from cultured cells were isolated using TRIzol Reagent®(Invitrogen). RNA was quantified using nanodrop (thermofisher). Total RNA (1µg) was reverse transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed with an iCycler iQreal-time PCR detection system (Bio-Rad) using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and the indicated primers The threshold cycle (Ct) values of genes of interest were normalized with the Ct values of Cyclophiline A1.

## **Primers:**

	forward	reverse
cycloA1	GCA-TAC-GGG-TCC-TGG-CAT-CTT-GTC-C	ATG-GTG-ATC-TTC-TTG-CTG-GTC-TTG-C
11βHSD1	GA-CAG-CGA-GGT-CAA-AAG-AAA	GTC-CTC-CCA-TGA-GCT-TTC-CTG
11βHSD2	CCA-CCG-TAT-TGG-AGT-TGA-ACA	CGC-GGC-TAA-TGT-CTC-CTG-G
EBP		
(D8D7I)	CAC-AGG-GGT-CTT-AGT-CGT-GAC	CCA-GGT-GAA-TGA-ACC-CAC-ACA
DHCR7	ACT-GGC-GAG-CGT-CAT-CTT-C	TCC-TCG-TTA-TAG-GTG-GAG-TCT-TG
H6PDH	GCA-GAG-CAC-AAG-GAT-CAG-TTC	GGC-AGC-TAC-TGT-TGA-TGT-TGC

**Immunohistochemistry.** All samples were collected with the approval of the Institutional Review Board and tumor bank committee of the Claudius Regaud Institute. Written informed consent was obtained before inclusion in this study. Patients' clinical characteristics and tumor pathological features were obtained from the medical reports and followed the standard procedures in our institution. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin embedded sections of the initial tumor biopsies with the following antibodies: DHCR7 1:50, H6PDH 1:100, EBP 1:500, 11 $\beta$ -HSD1 1:50 and 11 $\beta$ -HSD2 1:50 (Supplementary Table S2). Immunostaining was blindly scored under a multihead microscope, by two readers (MV and MLT), including an experienced breast pathologist (MLT). For each marker, the staining intensity was scored as absent (0), weak (1+), moderate

(2+) or intense (3+). The percentage of stained tumor cells, as well as the staining localization (cytoplasmic and/or nuclear), was assessed for each biomarker. For each immunostaining, an immunoreactive score (IRS, ranging from 0 to 12) was calculated by multiplying the staining intensity (0,1,2,3) with the percentage of stained cells scored as follows:<1% stained cells=0, 1-10% stained cells=1, 11-50% stained cells=2, 51-80% stained cells=3, >80% stained cells=4.

**Statistical analyses.** Tumor growth curves in animals were analysed for significance by analysis of variance with Dunnett's multiple comparison tests. In other experiments, significant differences in the quantitative data between the control and the treated group were analysed using the Student's t-test for unpaired variables. In the figures, \*, \*\* and \*\*\* refer to P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively, compared with controls (vehicle) unless otherwise specified. Immunostaining data were summarized by frequency and percentage for categorical variables. Differences between the expression of the enzymes in tumor and normal tissues were analyzed using McNemar test for paired samples. Correlation between the immunoreactive score (multiplication between the percentage of positive cells and the staining intensity) in tumor sample and pathological characteristics were analyzed using  $\chi^2$  test or Fisher's exact test. For these statistical tests, differences were considered significant at the 5% level. Statistical analysis of the immunostaining data were performed using Stata 13.0 software and Prism software was used for the other analyses.

# Legends.

**Figure 1.** OCDO is produced and secreted from MCF7 tumor cells incubated with EC or CT. Representative TLC autoradiograms showing time dependent production of OCDO in MCF7 cells treated with <sup>14</sup>C- $\alpha$ EC (A,B) or <sup>14</sup>C- $\beta$ EC (C,D) or <sup>14</sup>C-CT (E, F) and quantitative analyses of the metabolites produced in each condition from three separate experiments (± s.e.m). The metabolites extracted from the cells (left panels) or from the medium (right panels) were analyzed by TLC analysis and the region corresponding to radioactive metabolites of interest were recovered and counted using a  $\beta$ -counter.

**Figure 2.** OCDO is a tumor promoter *in vitro* and *in vivo* and its inhibition contributes to the anti-tumor effects of Tam and DDA. (A, B) Histograms representing the effect of OCDO or  $17\beta$ -estrogen (E2) on MCF7 (A) and TS/A (B) cell proliferation after 24 h treatment using a colorimetric immunoassay measuring BrDU incorporation in DNA (C, D) Histogram

representing the effect of OCDO on MCF7 (C) and TS/A (D) cell invasion. Data are the mean of three separate experiments ( $\pm$  s.e.m), \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (Student's *t*-test). (E, F) Mice were implanted s.c. with MCF7 (E) or TS/A (F) cells and animals (8 per group) were treated s.c. every day starting on the day of implantation with either the solvent vehicle or OCDO (16 µg/kg for MCF7 or 50 µg/kg for TS/A). Animals were monitored for tumour growth twice a week. The data are representative of three independent experiments. The mean tumor volume ± s.e.m is shown, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (analysis of variance (ANOVA), Dunnett's post test). (G) Mean (± s.e.m) of Ki67 positive cell number determined by IHC staining of MCF7 tumor sections from (E), n=8, \*P<0.05 (Student's t-test) using HistoQuant, Pannoramic Viewer (3DHistech). (H) Representative Ki67 staining of TS/A tumor sections from (F) showing an increased staining in OCDO-treated tumor compared with control-treated tumor, magnification X50 (I, J, K). Murine E0771 (I), or human MDA-MB231 (J) or MDA-MB468 (K) cells implanted s.c. into mice (8 per group) and animals were treated s.c. with either the solvent vehicle or OCDO (16 µg/kg for MDA-MB-231 and MDA-MB-468 or 50 µg/kg for E0771). The data are representative of two independent experiments. Statistical analysis was performed as in E and F. (L) Mice were implanted s.c. with TS/A cells and animals (8 per group) were treated s.c. every day with either the solvent vehicle, OCDO (50 µg/kg), Tam (56 mg/kg), DDA (20 mg/kg) or the combination of Tam (56 mg/kg) + OCDO (50  $\mu$ g/kg) or DDA (20 mg/kg) + OCDO (50  $\mu$ g/kg). The data are representative of three independent experiments. Statistical analysis was performed as in E and F.

**Figure 3.** We hypothesized that  $11\beta$ -HSD type 2 (11HSD2) which catalyzes the dehydrogenation of cortisol into cortisone is the enzyme that produces OCDO from CT, and  $11\beta$ -HSD type 1 (11HSD1) which catalyzes the hydrogenation of cortisone into cortisol is the enzyme that realizes the reverse reaction (CT production from OCDO). We also hypothesized that H6PDH which produces the cofactor NADPH necessary for the 11 $\beta$ HSD1 reductase activity and the production of cortisol is also necessary for the production of CT.

**Figure 4**. 11 $\beta$ HSD2 and 11 $\beta$ HSD1 are the enzymes producing OCDO and CT respectively. HEK-273 cells (5 x 10<sup>6</sup> cells) were transfected by electroporation with the plasmids coding either the enzymes 11 $\beta$ HSD2 (HSD2), 11 $\beta$ HSD1 (HSD1), H6PDH, the control empty vector (mock) or were co-transfected with a plasmid coding 11 $\beta$ HSD1 or H6PDH, and analyzed as followed: (A) the expression of 11 $\beta$ HSD2 was confirmed by immunoblotting using a specific antibody against 11 $\beta$ HSD2 and normalized with actin; (B, C) the production of cortisone (B) or OCDO (C) was determined by incubating the mock or the HSD2-transfected cells with <sup>3</sup>Hcortisol or <sup>14</sup>C-CT for 8 h at 37°c respectively. Lipids extracted from the cell and the media were analyzed by TLC analysis and the region corresponding to radioactive metabolites of interest were recovered and counted using a  $\beta$ -counter; (D) the expression of 11 $\beta$ HSD1 and H6PDH was confirmed by immunoblotting using a specific antibody against 11 $\beta$ HSD1 or H6PDH and normalized with actin; (E, F) HEK-273 cells expressing 11 $\beta$ HSD1, H6PDH, both enzymes or the control empty vector (mock) were incubated either with <sup>3</sup>H-cortisone (E) or <sup>14</sup>C-OCDO (F) for 72 h and the radioactive metabolites of interest were analyzed as in B and C. The results in B, C, E, F are the mean (± s.e.m) of three experiments, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 (Student's *t*-test).

**Figure 5**. Ectopic expression of 11 $\beta$ HSD1 in MCF7 inhibits cell proliferation and OCDO reverses this effect. MCF7 cells were transfected by electroporation with a plasmid coding either the enzymes 11 $\beta$ HSD1 (HSD1) or the control empty vector (mock) and analyzed as followed: (A) the expression of 11 $\beta$ HSD1 was confirmed by immunoblotting using specific antibody against 11 $\beta$ HSD1 and normalized with actin; (B) The production of CT was determined by incubating the mock or the HSD1-transfected cells with <sup>14</sup>C-OCDO for 72 h at 37°c. The radioactive metabolites of interest were analyzed as in the legend of Fig. 4B. (C) The proliferation of the mock- or the HSD1-transfected MCF7 cells treated or not with 5  $\mu$ M OCDO for 24 h were analyzed as in Fig. 2A. The results in B and C are the mean ( $\pm$  s.e.m) of three to five experiments, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 (Student's *t*-test), ns: non specific.

**Figure 6**. Knock-down of 11 $\beta$ HSD2 decreases OCDO production, cell proliferation, invasion and survival in MCF7 cells. MCF7 cells (5 x 10<sup>6</sup> cells) were transfected by electroporation with a plasmid expressing a short-hairpin RNA (shRNA) against 11 $\beta$ HSD2 or a control shRNA, two clones (A and B) were selected and analyzed as followed: (A) the knock down of 11 $\beta$ HSD2 expression in MCF7 was confirmed by immunoblotting as described in Fig. 4 or by qPCR; (B, C) The quantification of cortisone (B) or OCDO (C) produced by the sh-Control (shC A and B) or the shHSD2-transfected cells (shHSD2 A and B) were measured as described in Fig 4. (D, E) The proliferation of sh-C or shHSD2 was measured using quantification of colony by sh-C or shHSD2 MCF7 cells was quantified after cell fixing and crystal violet staining. The results are the mean ( $\pm$  s.e.m) of three to five experiments,\*P<0.05, \*\**P*<0.01 (Student's *t*-test). Figure 7. Knock-down of 11BHSD2 decreases cell proliferation, invasion and survival in MCF7 cells as well as tumor growth and OCDO reverses these effects. shC or shHSD2 MCF7 cells were analyzed as followed: (A) The proliferation of sh-C or shHSD2 cells treated or not with OCDO 5 µM 24 h was measured using quantification of DNA BrDU incorporation as described in Fig. 2A. (B) The proliferation of sh-C or shHSD2 cells treated or not with increasing concentration of cortisone for 24 h was measured as in (A). (C) The invasiveness of sh-C or shHSD2 cells treated or not with OCDO 5 µM for 72 h was assayed using matrigel-coated filters. (D) the formation of colony by sh-C or shHSD2 cells treated or not with OCDO 1 µM was quantified as described in Fig. 6F. (E) Mice were implanted s.c. with shC or shHSD2 MCF7 cells (5 x  $10^6$  cells) and animals (8 per group) were treated s.c. every day starting on the day of implantation with either the solvent vehicle or OCDO (16 µg/kg). Animals were monitored for tumor growth twice a week. The data are representative of three independent experiments. The mean tumor volume ± s.e.m is shown, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (analysis of variance (ANOVA), Dunnett's post test). (F) Mean (± s.e.m) of Ki67 positive cell number determined by IHC staining of shC or shHSD2 MCF7 tumor sections from (E), n=8, \*P<0.05 (Student's *t*-test) using HistoQuant, Pannoramic Viewer (3DHistech).

**Figure 8**. Expression of 11 $\beta$ HSD2 and DHCR7 in tumor samples. Representative photography illustrating the immunostaining (in brown) of the indicated enzymes; A) Illustration of the high expression of 11 $\beta$ HSD2 in breast tumor and very low expression in the normal adjacent tissue; B) Illustration of the high expression of DHCR7 in the breast tumor and in the adipocytes surrounding the tumor. Magnification x40.

**Table 1.** Expression and activity of 11 $\beta$ HSD1 and 11 $\beta$ HSD2 in BC tumor cells. Different subtypes of breast cancer cells were analyzed for the expression of 11 $\beta$ HSD1 and 11 $\beta$ HSD2 by either qPCR or immunobloting as well as OCDO production by incubating tumor cells with <sup>14</sup>C-5,6 $\alpha$ -EC for 24 h as described in Fig.1. The amount of OCDO formed per hour was normalized to the number of cells. The results are the mean (± s.e.m) of two to three experiments.

**Table 2**. Expression of the enzymes regulating OCDO production in breast tumor patient samples and normal matched tissues. Immunohistology analyses using specific antibodies against the enzymes regulating OCDO production were scored as described in the "Materials and Methods" section. The IRS score (Immunoreactive score, ranging from 0-12) was calculated as described in the "Materials and Methods" section.

**Table 3.** Correlation between the expression of the enzymes generating OCDO and the histological grade and subtypes of the tumors. Immunohistology analyses using specific antibodies against the enzymes regulating OCDO production were scored as described in the "Materials and Methods" section. ER and PR positive tumors were defined by a finding of at least 10% of tumor cells by immunohistochemical analysis. HER2 positive tumors were defined by a finding of at least 10% of tumors cells with HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry assay or by a positivity of an in-situ hybridation assay. TN: triple negative (ER, PR and HER2 -), ns: nonsignificant. The IRS score (Immunoreactive score, ranging from 0-12) was calculated as described in the "Materials and Methods" section.

## Supplementary data:

Table S1: Patient and tumor characteristics. BMI: Body Mass Index.

**Table S2**: Description of the antibodies, clones, dilutions, antigen retrieval methods, scoring systems and cut-offs used in the immunohistology analyses. ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor; PTM: pre-treatment module; RTU: ready to use; ASCO/CAP: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists

## REFERENCES

- 1. Jordan, V.C. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer* **7**, 46-53 (2007).
- 2. Pitroda, S.P., Khodarev, N.N., Beckett, M.A., Kufe, D.W. & Weichselbaum, R.R. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5837-5841 (2009).
- 3. Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 673-676 (2012).
- 4. Poirot, M., Silvente-Poirot, S. & Weichselbaum, R.R. Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 683-689 (2012).
- 5. Nelson, E.R. *et al.* 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* **342**, 1094-1098 (2013).
- 6. Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science* **343**, 1445-1446 (2014).
- 7. de Medina, P. *et al.* Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat Commun* **4**, 1840 (2013).
- 8. de Medina, P., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Methods for determining the oncogenic condition of cell, use thereof, and methods for treating cancer. *Word Patent*, 2010/149941 (2010).

- 9. Sevanian, A. & McLeod, L.L. Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J Biol Chem* **261**, 54-59. (1986).
- 10. de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13520-13525 (2010).
- 11. Segala, G. *et al.* 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of Tamoxifen in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **86**, 175-189 (2013).
- 12. Sola, B. *et al.* Antiestrogen-binding site ligands induce autophagy in myeloma cells that proceeds through alteration of cholesterol metabolism. *Oncotarget* **4**, 911-922 (2013).
- 13. Chapman, K., Holmes, M. & Seckl, J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev* **93**, 1139-1206 (2013).
- 14. Gathercole, L.L. *et al.* 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects. *Endocr Rev* **34**, 525-555 (2013).
- 15. Lathe, R. & Kotelevtsev, Y. Steroid signaling: ligand-binding promiscuity, molecular symmetry, and the need for gating. *Steroids* **82**, 14-22 (2014).
- 16. Odermatt, A. & Nashev, L.G. The glucocorticoid-activating enzyme 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *J Steroid Biochem Mol Biol* **119**, 1-13 (2010).
- Kim, C.H. & Cho, Y.S. Selection and optimization of MCF-7 cell line for screening selective inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2. *Cell Biochem Funct* 28, 440-447 (2010).
- 18. Atanasov, A.G., Nashev, L.G., Schweizer, R.A., Frick, C. & Odermatt, A. Hexose-6phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett* **571**, 129-133 (2004).
- 19. Bujalska, I.J., Walker, E.A., Hewison, M. & Stewart, P.M. A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1205-1210 (2002).
- 20. de Medina, P., Paillasse, M.R., Payre, B., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **52**, 7765-7777 (2009).
- 21. Voisin, M., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. One step synthesis of 6-oxo-cholestan-3beta,5alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 782-785 (2014).
- 22. Alikhani-Koupaei, R. *et al.* Identification of polymorphisms in the human 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene promoter: functional characterization and relevance for salt sensitivity. *FASEB J* **21**, 3618-3628 (2007).
- 23. de Medina, P. *et al.* The prototypical inhibitor of cholesterol esterification, Sah 58-035 [3-[decyldimethylsilyl]-n-[2-(4-methylphenyl)-1-phenylethyl]propanamide], is an agonist of estrogen receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 139-149 (2006).



Résultats



Résultats



Fig. 3













Résultats



Fig 7

# Table 1

Cells	11	ISD1	11HSD2				
	mRNA	protein	mRNA	protein	OCDO production pmol/10 <sup>6</sup> cells/h s.e.m		
MCF-7	>35	-	26.5	+	10.6 2		
BT474	>35	-	26	+	5.76 1.5		
SKBr3	>35	-	27.1	+	3.5 0.3		
ZR751	>35	-	25.2	+	9.3 1		
MDA-MB- 468	>35	-	24.2	+	23.9 3.4		
MDA231- MB-	28.2	-	28.5	+	2 0.4		
HCC1937	33	-	28.0	+	7.3 0.3		
LCC1	>35	-	23.7	+	19.5 2.2		
LCC2 (TamR)	>35	-	23.6	+	29.3 9		
RTx6 (TamR)	>35	-	25.4	+	2 0.1		
TS/A	35	-	26	ND	9.5 0.1		
E0771	35	-	24	ND	22.5 4		

ND: not deterrmined

TamR: cells derived from MCF7 resistante to tamoxifen

# Table 2

Normal tissue

Tumor	
-------	--

Enzyme	n	Global expression IRS score [4-12] (%)	High expression IRS score [7-12] (%)	n	Global expression IRS score [4-12] (%)	High expression IRS score [7-12] (%)	p-value
11βHSD2	45	97,8	64,4	42	19,0	2,4	<0,0001
DHCR7	46	87,0	45,7	42	81,0	11,9	0,0001
D8D7I	46	100,0	45,7	42	73,8	19	0,0045
11βHSD1	45	24,4	4,4	41	39,0	2,4	ns
H6PDH	42	38,1	16,7	39	46,2	12,8	ns





# Table 3

	Grade					Subtypes								
	l II III p			HER2- HER2- p			ER-/PR- ER+/PR-	ER+/PR+	р	TN		р		
												No	Yes	
	(n=7)	(n=17)	(n=21)		(n=36)	(n=9)		(n=11)	(n=7)	(n=27)		(n=40)	(n=5)	
11HSD2														
High IRS score [7-12] (%)	3 (42.9%)	1 (5.9%)	7 (33.3%)	0.0417	6 (16.7%)	5 (55.6%)	0.0275	3 (27.3%)	3 (42.9%)	5 (18.5%)	ns	10 (25%)	1 (20%)	ns
	(n=7)	(n=18)	(n=20)		(n=36)	(n=9)		(n=12)	(n=7)	(n=26)		(n=39)	(n=6)	
High IRS score [7-12] (%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (40%)	0.0021	1 (2.8%)	7 (77.8%)	<0.0001	5 (41.7%)	2 (28.6%)	1 (3.8%)	0.0064	7 (17.9%)	1 (16.7%)	ns
D8D71	(n=7)	(n=19)	(n=20)		(n=36)	(n=10)		(n=12)	(n=7)	(n=27)		(n=41)	(n=5)	
High IRS score [7-12] (%)	0 (0%)	2 (10.5%)	6 (30%)	ns	5 (13.9%)	3 (30%)	ns	6 (50%)	0 (0%)	2 (7.4%)	0.0038	5 (12.2%)	3 (60%)	0.0307

# Table S1

Clinicopathological parameters	Level	n (%)
Age et diagnestie	≤60 years	30 (56.6%)
Age at diagnostic	> 60 years	23 (43.4%)
DMI	≤ 25	31 (58.5%)
BIVII	≤60 years   ≥ 60 years   ≥ 25   >25   ER+/PR+   ER+/PR-   ER-/PR-   Missing   No   Yes   Missing   No   Yes   Missing   I   II   II   IV   Missing   pN0   pN+   ≤2 cm   2.1-5 cm   > 5 cm   Missing	22 (41.5%)
	ER+/PR+	31 (59.6%)
Subtypes	ER+/PR-	14 (26.9%)
Subtypes	ER-/PR-	7 (13.5%)
	Missing	1
	No	45 (86.5%)
TN	Yes	7 (13.5%)
	Missing	1
	No	41 (80.4%)
HER2+	Yes	10 (19.6%)
	Missing	2
	0	2 (3.8%)
	1	17 (32.7%)
Tumor stage	П	24 (46.2%)
runior stage	III	6 (11.5%)
	IV	3 (5.8%)
	Missing	1
Pathologic nodal stage (nN)	pN0	26 (49.1%)
	pN+	27 (50.9%)
	≤2 cm	22 (44%)
Pathologic tumor size (nT)	2.1-5 cm	23 (46%)
	> 5 cm	5 (10%)
	Missing	3

Marker	Clone	Dilutio	Antigen retrieval	Company	Scoring system	Cut off
		n				
ER	EP1	RTU	PTM, target retrieval solution, pH high, Dako	DAKO, Glostrup, Denmark	% nuclei stained	Positive:> 10%
PR	PgR 636	RTU	PTM, target retrieval solution, pH high, Dako	DAKO, Glostrup, Denmark	% nuclei stained	Positive:> 10%
K167	MIB1	RTU	PTM, target retrieval solution, pH high, Dako	DAKO, Glostrup, Denmark	% nuclei stained	< 10%: Low 10-30%: Intermediate > 30%: High
HER2 (HercepTest™)	Polyclonal SK001	RTU	PTM, target retrieval solution, pH low, Dako	DAKO, Glostrup, Denmark	Score 0, 1+, 2+, 3+ following the HercepTest® kit scoring system updated according to ASCO/CAP guidelines	Score 0/1+: Negative Score 2+: Equivocal Score 3+: Positive
DHCR7	Polyclonal	1:50	PTM, target retrieval solution, pH low, Dako	Abcam, Cambridge, UK	% of cytoplasmic staining x intensity (IRS score)	Low or negative IRS: [0-6] High IRS: [7-12]
H6PDH	C-10	1 :100	PTM, target retrieval solution, pH low, Dako	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	% of cytoplasmic staining x intensity (IRS score)	Low or negative IRS: [0-6] High IRS: [7-12]
EBP	Polyclonal	1 :500	PTM, target retrieval solution, pH high, Dako	Abgent, San diego, CA, USA	% of cytoplasmic staining x intensity (IRS score)	Low or negative IRS: [0-6] High IRS: [7-12]
11β-HSD1	Monoclon al	1:50	PTM, target retrieval solution, pH high, Dako	Abcam, Cambridge, UK	% of cytoplasmic staining x intensity (IRS score)	Low or negative IRS: [0-6] High IRS: [7-12]
11β-HSD2	Polyclonal	1 :50	-	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	% of cytoplasmic staining x intensity (IRS score)	Low or negative IRS: [0-6] High IRS: [7-12]

# **Discussion**

Il y a presque 50 ans, Bischoff et *al.*, ont décrit que le cholestérol et les oxystérols pouvaient être des carcinogènes (Bischoff 1969). A la suite de travaux préliminaires de l'équipe (Silvente-Poirot et al. 2012; Silvente-Poirot & Poirot 2012a), nous avons cherché, à démontrer que l'OCDO, issu du métabolisme de la ChEH, est un promoteur de tumeur, dans des lignées de cancers mammaires et que les 11HSD sont impliquées dans sa biosynthèse.

Ainsi, dans cette étude, nous avons montré que l'OCDO est produit à partir des 5,6α-EC et 5,6β-EC et du CT, dans les MCF7, une lignée cancéreuse mammaire exprimant le ER. L'OCDO produit à partir du CT stimule, de manière dose dépendante, la prolifération et l'invasion de différentes lignées cellulaires qui expriment ou non le ER. Le traitement à l'OCDO, de tumeurs MCF7 ou TS/A implantées chez des souris immunodéficientes ou immunocompétentes, respectivement, augmente la pousse tumorale. L'analyse histologique de ces tumeurs a révélé que le marqueur de prolifération cellulaire, le Ki67 était augmenté dans les tumeurs traitées à l'OCDO comparé aux contrôles. De plus, l'OCDO augmente également, la pousse tumorale de lignées de cancers mammaires n'exprimant pas le ER, tels que les E0771 murines, ou les MDA-MB-231 et MDA-MB-468 humaine, *in vivo*. Ces données démontrent que l'OCDO est un promoteur de tumeur capable de stimuler la croissance tumorale en absence ou en présence d'œstradiol.

L'équipe à montré que l'inhibition de la ChEH, par le Tam ou la DDA contribuait à leurs effets anti-tumoraux. Ces effets sont observés *in vivo*, sur tumeurs TS/A implantées aux souris immunocompétentes, après traitement au Tam ou à la DDA. Un traitement à l'OCDO est capable de réverser l'inhibition de la pousse tumorale induite par les inhibiteurs de la ChEH, suggérant que l'inhibition de la production de l'OCDO contribue aux effets anti-tumoraux du Tam et de la DDA.

Dans le but de caractériser les enzymes responsables de la production d'OCDO et conformément à notre hypothèse, nous avons montré que la surexpression de la 11HSD1et de l'H6PD, ou de la 11HSD2 dans des cellules HEK 293 entières, grâce à l'utilisation de plasmides codants pour ces enzymes, permet la biosynthèse du CT en OCDO, respectivement. L'étude de diverses lignées tumorales humaines reflétant différents sous-types de cancers du sein, a permis de caractériser les niveaux d'expressions de ces enzymes dans des cellules tumorales mammaires. Ainsi, la 11HSD1 n'est pas exprimée, alors que des niveaux significatifs d'ARNm et de protéines codantes pour la 11HSD2 ont été retrouvés. De plus,

nous avons montré que toutes les lignées cancéreuses testées produisent de l'OCDO. L'ensemble de ces observations, permet de démontrer que les 11HSD1 et 11HSD2 sont bien impliquées dans le contrôle de la biosynthèse de l'OCDO.

De plus, nous avons observé que la 11HSD2 contrôle la prolifération des cellules tumorales par la production d'OCDO *in vitro et in vivo*, grâce à l'utilisation de shRNA dirigé contre la 11HSD2 dans des cellules MCF7 et par des études de réversion, par le traitement à l'OCDO, des effets de l'inhibition de la 11HSD2. D'un autre coté, la ré-expression de la 11HSD1, dans des cellules tumorales dépourvues de cette enzyme (cellules MCF7), inhibe la prolifération cellulaire par transformation de l'OCDO en CT et l'ajout d'OCDO réverse cet effet. Ainsi, l'inactivation de la 11HSD2 non seulement, favorise l'inflammation et diminue l'inhibition de la prolifération de la prolifération du cortisol en cortisone, mais produit également de l'OCDO, un promoteur de tumeur, qui stimule donc la prolifération et l'invasion des tumeurs.

Des analyses immunohistologiques indiquent que l'expression des enzymes produisant l'OCDO : les 11HSD2, D8D7I et DHCR7, est augmentée ou plus élevée dans les tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein, comparé aux tissus normaux. Ceci indique que l'expression des enzymes de ce métabolisme est en faveur de la production d'OCDO dans les tumeurs. De plus, leur expression est corrélée à l'agressivité des tumeurs (ER et/ou RP négatif, surexpression d'HER2), et/ou à des grades élevés. La 11HSD2 est également présente dans des cellules du système vasculaire, ce qui indique que l'OCDO pourrait agir à distance des tumeurs grâce à sa dissémination dans le sang. Ces résultats sont cohérents avec l'activité protumorale et proinvasive de l'OCDO que nous montrons dans cette étude.

Ainsi, nous avons caractérisé, impact majeur dans la biologie des tumeurs. La production des CE, CT, OCDO et de la DDA, ainsi que l'expression des enzymes produisant ces métabolites pourraient être des biomarqueurs des cancers du sein et de l'efficacité de traitements anti-cancéreux comme le Tam ou la DDA. Les enzymes régulant et produisant l'OCDO pourraient également être des cibles thérapeutiques innovantes pour les cancers du sein et probablement pour d'autres cancers.dans les cancers du sein, une nouvelle fonction des 11HSD1 et 11HSD2 dans le métabolisme du cholestérol, ainsi qu'une nouvelle voie métabolique issue du cholestérol, impliquant les enzymes régulant la conversion du cortisol et de la cortisone. Cette voie mène à la formation de l'OCDO, un onco-métabolite promoteur de tumeur, dans les cancers du sein exprimant ou non les ER. Cette découverte devrait avoir un impact majeur dans la biologie des tumeurs. La production des CE, CT, OCDO et de la DDA,

ainsi que l'expression des enzymes produisant ces métabolites pourraient être des biomarqueurs des cancers du sein et de l'efficacité de traitements anti-cancéreux comme le Tam ou la DDA. Les enzymes régulant et produisant l'OCDO pourraient également être des cibles thérapeutiques innovantes pour les cancers du sein et probablement pour d'autres cancers.

# **DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES**

Le cancer est la maladie responsable du plus grand nombre de décès dans les pays industrialisés. La recherche internationale réalise des progrès dans les développements de nouvelles thérapies et dans la compréhension des mécanismes de tumorigénèse. En effet, de nombreuses avancées ont mis en évidence de nouvelles voies de signalisation, protéines ou gènes, induisant la survenue ou la progression des cancers, pouvant être utilisés comme biomarqueurs de l'état cancéreux ou de la réponse au traitement ; ainsi que le développement de thérapies ciblées. Cependant de nombreux cancers restent sans thérapies adaptées. Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme mais est également l'un des mieux connus et combattus. Le médicament de référence dans le traitement et la chémoprévention des cancers du sein est le Tamoxifène (Tam). L'équipe du Dr. Poirot et du Dr. Silvente-Poirot, dans laquelle j'ai effectué mon doctorat, s'intéresse depuis de nombreuses années à l'étude de la pharmacologie du Tam. Ainsi, ils ont découvert une nouvelle voie métabolique, impliquée dans les cancers, centrée sur la Cholestérol Epoxyde Hydrolase (ChEH). En plus du ciblage du récepteur des œstrogènes (ER), les travaux de l'équipe ont pu mettre en évidence que le Tam exerce une partie de ses effets anticancéreux en se fixant sur le site de liaison microsomal des anti-œstrogènes (AEBS), portant l'activité ChEH. Ainsi les effets bénéfiques du Tam sont concomitants à sa modulation du métabolisme du cholestérol centré sur la ChEH et permettent le contrôle de la différenciation cellulaire et la pousse tumorale des cancers.

Durant mon doctorat, j'ai réalisé des travaux démontrant l'implication du métabolisme du cholestérol dans le contrôle de processus tumoraux dans les cancers du sein. Dans un premier temps, nous avons découvert une nouvelle molécule à la frontière entre le métabolisme du cholestérol et de l'histamine, la Dendrogénine A (DDA), présente naturellement dans des tissus sains murins et humains. La DDA est le premier alcaloïde steroïdien découvert chez les mammifères (Article 1). La DDA possède des effets différenciants et cytotoxiques sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, y compris sur des lignées mammaires. Elle n'a pas été détectée dans les lignées cellulaires cancéreuses et sa concentration dans des tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein est inférieure, de cinq fois, à sa concentration dans les tissus sains adjacents à la tumeur. Ceci suggère une dérégulation de la production de DDA dans les cancers.

*In vivo*, des traitements à la DDA chez la souris, diminuent fortement la croissance de tumeurs implantées, et induisent une augmentation de leur survie. Ces observations démontrent que la DDA possède des propriétés anti-tumorales. La forte réduction des taux de DDA dans les tumeurs mammaires et son activité anticancéreuse, nous permettent d'avancer l'hypothèse que la DDA pourrait être un métabolite suppresseur de tumeur. Le fait que la
production de DDA ne s'effectue qu'en présence d'extraits de cerveaux de souris et qu'elle soit sélective des  $5,6\alpha$ -EC, qui ont été montrées comme réagissant seulement dans des conditions catalytiques, suggère qu'une enzyme est responsable de la biosynthèse de la DDA. Afin d'approfondir nos connaissances sur cette molécule et son métabolisme, il nous a semblé nécessaire d'identifier l'enzyme responsable de la production de la DDA. L'identification de cette enzyme, au sein du laboratoire, a permis de démontrer que son expression est fortement diminuée dans les tumeurs, parallèlement à une diminution du taux de DDA dans ces tumeurs mammaires de patientes, comparé aux tissus sains adjacents. La caractérisation du métabolisme de la DDA, comme par exemple son transport intracellulaire ou sa catabolisation, pourrait aussi permettre de comprendre sa diminution ou son absence dans les tumeurs et dans les lignées cellulaires cancéreuses.

Nous avons montré que la DDA induit également la différenciation des cellules de mélanomes et de cancers du sein, ainsi que des monocytes en cellules dendritiques (De Medina, Paillasse, et al. 2009). Ceci laisse à penser que la DDA puisse être un acteur général de la différenciation cellulaire dans les organismes murins et humains, en intervenant dans la différenciation des tissus. La présence de DDA dans le cerveau des souris et sa capacité à induire la différenciation de précurseurs de neurones en neurones (De Medina, Paillasse, et al. 2009; Khalifa et al. 2014) suggère que la DDA puisse être impliquée dans des programmes de différenciation de neurones au cours du développement. L'étude du métabolisme de la DDA dans le domaine de la biologie du développement pourrait permettre de mieux comprendre son rôle physiologique, en plus de ces effets anticancéreux qui sont pour l'instant les plus étudiés. Il sera très intéressant de compléter les connaissances acquises sur la DDA en découvrant les cibles et mécanismes d'action de cette molécule. Du fait que la DDA soit un aminostérol, nous pouvons envisager qu'elle puisse cibler différentes voies impliquées dans les mécanismes attribués aux oxystérols. Ainsi, l'équipe a envisagé que des récepteurs, comme les LXR, pouvaient être la cible de la DDA. Les LXR sont des facteurs de transcription, qui régulent le métabolisme du cholestérol et des lipides dans différents tissus mais également, la réponse inflammatoire au niveau des macrophages (Zelcer & Tontonoz 2006), et pourraient donc expliquer les effets observés de la DDA sur le contrôle de l'immunité. Un article de l'équipe en révision dans Cancer Cell (Ségala, David, de Medina, et al.,), démontre sur des lignées de leucémies et mélanomes qu'une partie de l'activité antitumorale de la DDA, est due à sa liaison sur les LXR. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'implication d'autres protéines permettant la régulation du métabolisme des lipides, qui pourraient être des cibles de la DDA, comme SREBP, permettant le rétrocontrôle de la synthèse du cholestérol.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressée à caractériser les effets de l'OCDO ainsi qu'aux enzymes responsables de sa biosynthèse. L'OCDO est un métabolite oxvdé du CT, issu de la ChEH. Des travaux précédents de l'équipe, ont montré que l'OCDO serait un promoteur de tumeur dans différentes lignées cellulaires tumorales. Grâce au développement d'une nouvelle méthode de synthèse en une seule étape, adaptée à la production de CT et d'OCDO radiomarqué au 14C (Article 2), j'ai pu approfondir nos connaissances de cette molécule. Ainsi, j'ai montré in vitro et in vivo, que dans des lignées de cancers du sein caractéristiques de différents phénotypes des cancers mammaires, l'OCDO est un oncométabolite. Ainsi, il augmente la prolifération, l'invasion et la pousse tumorale de différentes lignées exprimant ou non le RE (Article 3). L'effet de l'OCDO sur des lignées ER négatives, est une particularité importante de cette molécule. En effet le 27-OHC, un oxystérol oxydé sur la chaine latérale et possédant des effets de promoteur de tumeur, n'est pas capable d'induire de tels effets sur des lignées ou tumeurs implantées chez la souris n'exprimant pas le ER (Q. Wu et al. 2013; Nelson et al. 2013). Il a été montré précédemment, que l'inhibition de la ChEH, par le Tam ou la DDA contribuait à leurs effets anti-tumoraux. Une partie de cette étude a permis de montrer in vivo, qu'un traitement à l'OCDO est capable de réverser l'inhibition de la pousse tumorale induite par les inhibiteurs de la ChEH. Ceci suggère que l'inhibition de la production de l'OCDO au niveau de la ChEH, contribue aux effets antitumoraux du Tam et de la DDA.

De manière intéressante, nous avons montré une relation entre le métabolisme du cholestérol et des glucocorticoïdes, puisque la 11-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11HSD1), responsable de réduction de la cortisone en cortisol, et la 11-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11HSD2), qui catalyse la réaction inverse, contrôlent la biosynthèse de l'OCDO. Ainsi nous avons montré que la 11HSD2 transforme le CT en OCDO et que la 11HSD1, associée à l'H6PD permettant la régénération de son cofacteur, réduit l'OCDO en CT (Article 3). Nous avons étudié différentes lignées cellulaires de cancers du sein représentant différents phénotypes de cancer du sein et montré que la 11HSD2 était exprimée au niveau de l'ARNm et de la protéine, alors que la 11HSD1 n'est pas observée, et que chacune des lignées testées est capable de produire de l'OCDO. L'inhibition de la 11HSD2, par l'utilisation de shRNA dirigée contre l'ARNm codant pour la protéine, dans des cellules MCF7 diminue la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* ainsi que la pousse tumorale chez la souris, alors que la traitement à l'OCDO réverse ces effets. En parallèle, nous avons montré que la sur-

expression de la 11HSD1 dans des MCF7, qui n'exprime pas cette enzyme, inhibe la prolifération des cellules. Les résultats démontrent que ces enzymes sont impliquées dans le contrôle de la prolifération des tumeurs grâce à leur implication dans la formation d'OCDO. En complément, il pourrait être important de regarder si des mutations sur les enzymes menant à la production d'OCDO, en particulier des mutations sur la 11HSD2, sont liées à l'apparition de cette molécule dans les cancers.

Par la suite, nous avons étudié l'expression des enzymes, régulant la biosynthèse de l'OCDO dans des échantillons de patientes atteintes de cancer du sein et dans les tissus sains adjacents (n= 50, comprenant 7 tumeurs triples négative et 10 sur-exprimant HER2). Les analyses immunohistochimiques de ces échantillons ont révélé une surexpression de la 11HSD2 et des sous unités de la ChEH (D8D7I et DHCR7) dans les tumeurs comparées aux tissus sains adjacents. Ces résultats en faveur de la production d'OCDO dans les tumeurs, sont corrélés à l'agressivité des tumeurs (tumeurs triples négatives ou sur-exprimant HER2) et au grade tumoral. La 11HSD2 est également présente dans des cellules du système vasculaire, ce qui indique que l'OCDO pourrait agir à distance des tumeurs grâce à sa dissémination dans le sang. Cette observation suggère qu'une dérégulation du métabolisme en faveur de la production d'OCDO, serait responsable de la progression des cancers du sein, mais aussi de leur capacité à répondre au traitement. Ceci est en accord avec les observations de Pitroda, démontrant qu'une signature transcriptionnelle impliquant le métabolisme du cholestérol et de la ChEH (par la surexpression de la DHCR7) est impliqué dans la résistance des cancers du sein au Tam (Pitroda et al. 2009; Poirot et al. 2012).

Toutes ces données suggèrent que le 11HSD2 est une cible thérapeutique potentielle des cancers du sein. Il semble donc important d'envisager une inhibition de la production d'OCDO. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de haute affinité pour la 11HSD2 permettrait de réduire la production d'OCDO et donc ses capacités à induire la prolifération des tumeurs. Cependant, deux questions restent en suspens. Etant donné que le Tam inhibe la ChEH, et que son action anti-tumorale est liée à l'inhibition de la production d'OCDO, est-ce que l'augmentation des doses de Tam induira une inhibition totale de la formation d'OCDO dans les cancers ? Et quel pourrait être l'effet de l'inhibition de la 11HSD2 sur le métabolisme du cortisol ? Pour répondre à cette première question, il serait intéressant d'étudier l'expression des enzymes menant à la production de l'OCDO ainsi que de doser cette molécule, dans des échantillons de patientes avant ou après traitement au Tam. Il n'est pas impossible d'envisager que les cellules puissent s'adapter, suite au traitement par le Tam, afin de restaurer la production d'OCDO dans les cancers, en suractivant les enzymes menant à une

## Discussions et perspectives

production forcée de l'OCDO. Ce mécanisme, s'il est vérifié, pourrait être à l'origine de résistances acquises au Tam, des cancers du sein. Quant à l'inhibition de la production de cortisone dans les cancers et donc à une accumulation de cortisol, cela mènerait à une probable augmentation de l'inhibition de la prolifération et de l'apoptose induite par le cortisol. Cependant, nous avons vu que des dérégulations de la biosynthèse du cortisol pouvaient être reliées à de nombreux troubles comme de l'hypertension, des maladies inflammatoires, ou des diabètes de type 2. De plus, il n'est pas à exclure que l'OCDO puisse avoir des effets biologiques autres que ses propriétés de promoteur de tumeur. Ainsi, le développement d'inhibiteurs sélectifs de la 11HSD2, permettant un ciblage spécifique de la production d'OCDO dans les cancers du sein, semble être un élément essentiel à l'utilisation du ciblage de la voie menant à l'OCDO, en tant que nouvelle cible thérapeutique des cancers du sein résistant au Tam.

Une meilleure compréhension du métabolisme, des effets et du mode d'action de l'OCDO est nécessaire. L'étude de son mode de transport, ainsi que de son catabolisme serait intéressante et pourrait faire l'objet d'un nouveau projet afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette molécule. Nous avons mis en évidence que l'OCDO était impliqué dans la progression des cancers du sein et probablement dans la formation de métastases. Il sera important de s'intéresser à ses effets sur l'angiogénèse, sur le contrôle du micro-environnement tumoral et sur l'immunité. Des analyses immunohistologiques approfondies, de tumeurs traitées à l'OCDO et implantées chez des souris immunocompétentes, répondraient à ces questions. La formation de tumeurs spontanées dans des souris sur-exprimant la 11HSD2, nous permettraient d'établir le potentiel initiateur des tumeurs, de l'OCDO.

La caractérisation des cibles et du mécanisme d'action de l'OCDO est nécessaire. De nombreuses voies de signalisation cellulaire, ont été démontrées comme étant largement impliquées dans la prolifération des cancers. La détermination de la modulation par l'OCDO, de voies canoniques, telles que mTOR, AKT/PI3K, NF-KB, PTEN ou HIF, serait une première piste d'étude du mécanisme d'action de l'OCDO. Du fait de son appartenance à la famille des oxystérols, il sera intéressant d'étudier si les effets de l'OCDO sont médiés par son intéraction avec les LXR ou le ER, tout comme le 27-OHC (Nelson et al. 2013; Q. Wu et al. 2013). L'implication des 11HSD dans la biosynthèse de la cortisone et de l'OCDO, suggère que le GR pourrait être un autre récepteur impliqué dans les effets de l'OCDO. Ces récepteurs, s'ils s'avéraient être responsables des propriétés de l'OCDO, pourraient être également des cibles thérapeutiques, permettant de diminuer les effets de l'OCDO.

Grâce à la caractérisation de la DDA et de l'OCDO, ainsi que de leurs effets, nous avons confirmé l'implication du métabolisme du cholestérol dans les cancers du sein. La caractérisation de ces deux molécules, aux effets opposés, remet en question l'utilisation des statines, médicament inhibant la production de cholestérol au niveau de la HMGCR, dans le cadre de la prévention des risques cardio-vasculaires pour les patients souffrant d'hypercholestérolémie. Ceci semble être cohérent avec la controverse que suscite leur utilisation dans le cadre de traitement des cancers du sein (McDougall et al. 2013). Ainsi le métabolisme de la ChEH mène à deux molécules aux effets antagonistes. Les modifications importantes dans les cancers du sein, de leur production et de l'expression des enzymes menant à leur formation, montre une dérégulation de la balance métabolique centrée sur la ChEH, en faveur de l'OCDO, un onco-métabolite promoteur de tumeur, dans les cancers du sein exprimant ou non les ER (Figure 43.).

Tout comme le cancer du sein, certains cancer de la prostate sont dépendants de l'expression des récepteurs hormonaux, qui dans le cas de ce cancer est le récepteur des androgènes (dont le principal est la testostérone). Du fait de ce parallèle, il sera intéressant d'étudier la dérégulation du métabolisme des 5,6-EC dans ce type de cancer ainsi que dans d'autres cancers, afin de savoir si elle est spécifique des cancers du sein ; si elle est caractéristique d'un type de cancer (montrant une forte sensibilité aux hormones, par exemple), ou si elle peut être généralisée à l'ensemble des cancers.

L'accumulation de cholestérol dans les tumeurs n'est pas une observation récente. Les travaux de White au début du XX<sup>ème</sup> siècle puis de Swyer dans les années 40, ont été les premiers à montrer une accumulation de cristaux de nature lipidique dans les tumeurs de la prostate et une augmentation de cholestérol dans les zones atteintes d'hypertrophie bénigne de la prostate par rapport aux tissus sains, respectivement (White 1909; Swyer 1942). Plus tard, des observations similaires ont été faites dans d'autres types de cancer, comme le cancer de la thyroïde, des reins, du colon ou les cancers gastrointestinaux (Dessì et al. 1994; Rudling & Collins 1996; Yoshioka et al. 2000). Deux mécanismes sont généralement utilisés pour expliquer ces résultats, tels que l'augmentation du captage du cholestérol circulant (Graziani et al. 2002; Tatidis et al. 2002) associée à la perte des mécanismes régulateurs de l'expression du récepteur des LDL (Chen & Hughes-Fulford 2001), ainsi que l'augmentation de l'expression des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol comme l'HMG-CoA réductase

(Caruso et al. 1999). Dans les deux cas, il s'agit de mécanismes favorisant la disponibilité intracellulaire du cholestérol au cours du développement tumoral.

D'un autre coté, une relation entre cholestérogénèse et survenue de cancer de la prostate a été montré. Swinnen *et al.*, ont montré que les androgènes, via le récepteur des androgènes, induisaient une accumulation de lipides dans les cancers de la prostate *in vitro* (Swinnen et al. 1996) et que l'expression des gènes *SREBP-1* et *SREBP-2*, impliqués dans la synthèse de cholestérol, était augmentée (Swinnen et al. 1997). Il a également été démontré une corrélation de l'activité accrue des SREBP-1 et 2 avec le développement de l'indépendance aux androgènes des cancers de la prostate (Ettinger et al. 2004) (Ettinger et al., 2004). De plus l'activation de SREBP-2 peut être augmentée par AKT (Luu et al. 2012), qui après phosphorylation, notamment au niveau des rafts lipidiques riches en cholestérol, stimule les processus de survie et de croissance cellulaire dans les tumeurs (Lasserre et al. 2008).

De manière intéressante, une étude a montré que le gène codant la cassette d'efflux ABCA1 est 15 à 20 fois plus exprimé dans des cellules de cancer de prostate androgéno-dépendantes que dans des cellules androgéno-indépendantes (cancer plus avancé), indiquant une possible relation entre le niveau d'expression de *ABCA1* et la progression tumorale. De plus, ces travaux révèlent que les androgènes inhibent l'expression de *ABCA1* au niveau transcriptionnel par un mécanisme faisant intervenir le récepteur des androgènes (Fukuchi et al. 2004). Ceci suggère que l'inhibition de l'expression de *ABCA1* par les androgènes pourrait être un mécanisme par lequel les androgènes stimulent la prolifération tumorale.

Plus récemment, des travaux menés *in vitro* montrent une diminution de l'expression des *LXR* dans des cellules devenues androgéno-indépendantes (Chuu et al. 2006). Puisque les LXR sont connus pour stimuler l'expression de *ABCA1*, ces dernières données sont en accord avec le fait que la diminution d'expression de *ABCA1* soit observée dans ces mêmes cellules.

Les LXR, qui sont des pistes de choix pour l'étude du mécanisme d'action de l'OCDO, jouent donc un rôle important dans la progression des cancers de la prostate (de Boussac et al. 2013). De plus, la prostate est un site secondaire de synthèse du cholestérol, ce qui implique que les enzymes composant le site AEBS sont présentes dans cet organe et pourraient porter une activité ChEH. Cependant aucune donné de la littérature ne rend compte de cette hypothèse, qui reste donc à confirmer.

Il est intéressant de noter qu'un essai clinique de phase II testant le tesmilifène (ligand sélectif 209

d'AEBS) avec mitoxantrone-prednisone a montré des résultats assez encourageants quand au traitement des cancers de la prostate (Raghavan et al. 2005). Ces différentes observations pourraient nous mener à étudier l'implication du métabolisme de la ChEH, et notamment le rôle de l'OCDO, dans la progression des cancers, en plus du cancer du sein, et notamment le cancer de la prostate.

Les premières observations faites au laboratoire, montrent que l'OCDO est présent dans différents cancers comme les cancers de la thyroïde, ou dans les mélanomes, alors que la DDA est présente dans tous les tissus normaux testés, et absente de différentes lignées cancéreuses. De plus, puisque la DDA est l'inhibiteur naturel de la ChEH le plus puissant, cela signifie qu'elle exerce un contrôle de la production d'OCDO, ce qui permet d'inhiber sa formation dans le tissu sain.



**Figure 43: Dérégulation de la balance métabolique centrée sur la ChEH dans les cancers du sein.** Le métabolisme centré sur la ChEH, mène à la formation dans les tissus sains d'une molécule aux effets suppresseur de tumeurs, et à la formation d'OCDO, aux propriétés de promoteur de tumeurs, dans les tissus cancéreux. Ainsi, il semble exister une dérégulation de cette balance métabolique, menant à la formation d'OCDO dans les cancers du sein.

Les travaux menés durant ce doctorat ont largement contribué à améliorer les connaissances concernant l'implication des dérégulations du métabolisme du cholestérol dans les processus cancéreux. Les propriétés importantes de la DDA caractérisées dans un premier temps dans 210

les cancers du sein et les mélanomes, en font un candidat médicament, qui à l'heure actuelle, est en phase de développement pré-clinique dans le cadre des leucémies aigües myéloïdes. La dérégulation du métabolisme de la ChEH en faveur de la production d'OCDO, pourrait rendre compte de résistances aux traitements des cancers du sein. De ce fait, chacune des molécules, c'est-à-dire les 5,6-EC, CT, OCDO et DDA, ainsi que l'expression des enzymes impliquées dans ce métabolisme, pourraient être utilisées en tant que biomarqueurs des cancers du sein et de la réponse aux traitements anti-tumoraux, comme le Tam ou la DDA.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Ačimovič, J. & Rozman, D., 2013. Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis. *Molecules*, 18(4), pp.4002–4017.
- Ackermann, D. et al., 1999. Inhibition of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase by bile acids in rats with cirrhosis. *Hepatology*, 30(3), pp.623–629.
- Agarwal, a K. et al., 1989. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 betadehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 264(32), pp.18939–18943.
- Agarwal, A.K. et al., 1990. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase using recombinant vaccinia virus. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 4(12), pp.1827–1832.
- Agarwal, A.K. et al., 1995. Gene structure and chromosomal localization of the human HSD11K gene encoding the kidney (type 2) isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Genomics*, 29(1), pp.195–199.
- Albiston, A.L. et al., 1994. Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molecular and cellular endocrinology*, 105(2), pp.R11–R17.
- Alikhani-Koupaei, R. et al., 2007. Identification of polymorphisms in the human 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene promoter: functional characterization and relevance for salt sensitivity. *The FASEB Journal*, 21(13), pp.3618–3628.
- Alluri, P.G., Speers, C. & Chinnaiyan, A.M., 2014. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 16(6), p.494. Available at: http://breast-cancer-research.com/content/16/6/494.
- Alvarez, R.H., 2010. Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. *Breast cancer* research : BCR, 12 Suppl 2(Suppl 2), p.S1.
- André, F. et al., 2014. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: A multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *The Lancet Oncology*, 15(3), pp.267–274.
- Andrieu, T. et al., 2014. Insulin, CCAAT/Enhancer-Binding Proteins and Lactate Regulate the Human 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Gene Expression in Colon Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, 9(8), p.e105354. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105354.
- Andrieu, T. et al., 2014. Insulin, CCAAT/Enhancer-Binding Proteins and Lactate Regulate the Human 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Gene Expression in Colon Cancer Cell Lines J. A. Joles, ed. *PLoS ONE*, 9(8), p.e105354. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105354.
- Arimidex, T., 2008. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *The Lancet Oncology*, 9(1), pp.45–53.
- Aringer, L. & Eneroth, P., 1974. Formation and metabolism in vitro of 5,6-epoxides of cholesterol and beta-sitosterol. *Journal of lipid research*, 15(4), pp.389–398.
- Arizmendi, C. et al., 1999. The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein b regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), pp.13033–13040.
- Arnaldi, G. et al., 2003. Diagnosis and Complications of Cushing's Syndrome: A Consensus Statement. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. pp. 5593–5602.

- Arnold, P. et al., 2003. Glutamate-115 renders specificity of human 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 for the cofactor NAD+. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1-2), pp.177–187.
- Arriza, J.L. et al., 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4812), pp.268–275.
- Asensio, C., Muzzin, P. & Rohner-Jeanrenaud, F., 2004. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28 Suppl 4, pp.S45–S52.
- Ashwell, J.D., Lu, F.W. & Vacchio, M.S., 2000. Glucocorticoids in T cell development and function\*. *Annual review of immunology*, 18, pp.309–345.
- Atanasov, A.G. et al., 2008. Direct protein-protein interaction of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 1783(8), pp.1536–1543.
- Atanasov, A.G. et al., 2004. Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Letters*, 571(1-3), pp.129–133.
- Atanasov, A.G. et al., 2005. Organotins disrupt the 11??-hydroxysteroid dehydrogenase type 2dependent local inactivation of glucocorticoids. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), pp.1600–1606.
- Auphan, N. et al., 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5234), pp.286–290.
- Ayroldi, E. et al., 2012. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: Genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB Journal*, 26(12), pp.4805–4820.
- Backhaus, J., Junghanns, K. & Hohagen, F., 2004. Sleep disturbances are correlated with decreased morning awakening salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, 29(9), pp.1184–1191.
- Bai, Z. & Gust, R., 2009. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Archiv der Pharmazie*, 342(3), pp.133–149.
- Baker, M.E., 2004. Evolutionary analysis of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, -type 2, -type 3 and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 in fish. *FEBS Letters*, 574(1-3), pp.167–170.
- Balachandran, A. et al., 2008. Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11βhydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology*, 149(8), pp.4069–4079.
- Balazs, Z. et al., 2009. Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates the effect of inhibitors and alternative substrates of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301(1-2), pp.117–122.
- Barnes, P.J., 2014. Glucocorticoids. *Chemical immunology and allergy*, 100, pp.311–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925411.

- Barnes, P.J., 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. British journal of pharmacology, 148(3), pp.245–254.
- Barnes, P.J., 1995. Inhaled glucocorticoids for asthma. *The New England journal of medicine*, 332(13), pp.868–875.
- Baschant, U. & Tuckermann, J., 2010. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(2-3), pp.69–75. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.058.
- Baumann, H. et al., 1992. Role of CAAT-enhancer binding protein isoforms in the cytokine regulation of acute-phase plasma protein genes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), pp.19744–19751.
- Baxter, J.D. et al., 1971. Glucocorticoid receptors in lymphoma cells in culture: relationship to glucocorticoid killing activity. *Science (New York, N.Y.)*, 171(967), pp.189–191.
- Bedard, P.L. et al., 2008. Overcoming endocrine resistance in breast cancer Are signal transduction inhibitors the answer? *Breast Cancer Research and Treatment*, 108(3), pp.307–317.
- Benediktsson, R. et al., 1992. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary: high expression in the oocyte. *The Journal of endocrinology*, 135(1), pp.53–58.
- Beral, V. et al., 2002. Breast cancer and breastfeeding: Collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Lancet*, 360(9328), pp.187–195. Available at: http://europepmc.org/abstract/MED/12439712.
- Berrodin, T.J. et al., 2010. Identification of 5 \_ , 6 \_ -Epoxycholesterol as a Novel Modulator of Liver X Receptor Activity. *Molecular Pharmacology*, 78(6), pp.1046–1058.
- Berstein, L.M. et al., 2004. Long-Term Exposure to Tamoxifen Induces Hypersensitivity to Estradiol. *Clinical Cancer Research*, 10(4), pp.1530–1534.
- Bickel, M. & Kauffman, G.L., 1981. Gastric gel mucus thickness: effect of distention, 16,16-dimethyl prostaglandin e2, and carbenoxolone. *Gastroenterology*, 80(4), pp.770–775.
- Bischoff, F., 1969. Carcinogenic effects of steroids. Advances in lipid research, 7, pp.165–244.
- Björkhem, I., Einarsson, K. & Johansson, G., 1968. Formation and metabolism of 3-betahydroxycholest-5-en-7-one and cholest-5-ene-3-beta, 7-beta-diol. Bile acids and steroids 192. *Acta chemica Scandinavica*, 22(5), pp.1594–1605.
- Black, H.S., 1980. Analysis and physiologic significance of cholesterol epoxide in animal tissues. *Lipids*, 15(9), pp.705–709.
- Black, H.S. et al., 1979. Effects of dietary cholesterol on ultraviolet light carcinogenesis. *Cancer research*, 39(12), pp.5022–5027.
- Black, H.S. & Douglas, D.R., 1973. Formation of a carcinogen of natural origin in the etiology of ultraviolet light induced carcinogenesis. *Cancer Research*, 33(9), pp.2094–2096.
- Bland, R. et al., 1999. Characterization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and corticosteroid receptor expression in human osteosarcoma cell lines. *The Journal of endocrinology*, 161(3), pp.455–464.

- Blind, R.D. et al., 2012. Ligand structural motifs can decouple glucocorticoid receptor transcriptional activation from target promoter occupancy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(4), pp.839–844. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.084.
- Bloch, K., 1965. The Biological Synthesis of Cholesterol. Science, 150(C), pp.19-28.
- Blum, a, Martin, H.J. & Maser, E., 2000. Human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is enzymatically active in its nonglycosylated form. *Biochemical and biophysical research communications*, 276(2), pp.428–434.
- Bodin, K. et al., 2001. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. *The Journal of biological chemistry*, 276(42), pp.38685–38689.
- Borski, R.J., Hyde, G.N. & Fruchtman, S., 2002. Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release. *Steroids*, 67(6), pp.539–548.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G., 2003a. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews*, 24(4), pp.488–522.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G., 2003b. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews*, 24(4), pp.488–522.
- Bourgeois, S. & Newby, R.F., 1977. Diploid and haploid states of the glucocorticoid receptor gene of mouse lymphoid cell lines. *Cell*, 11(2), pp.423–430.
- De Boussac, H. et al., 2013. LXR, prostate cancer and cholesterol: the Good, the Bad and the Ugly. *Am J Cancer Res*, 3(1), pp.58–69. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359865.
- Boyer, J.L., 2013. Bile formation and secretion. Comprehensive Physiology, 3(3), pp.1035–1078.
- Brand, E. et al., 1998. Structural analysis and evaluation of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11beta-HSD2) gene in human essential hypertension. *Journal of hypertension*, 16(11), pp.1627–1633.
- Brandes, L.J., Macdonald, L.M. & Bogdanovic, R.P., 1985. Evidence that the antiestrogen binding site is a histamine or histamine-like receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 126(2), pp.905–910.
- Brenton, J.D. et al., 2005. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology*, 23(29), pp.7350–7360.
- Breuner, C.W. & Orchinik, M., 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *Journal of Endocrinology*, 175(1), pp.99–112.
- Brewer, J.A. et al., 2002. Green fluorescent protein-glucocorticoid receptor knockin mice reveal dynamic receptor modulation during thymocyte development. *Journal of immunology* (*Baltimore, Md. : 1950*), 169(3), pp.1309–1318.
- Brown, A.J. & Jessup, W., 2009. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), pp.111–122. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005.

- Brown, M.S. & Goldstein, J.L., 1980. Reductase, a Control Mechanism Coordinating. *Journal of lipid research*, 21(44).
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L., 1997. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3), pp.331–340. Available at: papers3://publication/uuid/F71F8D5D-3A7D-44B1-9188-5D3DDB583E97.
- Brown, R.W. et al., 1996. Cloning and production of antisera to human placental 11 betahydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Biochemical journal*, 313 (Pt 3, pp.1007–1017.
- Brown, R.W. et al., 1993. Human placental 11b-hydroxysteroid dehydrogenase: Evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology*, 132(6), pp.2614–2621.
- Bruera, E. et al., 1985. Action of oral methylprednisolone in terminal cancer patients: a prospective randomized double-blind study.,
- Bujalska, I.J. et al., 2002. A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(3), pp.1205–1210.
- Bujalska, I.J. et al., 2005. Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), pp.675–684.
- Bujalska, I.J., Shimojo, M., et al., 1997. Human 11β-hydroxysteroid dehydrogenase: Studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue. *Steroids*, 62(1), pp.77–82.
- Bujalska, I.J., Kumar, S. & Stewart, P.M., 1997. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*, 349(9060), pp.1210–1213.
- Burton, G. et al., 1995. Sodium-retaining activity of some natural and synthetic 21-deoxysteroids. *Molecular pharmacology*, 47(3), pp.535–543.
- Burton, P.J., Krozowski, Z.S. & Waddell, B.J., 1998. Immunolocalization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in rat uterus: variation across the estrous cycle and regulation by estrogen and progesterone. *Endocrinology*, 139(1), pp.376–382.
- Buxant, F., Engohan-Aloghe, C. & Noël, J.-C., 2010. Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 18(3), pp.254–257.
- Calkin, A.C. & Tontonoz, P., 2012. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterolactivated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), pp.213–224.
- Campino, C. et al., 2012. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 polymorphisms and activity in a Chilean essential hypertensive and normotensive cohort. *American journal of hypertension*, 25(5), pp.597–603. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278213.
- Caruso, M.G. et al., 1999. Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Research*, 19(1A), pp.451–454.

- Carvajal, C. a. et al., 2003. Two homozygous mutations in the 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(6), pp.2501–2507.
- Carvalho, J.F.S. et al., 2009. Efficient chemoenzymatic synthesis, cytotoxic evaluation, and SAR of epoxysterols. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(13), pp.4007–4019.
- Casale, F. et al., 2003. Determination of the in vivo effects of prednisone on Bcl-2 family protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International journal of oncology*, 22(1), pp.123–128.
- Cases, S. et al., 1998. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase. J. Biol. Chem, 273(41), pp.26755–26764. Available at: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:ACAT-2+,+A+Second+Mammalian+Acyl-CoA+:+Cholesterol+Acyltransferase#2.
- Castello, R. et al., 1989. Immunohistochemical localization of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in rat kidney with monoclonal antibody. *Renal physiology and biochemistry*, 12(5-6), pp.320–327.
- Cella, D. et al., 2006. Quality of life of postmenopausal women in the ATAC ("Arimidex", tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for early breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 100(3), pp.273–284.
- Chalasani, P. & Livingston, R., 2013. Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with "BRCAness": a review. *The oncologist*, 18(8), pp.909–16. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3755927&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Chan, J.T. & Black, H.S., 1974. Skin carcinogenesis: cholesterol-5alpha,6alpha-epoxide hydrase activity in mouse skin irradiated with ultraviolet light. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4170), pp.1216–1217.
- Chang, T.-Y. et al., 2006. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp.129–157.
- Chantong, B. et al., 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NFkappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p.260. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526453&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Chapman, K.E. et al., 2009. The role and regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the inflammatory response. *Molecular and cellular endocrinology*, 301(1-2), pp.123–131.
- Chapman, K.E., Holmes, M.C. & Seckl, J.R., 2013. 11B-Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiological reviews*, 93(3), pp.1139–206. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899562.
- Chast, F., 2013. Histoire de la corticothérapie. *Revue de Medecine Interne*, 34(5), pp.258–263. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2012.12.009.
- Chattopadhyay, A., Rao, B.D. & Jafurulla, M., 2015. *Solubilization of G Protein-Coupled Receptors* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687915000026.

- Chauhan, D. et al., 2002. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene*, 21(9), pp.1346–1358.
- Cheang, M.C.U. et al., 2015. Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression. *The Oncologist*, pp.474–482. Available at: http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2014-0372.
- Chen, B.-B. et al., 2009. The (+)- and (-)-gossypols potently inhibit human and rat 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 113(3-5), pp.177–181.
- Chen, Y. & Hughes-Fulford, M., 2001. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of lowdensity lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 91(1), pp.41–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149418.
- Cheng, Y.W. et al., 2005. Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), pp.617–622.
- Chia, S. et al., 2008. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), pp.5697–5704.
- Christy, C. et al., 2003. 11??-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mouse aorta: Localization and influence on response to glucocorticoids. *Hypertension*, 42(4 I), pp.580–587.
- Chuu, C.P. et al., 2006. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res*, 66(13), pp.6482–6486. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818617\nhttp://cancerres.aacrjournals.org/content/66/13 /6482.full.pdf.
- Cima, I. et al., 2004. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *The Journal of experimental medicine*, 200(12), pp.1635–1646.
- Clarke, J.L. & Mason, P.J., 2003. Murine hexose-6-phosphate dehydrogenase: A bifunctional enzyme with broad substrate specificity and 6-phosphogluconolactonase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415(2), pp.229–234.
- Clarke, K.A. et al., 2002. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in ovine placenta by fetal cortisol. *The Journal of endocrinology*, 172(3), pp.527–534.
- Clarke, R. et al., 2003. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, 22(47), pp.7316–7339.
- Clarke, R. et al., 2001. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacological reviews*, 53(1), pp.25–71.
- Cleary, J.F., 2014. Are Corticosteroids Effective in All Patients With Cancer-Related Pain? *Journal of Clinical Oncology*, 32(29), pp.3210–3211. Available at: http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2014.56.7701.
- Clemons, M. & Goss, P., 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine*, 344(4), pp.276–285. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11027744.

- Clynes, R. a et al., 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets. *Nature medicine*, 6(4), pp.443–446.
- Cohen, L. a, 1994. Re: "Diet in the epidemiology of postmenopausal breast cancer in the New York State cohort". *American journal of epidemiology*, 140(2), pp.190–193.
- Coleman, R.E., 1992. Glucocorticoids in cancer therapy. *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)*, 4(1), pp.37–44.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British journal of cancer*, 87(11), pp.1234–1245. Available at: http://europepmc.org/abstract/MED/12439712.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 347(9017), pp.1713–1727.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 350(9084), pp.1047–1059.
- Conde, I. et al., 2008. Glucocorticoid receptor changes its cellular location with breast cancer development. *Histology and Histopathology*, 23(1), pp.77–85.
- Cooper, M.S. et al., 2001. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(6), pp.1037–1044.
- Coutinho, A.E. & Chapman, K.E., 2011. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), pp.2–13. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005.
- Cushing, H., 1994. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). 1932. *Obesity Research*, 2(5), pp.482–487.
- Cybulski, C. et al., 2015. Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis. *The Lancet Oncology*, 2045(15), pp.1–7. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204515701427.
- Dahlman-Wright, K. et al., 2006. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews*, 58(4), pp.773–781. Available at: http://pharmrev.aspetjournals.org/content/58/4/773.short.
- Dallman, M.F. et al., 1993. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Frontiers in neuroendocrinology*, 14(4), pp.303–347.
- Daniel, A.R., Hagan, C.R. & Lange, C. a, 2011. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev. Endocrinol. Metab*, 6(3), pp.359–369.
- Danilo, C. & Frank, P.G., 2012. Cholesterol and breast cancer development. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), pp.677–682. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.009.

- Daubisse-Marliac, L. et al., 2011. Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: A population-based study from two French cancer registries. *Annals of Oncology*, 22(2), pp.329–334.
- DeBose-Boyd, R.A., 2008. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell research*, 18(6), pp.609–621.
- deFazio, A. et al., 1997. Antisense estrogen receptor RNA expression increases epidermal growth factor receptor gene expression in breast cancer cells. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(8), pp.903–911.
- Delmas, P.D. et al., 1997. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women.,
- Delmas, P.D., 2002. Treatment of postmenopausal osteoporosis. Lancet, 359(9322), pp.2018–2026.
- Deng, R. et al., 2006. Oxysterol 22 (R) -Hydroxycholesterol Induces the Expression of the Bile Salt Export Pump through Nuclear Receptor Farsenoid X Receptor but Not Liver X Receptor. *Pharmacology*, 317(1), pp.317–325.
- Deroo, B.J. & Korach, K.S., 2006. Review series estrogen receptors and human disease. *The Journal* of *Clinical Investigation*, 116(3), pp.561–570.
- Dessì, S. et al., 1994. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high-density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer*, 73, pp.253–258.
- Diederich, S. et al., 2000. In the search for specific inhibitors of human 11beta-hydroxysteroiddehydrogenases (11beta-HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11beta-HSD-I. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 142(2), pp.200–207.
- Dietrich, J. et al., 2011. Corticosteroids in brain cancer patients: benefits and pitfalls. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 4(2), pp.233–242.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D. & Spady, D.K., 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of lipid research*, 34(10), pp.1637–1659.
- Docquier, A. et al., 2013. Negative regulation of estrogen signaling by ERβ and RIP140 in ovarian cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(9), pp.1429–41. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885094.
- Dooley, R., Harvey, B.J. & Thomas, W., 2012. Non-genomic actions of aldosterone: From receptors and signals to membrane targets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), pp.223–234. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.019.
- Draper, N. et al., 2003. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nature genetics*, 34(4), pp.434–439.
- Draper, N. & Stewart, P.M., 2005. 11B-Hydroxysteroid Dehydrogenase and the Pre-Receptor Regulation of Corticosteroid Hormone Action. *Journal of Endocrinology*, 186(2), pp.251–271.

- Dzyakanchuk, A.A. et al., 2009. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 reductase activity is dependent on a high ratio of NADPH/NADP+ and is stimulated by extracellular glucose. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301(1-2), pp.137–141.
- Edwards, C.R. et al., 1988. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 2(8618), pp.986–989.
- Eijken, M. et al., 2006. The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), pp.87–93.
- El-Bayoumy, K. et al., 1996. Lack of tumorigenicity of cholesterol epoxides and estrone-3,4-quinone in the rat mammary gland. *Cancer Research*, 56(9), pp.1970–1973.
- Ellis, I.O. et al., 1992. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationshi<sup>^</sup>p with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 20(1), pp.479–489.
- Ellmann, S. et al., 2009. Estrogen and progesterone receptors : from molecular structures to clinical targets. , pp.2405–2426.
- Escobar, P.F. et al., 2007. The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage reclassification on survival and future comparisons among stage groups. *Annals of surgical oncology*, 14(1), pp.143–147.
- Espenshade, P.J. & Hughes, A.L., 2007. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual review of genetics*, 41, pp.401–427.
- Ettinger, A.B. & Portenoy, R.K., 1988. The use of corticosteroids in the treatment of symptoms associated with cancer. *Journal of pain and symptom management*, 3(2), pp.99–103.
- Ettinger, S.L. et al., 2004. Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer research*, 64(6), pp.2212–2221. Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-2148-2.
- Eyre, L.J. et al., 2001. Expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase in rat osteoblastic cells: Prereceptor regulation of glucocorticoid responses in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(3), pp.453–462.
- Fan, Z. et al., 2011. Direct regulation of glucose and not insulin on hepatic hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11??-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 333(1), pp.62–69.
- Feigelson, H.S. et al., 2008. Genetic variation in candidate obesity genes ADRB2, ADRB3, GHRL, HSD11B1, IRS1, IRS2, and SHC1 and risk for breast cancer in the Cancer Prevention Study II. *Breast cancer research : BCR*, 10(4), p.R57.
- Feng, Z. et al., 1995. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *Journal of Cell Biology*, 131(4), pp.1095–1103.
- Ferrari, P., 2010. The role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(12), pp.1178–1187. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.017.

- Ferrari, P., Bianchetti, M. & Frey, F.J., 2001. Juvenile hypertension, the role of genetically altered steroid metabolism. *Hormone Research*, 55(5), pp.213–223.
- Ferrari, P., Lovati, E. & Frey, F.J., 2000. The role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Journal of hypertension*, 18(3), pp.241–248.
- Di Fiore, P.P. et al., 1987. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* (*New York, N.Y.*), 237(4811), pp.178–182.
- Ford, D. et al., 1998. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. , 1, pp.676–689. Available at: http://discovery.ucl.ac.uk/175125/.
- Franchimont, D., 2004. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: A good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, pp.124–137.
- Franks, P.W. et al., 2004. Interaction between an 11bHSD1 gene variant and birth era modifies the risk of hypertension in Pima Indians. *Hypertension*, 44(5), pp.681–688.
- Frederickson, D.S. & Ono, K., 1956. The in vitro production of 25- and 26-hydroxycholesterol and their in vivo metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 22(1), pp.183–184.
- Freeman, L. et al., 2005. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood*, 106(6), pp.2042–2049.
- Frey, F.J., Odermatt, A. & Frey, B.M., 2004. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 13(4), pp.451–458.
- Frick, C. et al., 2004. Appropriate function of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the endoplasmic reticulum lumen is dependent on its N-terminal region sharing similar topological determinants with 50-kDa esterase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), pp.31131–31138.
- Friedberg, M. et al., 2003. Modulation of 11??-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(1), pp.385–393.
- Friso, S. et al., 2008. Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis*, 199(2), pp.323–327.
- Fu, X. et al., 2001. 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Ligand for Liver X Receptor in Cholesterol-loaded Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), pp.38378–38387.
- Fuda, H. et al., 2007. Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *Journal of lipid research*, 48(6), pp.1343–1352.
- Fukuchi, J. et al., 2004. Androgenic Suppression of ATP-binding Cassette Transporter A1 Expression in LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 64(21), pp.7682–7685. Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/21/7682\nhttp://cancerres.aacrjournals.org/content/6 4/21/7682.full.pdf\nhttp://cancerres.aacrjournals.org/content/64/21/7682.long\nhttp://www.ncbi. nlm.nih.gov/pubmed/15520169.

- Fuller, P.J., 2015. Novel interactions of the mineralocorticoid receptor. Molecular and Cellular<br/>Endocrinology, 408, pp.33–37. Available at:<br/>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720715000386.
- Funder, J.W. et al., 1988. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4878), pp.583–585.
- Funder, J.W., 1990. Target tissue specificity of mineralocorticoids. Trends in Endocrinology and Metabolism, 1(3), pp.145–148.
- Gabitova, L., Gorin, A. & Astsaturov, I., 2014. Molecular pathways: sterols and receptor signaling in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(1), pp.28–34. Available at: http://clincancerres.aacrjournals.org.9363.emedia1.bsb-muenchen.de/content/20/1/28.full.
- Galigniana, M.D. et al., 1997. Features of the shuttle pair 11b-hydroxyprogesterone-11ketoprogesterone. *Steroids*, 62(4), pp.358–364.
- Galili, U., 1983. Glucocorticoid induced cytolysis of human normal and malignant lymphocytes. *Journal of steroid biochemistry*, 19(1B), pp.483–490.
- Galliher-Beckley, a. J., Williams, J.G. & Cidlowski, J. a., 2011. Ligand-Independent Phosphorylation of the Glucocorticoid Receptor Integrates Cellular Stress Pathways with Nuclear Receptor Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31(23), pp.4663–4675.
- Gambineri, A. et al., 2011. A combination of polymorphisms in HSD11B1 associates with in vivo 11b-HSD1 activity and metabolic syndrome in women with and without polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 165(2), pp.283–292.
- Gambineri, A. et al., 2006. Genetic variation in 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(6), pp.2295–2302.
- Gangnon, R.E. et al., 2015. The Contribution of Mammography Screening to Breast Cancer Incidence Trends in the United States: An Updated Age-period-cohort Model. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. Available at: http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-14-1286.
- Gao, X. & Nawaz, Z., 2002a. Progesterone receptors animal models and cell signaling in breast cancer Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. , 4(5).
- Gao, X. & Nawaz, Z., 2002b. Progesterone receptors animal models and cell signaling in breast cancer Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 4(5), pp.182–186.
- Garbrecht, M.R. & Schmidt, T.J., 2013. Expression and Regulation of 11- β Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Enzyme Activity in the Glucocorticoid-Sensitive CEM-C7 Human Leukemic Cell Line. *ISRN oncology*, 2013, p.245246. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3613071&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Gasco, M., Shami, S. & Crook, T., 2002. The p53 pathway in breast cancer. *Breast cancer research*: *BCR*, 4(2), pp.70–76.

- Gathercole, L.L. et al., 2013. 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Translational and Therapeutic Aspects. *Endocrine Reviews*, 34(4), pp.525–555.
- Gathercole, L.L. & Stewart, P.M., 2010. Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1-3), pp.21–27. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.060.
- Geley, S. et al., 1996. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer Research*, 56(21), pp.5033–5038.
- Gelissen, I.C. et al., 2006. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to ApoA-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(3), pp.534–540.
- Gesina, E. et al., 2004. Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes*, 53(9), pp.2322–2329.
- Gill, S., Chow, R. & Brown, A.J., 2008. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. *Progress in Lipid Research*, 47(6), pp.391–404. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2008.04.002.
- Giustina, a & Wehrenberg, W.B., 1992. The role of glucocorticoids in the regulation of Growth Hormone secretion: mechanisms and clinical significance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 3(8), pp.306–311.
- Gjorevski, N. & Nelson, C.M., 2011. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(9), pp.581–593. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrm3168.
- Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Development*, 14(2), pp.121–141.
- Glomset, J. a, 1968. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *Journal of lipid research*, 9(2), pp.155–167.
- Goldberg, F.W. et al., 2012. Free-wilson and structural approaches to Co-optimizing human and rodent isoform potency for 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11??-HSD1) inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(23), pp.10652–10661.
- Goldhirsch, a. et al., 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*, 24(9), pp.2206–2223.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), pp.425–430.
- Gomez-Sanchez, E.P. et al., 2008. Hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11b-hydroxysteroid dehydrogenase-1 tissue distribution in the rat. *Endocrinology*, 149(2), pp.525–533.
- Gomez-Sanchez, E.P. et al., 2003. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the rat kidney by estradiol. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285(2), pp.E272–E279.

- Gomez-Sanchez, E.P. et al., 1997. The sheep kidney contains a novel unidirectional, high affinity NADP(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD-3). *Steroids*, 62(5), pp.444–450.
- Goncalves, R. et al., 2014. New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast Cancer Research*, 16(5), p.460. Available at: http://breast-cancer-research.com/content/16/5/460.
- Gong, H. et al., 2008. Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase. *Cancer Research*, 68(18), pp.7386–7393.
- Gorin, A., Gabitova, L. & Astsaturov, I., 2012. Regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), pp.710–716.
- Graber, R.P. et al., 1956. Notes The Oxidation of Cholesterol by Periodic Acid. *The Journal of Organic Chemistry*, 21(12), pp.1517–1518. Available at: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo01118a606.
- Gray, J.M. & Ziemian, L., 1992. Antiestrogen binding sites in brain and pituitary of ovariectomized rats. *Brain Research*, 578(1-2), pp.55–60.
- Graziani, S.R. et al., 2002. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecologic* oncology, 85, pp.493–497.
- Grossmann, C. & Gekle, M., 2012. Interaction between mineralocorticoid receptor and epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), pp.235–241. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.045.
- Gruenke, L.D. et al., 1987. Breast fluid cholesterol and cholesterol epoxides: Relationship to breast cancer risk factors and other characteristics. *Cancer Research*, 47(20), pp.5483–5487.
- Guastalla, J.P. & Diéras, V., 2003. The taxanes: toxicity and quality of life considerations in advanced ovarian cancer. *British journal of cancer*, 89 Suppl 3, pp.S16–S22.
- Hachey, D.L., Dawling, S. & Roodi, N., 2003. Sequential Action of Phase I and II Enzymes Cytochrome P450 1B1 and Glutathione S-Transferase P1 in Mammary Estrogen Metabolism Sequential Action of Phase I and II Enzymes Cytochrome P450 1B1 and Glutathione S-Transferase P1 in Mammary Estrogen Metabolism. *Cancer Research*, 63, pp.8492–8499.
- Haddad, T.C. & Goetz, M.P., 2015. Landscape of Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. Available at: http://link.springer.com/10.1245/s10434-015-4405-7.
- Hadoke, P.W. et al., 2001. Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Circulation*, 104(23), pp.2832–2837.
- Hala, M. et al., 1996. Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *International Journal of Cancer*, 68(5), pp.663–668.
- Hall, J.M. et al., 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.,
- Hall, R.E. et al., 1990. Steroid hormone receptor gene expression in human breast cancer cells: inverse relationship between oestrogen and glucocorticoid receptor messenger RNA levels. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 46(6), pp.1081–1087.

- Han, J. et al., 2001. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp.11318–11323.
- Hanukoglu, I., 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 43(8), pp.779–804. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217824.
- Hardy, R.S. et al., 2006. Differential expression, function and response to inflammatory stimuli of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fibroblasts: a mechanism for tissue-specific regulation of inflammation. *Arthritis research & therapy*, 8(4), p.R108.
- Hardy, R.S. et al., 2008. Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 67(9), pp.1204–1210.
- Hardy, R.S., Raza, K. & Cooper, M.S., 2014. Glucocorticoid metabolism in rheumatoid arthritis. Annals of the New York Academy of Sciences, 1318(1), pp.18–26.
- Hassiotou, F. & Geddes, D., 2013. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*, 26(1), pp.29–48.
- Hayon, T. et al., 1999. Non-steroidal antiestrogens induce apoptosis in HL60 and MOLT3 leukemic cells; involvement of reactive oxygen radicals and protein kinase C. *Anticancer research*, 19(3A), pp.2089–2093.
- Heldring, N. et al., 2007. Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. , pp.905–931.
- Helmberg, A. et al., 1995. Cells IsGlucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal*, 14(3), pp.452–460.
- Hench, P.S. & Kendall, E.C., 1949. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 24(8), pp.181–197.
- Hench, P.S. & Slocumb, C.H., 1949. The effects of the adrenal cortical hormone 17-hydroxy-11dehydrocorticosterone (Compound E) on the acute phase of rheumatic fever; preliminary report. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 24(11), pp.277–297.
- Hennebert, O., Le Mée, S., et al., 2007. 5Alpha-androstane-3beta,7alpha,17beta-triol and 5alphaandrostane-3beta,7beta,17beta-triol as substrates for the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Steroids*, 72(13), pp.855–864.
- Hennebert, O., Pernelle, C., et al., 2007. 7A- and 7B-Hydroxy-Epiandrosterone As Substrates and Inhibitors for the Human 11B-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1-5), pp.159–165.
- Hennebold, J.D. et al., 1996. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *The American journal of physiology*, 270(6 Pt 2), pp.R1296–R1306.
- Hermanowski-Vosatka, A. et al., 2000. PPARalpha agonists reduce 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 279(2), pp.330–336.

- Herr, I. et al., 2007. Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis*, 12(2), pp.271–291.
- Hollander, J.L. et al., 1951. Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints; comparative effects of and use of hydrocortisone as a local antiarthritic agent. *Journal of the American Medical Association*, 147(17), pp.1629–1635.
- Hollstein, M. et al., 1991. P53 Mutations in Human Cancers. Science (New York, N.Y.), 253(5015), pp.49–53.
- Holmes, M.C. et al., 2001. Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11??hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2 genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171(1-2), pp.15–20.
- Homo-Delarche, F. et al., 1991. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 40(4-6), pp.619–637.
- Hong, C. & Tontonoz, P., 2014. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nature reviews*. *Drug discovery*, 13(6), pp.433–444. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833295.
- Hosfield, D.J. et al., 2005. Conformational flexibility in crystal structures of human 11bhydroxysteroid dehydrogenase type I provide insights into glucocorticoid interconversion and enzyme regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), pp.4639–4648.
- Houssay, B.A. et al., 1942. COMPARATIVE DIABETOGENIC ACTION OF THE HYPOPHYSIS FROM VARIOUS ANIMALS. *The Journal of experimental medicine*, 75(1), pp.93–106.
- Hu, G.X. et al., 2010. 7b-Hydroxytestosterone Affects 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 Direction in Rat Leydig Cells. *Endocrinology*, 151(2), pp.748–754.
- Huang, C. et al., 2009. Isolation and characterization of novel human short-chain dehydrogenase/reductase SCDR10B which is highly expressed in the brain and acts as hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), pp.279–289.
- Huang, C. & Freter, C., 2015. Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), pp.924–949. Available at: http://www.mdpi.com/1422-0067/16/1/924/.
- Hudson, W.H., Youn, C. & Ortlund, E. a, 2013. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nature structural & molecular biology*, 20(1), pp.53–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3539207&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Hudziak, R.M., Schlessinger, J. & Ullrich, a, 1987. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20), pp.7159–7163.
- Hult, M. et al., 2004. Human and rodent type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenases are 7βhydroxycholesterol dehydrogenases involved in oxysterol metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(7-8), pp.992–999.
- Hult, M. et al., 2001. Novel enzymological profiles of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chemico-biological interactions*, 130-132(1-3), pp.805–814.

- Hult, M., Jörnvall, H. & Oppermann, U.C.T., 1998. Selective inhibition of human type 1 11betahydroxysteroid dehydrogenase by synthetic steroids and xenobiotics. *FEBS letters*, 441(1), pp.25–28.
- Hunter, R.W. & Bailey, M.A., 2015. Glucocorticoids and 11β-hydroxysteroid dehydrogenases: mechanisms for hypertension. *Current Opinion in Pharmacology*, 21, pp.105–114. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489215000065.
- Hwang, P.L. & Matin, a, 1989. Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites: structural requirements for high-affinity binding. *Journal of lipid research*, 30(2), pp.239–245.
- Hynynen, R. et al., 2009. OSBP-related protein 2 is a sterol receptor on lipid droplets that regulates the metabolism of neutral lipids. *Journal of lipid research*, 50(7), pp.1305–1315.
- Ichikawa, Y. et al., 1977. Altered equilibrium between cortisol and cortisone in plasma in thyroid dysfunction and inflammatory diseases. *Metabolism: clinical and experimental*, 26(9), pp.989–997.
- Im, Y.J. et al., 2006. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP- related proteins. *Nature*, 437(7055), pp.154–158.
- Ingle, D.J., 1952. Some further studies on the relationship of adrenal cortical hormones to experimental diabetes. *Diabetes*, 1(5), pp.345–350.
- Ingle, D.J. & Meeks, R.C., 1952. Comparison of some metabolic and morphologic effects of cortisone and hydrocortisone given by continuous injection to rats. *The American journal of physiology*, 170(1), pp.77–80.
- Institut National pour le Cancer, 2015. Les cancers en France, Available at: http://www.e-cancer.fr/publications/69-epidemiologie/758-les-cancers-en-france-edition-2013.
- Institut National pour le Cancer, 2013. Les traitements des cancers du sein GUIDES PATIENTS.
- Iuliano, L., 2011. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), pp.457–468. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006.
- Jamieson, P.M. et al., 1995. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology*, 136(11), pp.4754–4761.
- Janowski, B.A. et al., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383(6602), pp.728–731.
- Jiang, J.Q. et al., 2003. Isolation, characterization and expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (Anguilla japonica) and Nile tilapia (Oreochromis niloticus). *Journal of molecular endocrinology*, 31(2), pp.305–315.
- Jin, Y. et al., 2005. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(1), pp.30–39.
- Johnston, S.R.D., 2010. New strategies in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(7), pp.1979–1987.

- Jordan, V.C., 2007. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*, 72(13), pp.829–842.
- Jordan, V.C., 2006. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl , pp.S269–S276.
- Jordan, V.C. & Brodie, A.M.H., 2007. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*, 72(1), pp.7–25.
- Jordan, V.C. & O'Malley, B.W., 2007. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(36), pp.5815–5824.
- Kadmiel, M. & Cidlowski, J. a., 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9), pp.518–530. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003.
- Kandutsch, A.A. & Russell, A.E., 1960. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *The Journal of biological chemistry*, 235(16), pp.2256–2261.
- Kassahn, K.S., Ragan, M. a. & Funder, J.W., 2011. Mineralocorticoid receptors: Evolutionary and pathophysiological considerations. *Endocrinology*, 152(5), pp.1883–1890.
- Kedjouar, B., De Médina, P., et al., 2004. Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), pp.34048–34061.
- Kedjouar, B., De Medina, P., et al., 2004. Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), pp.34048–34061.
- Keith, B.D., 2008. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC cancer*, 8, p.84.
- Kerr, J., Wyllie, A.H. & Currie, A., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in humanin tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), pp.239–257.
- Kerzner, L.S. et al., 2002. Antenatal dexamethasone: effect on ovine placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and fetal growth. *Pediatric research*, 52(5), pp.706–712.
- Khalifa, S. a M. et al., 2014. The novel steroidal alkaloids dendrogenin A and B promote proliferation of adult neural stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), pp.681–686. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.134.
- El Kihel, L. et al., 2008. New lithocholic and chenodeoxycholic piperazinylcarboxamides with antiproliferative and pro-apoptotic effects on human cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(18), pp.8737–8744.
- Kikuchi, S. et al., 1968. Biologic studies of cholestane-3-beta,5-alpha,6-beta-triol and its derivatives.
  3. The metabolic fate and metabolites of cholestane-3-beta,5-alpha,6-beta-triol in animals. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 159(2), pp.399–408.
- Kim, Y. et al., 2009. Serum high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer risk by menopausal status, body mass index, and hormonal receptor in Korea. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(2), pp.508–515.

- Kinney, W.A. et al., 2000. A short formal synthesis of squalamine from a microbial metabolite. *Organic letters*, 2(19), pp.2921–2922.
- Koboldt, D.C. et al., 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), pp.61–70.
- Kodack, D.P. et al., 2015. Emerging Strategies for Treating Brain Metastases from Breast Cancer. *Cancer Cell*, 27(2), pp.163–175. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610815000161.
- Kodani, S.D. & Hammock, B.D., 2015. Minireview The 2014 Bernard B. Brodie Award Lecture Epoxide Hydrolases : Drug Metabolism to Therapeutics for Chronic Pain. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(May), pp.788–802.
- Koistinen, H.A. et al., 2004. Insulin action on expression of novel adipose genes in healthy and type 2 diabetic subjects. *Obesity research*, 12(1), pp.25–31.
- Korbonits, M. et al., 2001. Expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: Induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and other pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(6), pp.2728–2733.
- Kostadinova, R.M. et al., 2005. Tumor necrosis factor alpha and phorbol 12-myristate-13-acetate down-regulate human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 through p50/p50 NF-kappaB homodimers and Egr-1. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6), pp.650–652.
- Kostyal, D. et al., 2012. Trastuzumab and lapatinib modulation of HER2 tyrosine/threonine phosphorylation and cell signaling. *Medical Oncology*, 29(3), pp.1486–1494.
- Kotelevtsev, Y. et al., 1997. 11Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Knockout Mice Show Attenuated Glucocorticoid-Inducible Responses and Resist Hyperglycemia on Obesity or Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp.14924–14929.
- Kotelevtsev, Y. et al., 1999. Hypertension in mice lacking 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Journal of clinical investigation*, 103(5), pp.683–689.
- Koyama, K. et al., 2001. Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in breast tumors and modulation of activity and cell growth in PMC42 cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 76(1-5), pp.153–159.
- Krishnan, A. V, Swami, S. & Feldman, D., 2001. Estradiol inhibits glucocorticoid receptor expression and induces glucocorticoid resistance in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 77(1), pp.29–37.
- Kritchevsky, S.B. & Kritchevsky, D., 1992. Serum cholesterol and cancer risk: an epidemiologic perspective. *Annual review of nutrition*, 12, pp.391–416.
- Kroemer, G. & Pouyssegur, J., 2008. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 13(6), pp.472–482.
- Krozowski, Z.S., MaGuire, J.A., et al., 1995. Immunohistochemical localization of the 11 betahydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(7), pp.2203–2209.

- Krozowski, Z.S., Baker, E., et al., 1995. Localization of the gene for human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) to chromosome band 16q22. *Cytogenetics and cell genetics*, 71(2), pp.124–125.
- Krzeszinski, J.Y. & Wan, Y., 2015. New therapeutic targets for cancer bone metastasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, pp.1–14. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000784.
- Küçük, O. et al., 1994. Increased plasma level of cholesterol-5 beta,6 beta-epoxide in endometrial cancer patients. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 3(7), pp.571–574.
- Kulkarni, A.P. & Hodgson, E., 1982. Mouse liver microsomal hexose-6-phosphate dehydrogenase. NADPH generation and utilization in monooxygenation reactions. *Biochemical Pharmacology*, 31(6), pp.1131–1137.
- LaBella, F.S. & Brandes, L.J., 2000. Interaction of histamine and other bioamines with cytochromes P450: implications for cell growth modulation and chemopotentiation by drugs. *Seminars in cancer biology*, 10(1), pp.47–53.
- Lajoie, P. & Nabi, I.R., 2010. *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/S1937-6448(10)82003-9.
- Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M., 2012. WHO Classification of Tumours, Volume 4 IARC WHO Classification of Tumours, No 4,
- Lakshmi, V. & Monder, C., 1985a. Evidence for independent 11-oxidase and 11-reductase activities of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase: Enzyme latency, phase transitions, and lipid requirements. *Endocrinology*, 116(2), pp.552–560.
- Lakshmi, V. & Monder, C., 1985b. Extraction of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from rat liver microsomes by detergents. *Journal of steroid biochemistry*, 22(3), pp.331–340.
- Lakshmi, V. & Monder, C., 1988. Purification and characterization of the corticosteroid 11 betadehydrogenase component of the rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology*, 123(5), pp.2390–2398.
- Lam, L. et al., 2009. Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ER?? *Breast Cancer Research and Treatment*, 118(3), pp.605–621.
- Langmade, S.J. et al., 2006. Pregnane X receptor (PXR) activation: a mechanism for neuroprotection in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), pp.13807–13812.
- Lasserre, R. et al., 2008. Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nature chemical biology*, 4(9), pp.538–547.
- Lasunción, M. a. et al., 2012. Post-lanosterol biosynthesis of cholesterol and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), pp.717–723.
- Lathe, R., 2002. Steroid and sterol 7-hydroxylation: ancient pathways. Steroids, 67(12), pp.967–977.

- Lathe, R. & Kotelevtsev, Y., 2014. Steroid signaling: Ligand-binding promiscuity, molecular symmetry, and the need for gating. *Steroids*, 82, pp.14–22. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2014.01.002.
- Lavery, G.G. et al., 2006. Hexose-6-phosphate dehydrogenase knock-out mice lack 11bhydroxysteroid dehydrogenase type 1-mediated glucocorticoid generation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), pp.6546–6551.
- Lavery, G.G. et al., 2003. Late-onset apparent mineralocorticoid excess caused by novel compound heterozygous mutations in the HSD11B2 gene. *Hypertension*, 42(2), pp.123–129.
- Lavery, G.G. et al., 2008. Steroid biomarkers and genetic studies reveal inactivating mutations in hexose-6-phosphate dehydrogenase in patients with cortisone reductase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(10), pp.3827–3832.
- Lawson, A.J. et al., 2011. Cortisone-reductase deficiency associated with heterozygous mutations in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), pp.4111–4116.
- Layde, P.M. et al., 1989. The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group.,
- Lee, A.G., 2011. Biological membranes: The importance of molecular detail. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(9), pp.493–500. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2011.06.007.
- Lehmann, B.D.B. et al., 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), pp.2750–2767. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127435&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3127435/.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B. & Poli, G., 2002. Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(12), pp.700–710.
- Leroy, V. et al., 2009. Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(1), pp.131–144.
- Lewis, G.F. & Rader, D.J., 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research*, 96(12), pp.1221–1232.
- Lewis-Tuffin, L.J. et al., 2007. Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Molecular and cellular biology*, 27(6), pp.2266–2282.
- Liehr, J.G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? Endocrine Reviews, 21(1), pp.40-54.
- Lien, H.-C. et al., 2006. Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms. *The Journal of pathology*, 209(3), pp.317–327.
- Lieutenant, V. et al., 2015. Herceptin® (trastuzumab) par voie sous-cutanée : une mini révolution ? Étude pharmaco-économique. *Bulletin du Cancer*, 102(3), pp.270–276. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007455115000454.

- Ligr, M. et al., 2012. Mifepristone inhibits GRb coupled prostate cancer cell proliferation. *Journal of Urology*, 188(3), pp.981–988.
- Lingwood, D. & Simons, K., 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5961), pp.46–50.
- Liu, Y.J. et al., 1996. Effect of growth hormone, insulin and dexamethasone on 11 betahydroxysteroid dehydrogenase activity on a primary culture of rat hepatocytes. *Life sciences*, 59(3), pp.227–234.
- Llaverias, G. et al., 2011. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *American Journal of Pathology*, 178(1), pp.402–412. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.005.
- Lof, M. & Weiderpass, E., 2009. Impact of diet on breast cancer risk. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 21(1), pp.80–85.
- Long, C.N.H., 1952. The endocrine control of the blood-sugar. Lancet, 1(6703), pp.325–329.
- Long, C.N.H. & Lukens, F.D., 1936. THE EFFECTS OF ADRENALECTOMY AND HYPOPHYSECTOMY UPON EXPERIMENTAL DIABETES IN THE CAT. *The Journal of experimental medicine*, 63(4), pp.465–490.
- Lordan, S., Mackrill, J.J. & O'Brien, N.M., 2009. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(5), pp.321–336. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.001.
- Love, R.R. et al., 1992. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer.,
- Low, S.C. et al., 1993. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by sex steroids in vivo: further evidence for the existence of a second dehydrogenase in rat kidney. *The Journal of endocrinology*, 139(1), pp.27–35.
- Lu, L. et al., 2011. Expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in breast cancer and adjacent non-malignant tissue. An immunocytochemical study. *Pathology and Oncology Research*, 17(3), pp.627–632.
- Lu, Y.S. et al., 2005. Effects of glucocorticoids on the growth and chemosensitivity of carcinoma cells are heterogeneous and require high concentration of functional glucocorticoid receptors. *World Journal of Gastroenterology*, 11(40), pp.6373–6380.
- Lund, E.G. et al., 1998. cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), pp.34316–34327.
- Luu, W. et al., 2012. Akt acutely activates the cholesterogenic transcription factor SREBP-2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(2), pp.458–464. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.017.
- Luu, W. et al., 2015. The terminal enzymes of cholesterol synthesis, DHCR24 and DHCR7, interact physically and functionally. *Journal of Lipid Research*, 56(4), pp.888–897. Available at: http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M056986.

- Ma, C.X. et al., 2015. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nature reviews. Cancer*, 15(5), pp.261–275. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrc3920.
- Ma, R. et al., 2015. Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis. *Journal of Translational Medicine*, 13(1). Available at: http://www.translational-medicine.com/content/13/1/64.
- Ma, X. et al., 2011. Environmental inhibitors of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Toxicology*, 285(3), pp.83–89. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.04.007.
- Ma, X.-J. et al., 2004. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*, 5(6), pp.607–616.
- MacHale, S.M. et al., 1998. Diurnal variation of adrenocortical activity in chronic fatigue syndrome. *Neuropsychobiology*, 38(4), pp.213–217.
- Mandal, C.C., 2014. Targeting Intracellular Cholesterol is a Novel Therapeutic Strategy for Cancer Treatment. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 6(12), pp.510–513. Available at: http://www.omicsonline.org/open-access/targeting-intracellular-cholesterol-is-a-novel-therapeutic-strategy-for-cancer-treatment-1948-5956.1000316.php?aid=36072.
- Manning, J.R. et al., 2010. In silico structure-function analysis of pathological variation in the HSD11B2 gene sequence. *Physiological genomics*, 42(3), pp.319–330.
- Mantero, F. et al., 1995. Long-term treatment of mineralocorticoid excess syndromes. *Steroids*, 60(1), pp.81–86.
- Mariniello, B. et al., 2005. Analysis of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension. *American journal of hypertension*, 18(8), pp.1091–1098.
- Marnett, L.J., Riggins, J.N. & West, J.D., 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), pp.583–593.
- Martinez, L.O. et al., 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 421(6918), pp.75–79.
- Martinez-Outschoorn, U.E. et al., 2011. Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 12(10), pp.924–938.
- Maser, E., 2004. Significance of reductases in the detoxification of the tobacco-specific carcinogen NNK. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), pp.235–237.
- Maser, E. & Bannenberg, G., 1994. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. *Biochemical pharmacology*, 47(10), pp.1805–1812.
- Maser, E. & Netter, K.J., 1989. Purification and properties of a metyrapone-reducing enzyme from mouse liver microsomes--this ketone is reduced by an aldehyde reductase. *Biochemical pharmacology*, 38(18), pp.3049–3054.
- Maser, E. & Oppermann, U.C.T., 1997. The 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase System, A Determinant of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Action. Role of Type-1 11beta-

Hydroxysteroid Dehydrogenase in Detoxification Processes. *European Journal of Biochemistry*, 249(2), pp.365–369. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1997.00365.x.

- Maser, E., Völker, B. & Friebertshäuser, J., 2002. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: Dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry*, 41(7), pp.2459–2465.
- Massey, J.B., 2006. Membrane and protein interactions of oxysterols. *Current opinion in lipidology*, 17(3), pp.296–301.
- Maxfield, F.R. & Tabas, I., 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), pp.612–621.
- Maximov, P.Y. et al., 2014. Pharmacological Relevance of Endoxifen in a Laboratory Simulation of Breast Cancer in Postmenopausal Patients. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 106(10), pp.dju283–dju283. Available at: http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/dju283.
- McDaniel, R.E., Maximov, P.Y. & Jordan, V.C., 2013. Estrogen-Mediated Mechanisms to Control the Growth and Apoptosis of Breast Cancer Cells. A Translational Research Success Story. 1st ed., Copyright © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416673-8.00007-1.
- McDonnell, D.P. et al., 2014. Obesity, Cholesterol Metabolism and Breast Cancer Pathogenesis. *Cancer research*, 74(18), pp.0008–5472.CAN–14–1756–. Available at: http://cancerres.aacrjournals.org.9360.emedia1.bsb-muenchen.de/content/early/2014/07/24/0008-5472.CAN-14-1756.abstract.
- McDougall, J. a. et al., 2013. Long-term statin use and risk of ductal and lobular breast cancer among women 55 to 74 years of age. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 22(9), pp.1529–1537.
- McEwen, B.S. et al., 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*, 23(1-2), pp.79–133.
- McKnight, S.L., Lane, M.D. & Gluecksohn-Waelsch, S., 1989. Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism? *Genes and Development*, 3(12 B), pp.2021–2024.
- McLean, P.G., Ahluwalia, A. & Perretti, M., 2000. Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *The Journal of experimental medicine*, 192(3), pp.367–380.
- McMillan, D.C., Sattar, N. & McArdle, C.S., 2006. Obesity and cancer. *BMJ*: British Medical Journal, 25(333), pp.1109–1111.
- McPherson, K., Steel, C.M. & Dixon, J.M., 1994. ABC of breast diseases. Breast cancerepidemiology, risk factors and genetics. *BMJ*: *British Medical Journal*, 309(6960), pp.1003– 1006.
- McPherson, K., Steel, C.M. & Dixon, J.M., 2000. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics Risk factors for breast cancer. *British medical journal*, 321(9), pp.624–628.
- Medina, D., 1996. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 1(1), pp.5–19.

- De Medina, P., Genovese, S., et al., 2010. Auraptene is an inhibitor of cholesterol esterification and a modulator of estrogen receptors. *Molecular pharmacology*, 78(5), pp.827–836.
- De Medina, P. et al., 2013. Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nature communications*, 4(May), p.1840. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3674249&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- De Medina, P., Paillasse, M.R., et al., 2010a. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), pp.13520–13525.
- De Medina, P., Paillasse, M.R., et al., 2010b. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), pp.13520–13525.
- De Medina, P. et al., 2009. Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell death and differentiation*, 16(10), pp.1372–1384.
- De Medina, P., Paillasse, M.R., et al., 2009. Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: Identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(23), pp.7765–7777.
- De Medina, P., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M., 2009. Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy*, 5(7), pp.1066–1067.
- Michailidou, Z. et al., 2007. Omental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(5), pp.1155–1163.
- Miller, a B. et al., 1978. A study of diet and breast cancer. *American journal of epidemiology*, 107(6), pp.499–509.
- Miller, W.L., 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1-2), pp.62–73. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014.
- Minami, A. et al., 2014. Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. *Frontiers in Oncology*, 4(November), pp.1–6. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00318/abstract.
- Minotti, G. et al., 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), pp.185–229.
- Mitić, T., Shave, S., et al., 2013. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the balance between 7-keto- and 7-hydroxy-oxysterols in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), pp.146–153.
- Mitić, T., Andrew, R., et al., 2013. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the regulation of 7-oxysterol levels in the arterial wall through the inter-conversion of 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol. *Biochimie*, 95(3), pp.548–555.
- Moasser, M.M., 2007. The oncogene HER2; its signaling ans transforming functions ant its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45), pp.6469–6487.
- Moisan, M.P., Seckl, J.R. & Edwards, C.R.W., 1990. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: Localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology*, 127(3), pp.1450–1455.
- Montero, A.J. et al., 2012. A cost-benefit analysis of bevacizumab in combination with paclitaxel in the first-line treatment of patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(2), pp.747–751.
- Montón, C. et al., 1999. Role of glucocorticoids on inflammatory response in nonimmunosuppressed patients with pneumonia: A pilot study. *European Respiratory Journal*, 14(1), pp.218–220.
- Moore, K.S. et al., 1993. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4), pp.1354–1358.
- Morin, R.J. et al., 1991. Cholesterol oxides and carcinogenesis. *Journal of clinical laboratory analysis*, 5(3), pp.219–225.
- Morineau, G. et al., 2006. Apparent mineralocorticoid excess: report of six new cases and extensive personal experience. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(11), pp.3176–3184.
- Muller, C. et al., 2006. Inter-conversion of 7a- and 7b-hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 99(4-5), pp.215–222.
- Mune, T. et al., 2013. HSD11B2 CA-repeat and sodium balance. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 36(October 2012), pp.1–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446772.
- Murphy, R.C. & Johnson, K.M., 2008. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), pp.15521–15525.
- Nagaraj, G. & Ma, C.X., 2015. Revisiting the estrogen receptor pathway and its role in endocrine therapy for postmenopausal women with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, pp.231–242. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10549-015-3316-4.
- Nair, S. et al., 2004. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia*, 47(6), pp.1088–1095.
- Nalbandian, G. et al., 2005. The Selective Estrogen Receptor Modulators, Tamoxifen and Raloxifene, Impair Dendritic Cell Differentiation and Activation. *The Journal of Immunology*, 175(4), pp.2666–2675. Available at: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.175.4.2666.
- Napolitano, A. et al., 1998. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 in adipocytes: Expression is differentiation-dependent and hormonally regulated. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 64(5-6), pp.251–260.
- Nashed, N.T. et al., 1985. Properties of liver microsomal cholesterol 5,6-oxide hydrolase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 241(1), pp.149–162.
- Nashev, L.G. et al., 2007. Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-dependent metabolism of 7-keto- and 7 $\beta$ -hydroxy-neurosteroids. *PLoS ONE*, 2(6).

- Nawrocki, A.R. et al., 2002. In vivo footprinting of the human 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 promoter. Evidence for cell-specific regulation by Sp1 and Sp3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), pp.14647–14656.
- Nelson, E.R. et al., 2013. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6162), pp.1094–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288332.
- Nelson, E.R., Chang, C. & McDonnell, D.P., 2014. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 25(12), pp.649–55. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.10.001.
- Nelson, J.A., Steckbeck, S.R. & Spencer, T.A., 1981. Biosynthesis of 24,25-epoxycholesterol from squalene 2,3;22,23-dioxide. *Journal of Biological Chemistry*, 256(3), pp.1067–1068.
- New, M.I. et al., 1977. Evidence for an unidentified steroid in a child with apparent mineralocorticoid hypertension. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 44(5), pp.924–933.
- Nilsson, S., Koehler, K.F. & Gustafsson, J.-Å., 2011. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(10), pp.778–792. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrd3551.
- Nimptsch, K. & Pischon, T., 2015. Body fatness, related biomarkers and cancer risk: an epidemiological perspective. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. Available at: http://www.degruyter.com/view/j/hmbci.ahead-of-print/hmbci-2014-0043/hmbci-2014-0043.xml.
- Norman, M.R. & Thompson, E.B., 1977. Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Research*, 37(10), pp.3785–3791.
- Obeid, J. et al., 1993. Transcripts originating in intron 1 of the HSD11 (11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase) gene encode a truncated polypeptide that is enzymatically inactive. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(2), pp.154–160.
- Obeyesekere, V.R. et al., 1997. Truncation of the N- and C-terminal regions of the human 11bhydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme and effects on solubility and bidirectional enzyme activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 131(2), pp.173–182.
- Obiorah, I. & Jordan, V.C., 2011. Progress in endocrine approaches to the treatment and prevention of breast cancer. *Maturitas*, 70(4), pp.315–321.

Obr and Edwards, A., 2012. NIH Public Access. Changes, 29(6), pp.997-1003.

- Odermatt, A. et al., 2001. A mutation in the cofactor-binding domain of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 associated with mineralocorticoid hypertension. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(3), pp.1247–1252.
- Odermatt, A. et al., 2011. Hepatic reduction of the secondary bile acid 7-oxolithocholic acid is mediated by 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1. *The Biochemical journal*, 436(3), pp.621–629.
- Odermatt, A. et al., 1999. The N-terminal anchor sequences of 11b-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), pp.28762–28770.

- Odermatt, A. & Klusoňová, P., 2014. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: Regeneration of active glucocorticoids is only part of the story. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 151, pp.85–92. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076014001903.
- Odermatt, A. & Kratschmar, D. V., 2012. Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11b-hydroxysteroid dehydrogenases: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), pp.168–186. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.020.
- Odermatt, A. & Nashev, L.G., 2010. The glucocorticoid-activating enzyme 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 119(1-2), pp.1–13. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.01.007.
- Odom, D.T. et al., 2004. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5662), pp.1378–1381.
- Ohno, S. et al., 2013. Evidence for expression of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type3 (HSD11B3/HSD11B1L) in neonatal pig testis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 381(1-2), pp.145–156.
- Ohshima, M., Ohno, S. & Nakajin, S., 2005. Inhibitory effects of some possible endocrine-disrupting chemicals on the isozymes of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and expression of their mRNA in gonads and adrenal glands. *Environmental sciences : an international journal of environmental physiology and toxicology*, 12(4), pp.219–230.
- Ohvo-Rekilä, H. et al., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1), pp.66–97.
- Olkkonen, V.M. & Hynynen, R., 2009. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), pp.123–133. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.004.
- Onitilo, A. a. et al., 2009. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: Comparison of clinicopathologic features and survival. *Clinical Medicine and Research*, 7(1-2), pp.4–13.
- Oppermann, U.C.T., 2007. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyland quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp.293–322.
- Oppermann, U.C.T., Netter, K.J. & Maser, E., 1995. Cloning and primary structure of murine 11bhydroxysteroid dehydrogenase/microsomal carbonyl reductase. *European Journal of Biochemistry*, 227(1-2), pp.202–208.
- Otaegui-Arrazola, a. et al., 2010. Oxysterols: A world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), pp.3289–3303. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.023.
- Paila, Y.D. & Chattopadhyay, A., 2009. The function of G-protein coupled receptors and membrane cholesterol: Specific or general interaction? *Glycoconjugate Journal*, 26(6 SPEC. ISS.), pp.711– 720.
- Paillasse, M.R. et al., 2009. Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. *Journal of lipid research*, 50(11), pp.2203–2211.

- Paillasse, M.R. et al., 2012. Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles. *The Journal of Lipid Research*, 53(4), pp.718–725.
- Palermo, M., Cossu, M. & Shackleton, C.H., 1998. Cure of apparent mineralocorticoid excess by kidney transplantation.,
- Parker, R.E. & Isaacs, N.S., 1959. Mechanisms Of Epoxide Reactions. *Chemical Reviews*, 59(4), pp.737–799. Available at: http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/cr50028a006.
- Parton, R.G. & del Pozo, M. a, 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(2), pp.98–112. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340574.
- Parton, R.G. & Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(3), pp.185–194.
- Payne, A.H. & Hales, D.B., 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), pp.947–970.
- Payré, B. et al., 2008. Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Molecular cancer therapeutics*, 7(12), pp.3707–3718.
- Pazirandeh, A. et al., 2002. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(7), pp.727–729.
- Pearce, D. & Yamamoto, K.R., 1993. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5098), pp.1161–1165.
- Pearce, S.T. & Jordan, V.C., 2004. The biological role of estrogen receptors ?? and ?? in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50(1), pp.3–22.
- Peck, B. & Schulze, A., 2014. Cholesteryl esters: Fueling the fury of prostate cancer. *Cell Metabolism*, 19(3), pp.350–352. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.012.
- Peet, D.J. et al., 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR?? *Cell*, 93(5), pp.693–704.
- Penno, C. a et al., 2014. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is involved in bile acid homeostasis by modulating fatty acid transport protein-5 in the liver of mice. *Molecular Metabolism*, 3(5), pp.554–564. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877814000866.
- Perou, C.M. et al., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), pp.747-752.
- Pikuleva, I. a, 2006a. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), pp.513–520.
- Pikuleva, I. a, 2006b. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacology & therapeutics*, 112(3), pp.761–773.
- Pitroda, S.P. et al., 2009. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment., 106(14).

- Pivonello, R. et al., 2005. The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 34(2), pp.327–339.
- Poirot, M., 2011. Four decades of discovery in breast cancer research and treatment an interview with V. Craig Jordan. *International Journal of Developmental Biology*, 55(7-9), pp.703–712. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22161829.
- Poirot, M. et al., 2000. Synthesis, binding and structure-affinity studies of new ligands for the microsomal anti-estrogen binding site (AEBS). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8(8), pp.2007–2016.
- Poirot, M. & Silvente-Poirot, S., 2013. Cholesterol-5,6-epoxides: Chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie*, 95(3), pp.622–631. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.006.
- Poirot, M., Silvente-Poirot, S. & Weichselbaum, R.R., 2012. Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), pp.683–689. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.09.007.
- Pruessner, J.C., Hellhammer, D.H. & Kirschbaum, C., 1999. Burnout, perceived stress, and cortisol responses to awakening. *Psychosomatic medicine*, 61(2), pp.197–204.
- Puhalla, S., Brufsky, A. & Davidson, N., 2009. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 18 Suppl 3(6), pp.S122–S130.
- Pulfer, M.K. & Murphy, R.C., 2004. Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), pp.26331– 26338.
- Quinkler, M. et al., 2004. Molecular basis for the Apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome in the Oman population. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), pp.143–149.
- Raaphorst, G.P. et al., 1987. Effect of cholesterol alpha and beta epoxides on cell killing and transformation. *Biochemical pharmacology*, 36(14), pp.2369–2372.
- Rabbitt, E.H. et al., 2002. Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(1), pp.36–44.
- Raghavan, D. et al., 2005. Phase II trial of tesmilifene plus mitoxantrone and prednisone for hormone refractory prostate cancer: high subjective and objective response in patients with symptomatic metastases. *The Journal of urology*, 174(5), pp.1808–13; discussion 1813. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217292.
- Rainey, W.E., 1999. Adrenal zonation: Clues from 11β-hydroxylase and aldosterone synthase. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151(1-2), pp.151–160.
- Ramos, R. a et al., 1996. Glucocorticoid-stimulated CCAAT/enhancer-binding protein alpha expression is required for steroid-induced G1 cell cycle arrest of minimal-deviation rat hepatoma cells. *Molecular and cellular biology*, 16(10), pp.5288–5301.
- Reddy, T.E. et al., 2012. The Hypersensitive Glucocorticoid Response Specifically Regulates Period 1 and Expression of Circadian Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 32(18), pp.3756–3767.

- Reichardt, H.M. et al., 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, 93(4), pp.531–541.
- Repa, J.J. & Mangelsdorf, D.J., 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, pp.459–481.
- Rhen, T. & Cidlowski, J. a, 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England journal of medicine*, 353(16), pp.1711–1723.
- Ricketts, M.L. et al., 1998. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in primary cultures of rat and human hepatocytes. *The Journal of endocrinology*, 156(1), pp.159–168.
- Rigotti, a et al., 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), pp.12610–12615.
- Ring, A. & Dowsett, M., 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*, 11(4), pp.643–658.
- Roffo, A.H., 1933. Heliotropism of Cholesterol in Relation to Skin Cancer. The American Journal of<br/>Cancer, 17(1), pp.42–57. Available at:<br/>http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/ajc.1933.42.
- Róg, T. et al., 2009. Ordering effects of cholesterol and its analogues. Biochimica et Biophysica Acta -<br/>Biomembranes, 1788(1), pp.97–121. Available at:<br/>http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.022.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J.M. & Garabedian, M.J., 1997. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 17(6), pp.3181–3193.
- Rossi, R.E. et al., 2014. The Role of Dietary Factors in Prevention and Progression of Breast Cancer. , 6876, pp.6861–6875.
- Roswall, N. & Weiderpass, E., 2015. Alcohol as a Risk Factor for Cancer: Existing Evidence in a Global Perspective. *Journal of Preventive Medicine & Public Health J Prev Med Public Health*, 48, pp.1–9. Available at: http://dx.doi.org/10.3961/jpmph.14.052.
- Rubiś, B. et al., 2004. Contribution of protein kinase A and protein kinase C signalling pathways to the regulation of HSD11B2 expression and proliferation of MCF-7 cells. *Acta biochimica Polonica*, 51(4), pp.919–924.
- Rudling, M. & Collins, V.P., 1996. Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA levels are coordinately reduced in human renal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1299(1), pp.75–79.
- Russell, D.W., 2000. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), pp.126–135.
- Russell, D.W., 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry*, 72, pp.137–174.
- Rusvai, E. & Naray-Fejes-Toth, A., 1993. A new isoform of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), pp.10717–10720.

- Saha Roy, S. & Vadlamudi, R.K., 2012. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. *International journal of breast cancer*, 2012, p.654698. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3262597&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Sai, S. et al., 2011. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 contributes to glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia Research*, 35(12), pp.1644–1648.
- Sai, S. et al., 2008. Glucocorticoid regulation of the promoter of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Molecular endocrinology* (*Baltimore, Md.*), 22(9), pp.2049–2060.
- Sampath-Kumar, R. et al., 1997. Metyrapone is a competitive inhibitor of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reductase. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 62(2-3), pp.195–199.
- Sánchez, I. et al., 1993. Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G1 block in cell cycle progression. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 4(3), pp.215–225.
- Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 94(1), pp.3–21.
- Schnitt, S.J., 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23 Suppl 2(S2), pp.S60–S64. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.33.
- Schroepfer, G.J., 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological reviews*, 80(1), pp.361–554.
- Schweizer, R. a S. et al., 2004. Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol by 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: Species-specific differences between the rat, human, and hamster enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), pp.18415–18424.
- Seckl, J.R. & Walker, B.R., 2001. Minireview: 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 A tissuespecific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 142(4), pp.1371–1376.
- Segala, G. et al., 2013. 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of Tamoxifen in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), pp.175–189.
- Serhan, N. et al., 2013. Chronic pharmacological activation of P2Y13 receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(4), pp.719–725. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.12.006.
- Sevanian, a & McLeod, L.L., 1986. Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(1), pp.54–59.
- Shiovitz, S. & Korde, L. a., 2015. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*. Available at: http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mdv022.
- Sieri, S. et al., 2008. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 88(5), pp.1304–1312.

- Sills, A.K. et al., 1998. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. *Cancer Research*, 58(13), pp.2784–2792.
- Silva, M.H., Wixtrom, R.N. & Hammock, B.D., 1988. Epoxide-metabolizing enzymes in mammary gland and liver from BALB/c mice and effects of inducers on enzyme activity. *Cancer Research*, 48(6), pp.1390–1397.
- Silvente-Poirot, S. et al., 2012. Methods for determining the oncogenic condition of cell, uses thereof, and methods for treating cancer.
- Silvente-Poirot, S. & Poirot, M., 2014. Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science*, 343(6178), pp.1445–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675946.
- Silvente-Poirot, S. & Poirot, M., 2012a. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), pp.696–703. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.007.
- Silvente-Poirot, S. & Poirot, M., 2012b. Cholesterol metabolism and cancer: The good, the bad and the ugly. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), pp.673–676. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.10.004.
- Simoncini, T. et al., 2000. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circulation research*, 87(1), pp.19–25.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature, 387(6633), pp.569–572.
- Singletary, S.E., 2003. Rating the risk factors for breast cancer. Annals of surgery, 237(4), pp.474-482.
- Skibinski, a & Kuperwasser, C., 2015. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*, (November 2014), pp.1–8. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2014.475.
- Slamon, D.J. et al., 1987. Human Breast Cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu Oncogne. *Science*, 235(21), pp.0–5.
- Slamon, D.J. et al., 2001. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Against Her2. *The New england Journal of Medecine*, 344(11), pp.783–792. Available at: http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200103153441101.
- Smith, B.T. et al., 1982. Influence of corticosteroids on glycogen content and steroid 11-reductase activity in lung and liver of the fetal and newborn rat. *Biology of the neonate*, 42(5-6), pp.201–207.
- Smith, L.L., 1987. Cholesterol autoxidation 1981-1986. Chemistry and physics of lipids, 44(2-4), pp.87–125.
- Smith, L.L. & Jaworski, K., 1988. Cholesterol epoxidations by defined oxygen species. *Basic life sciences*, 49, pp.313–317.
- Smith, L.L., Smart, V.B. & Ansari, G.A., 1979. Mutagenic cholesterol preparations. *Mutation research*, 68(1), pp.23–30.
- Smondyrev, a M. & Berkowitz, M.L., 1999. Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophysical journal*, 77(4), pp.2075–2089.

Sola, B. et al., 2013. Antiestrogen-binding site ligands induce autophagy in myeloma cells that proceeds through alteration of cholesterol metabolism. *Oncotarget*, 4(6), pp.911–22. Available at: http://www.pubmedcentral.pib.gov/articlerender.fcgi?artid=3757248&tcol=pmcentrez&renderty.

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3757248&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.

- Song, C., Hiipakka, R. a. & Liao, S., 2001. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: Implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids*, 66(6), pp.473–479.
- Song, D., Lorenzo, B. & Reidenberg, M.M., 1992. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by gossypol and bioflavonoids. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 120(5), pp.792–797.
- Sørlie, T. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10869–10874.
- Speirs, H.J.L., Seckl, J.R. & Brown, R.W., 2004. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11bhydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *Journal of Endocrinology*, 181(1), pp.105– 116.
- Sporer, A., Brill, D.R. & Schaffner, C.P., 1982. Epoxycholesterols in secretions and tissues of normal, benign, and cancerous human prostate glands. *Urology*, 20(3), pp.244–250.
- Staab, C. a. et al., 2011. Analysis of alternative promoter usage in expression of HSD11B1 including the development of a transcript-specific quantitative real-time PCR method. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), pp.104–112. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.027.
- Stearns, V. et al., 2003. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine.,
- Sternlicht, M.D. et al., 2006. Hormonal and local cotrol of mammary branching morphogenesis. *Differentiation research in biological diversity*, 74(7), pp.365–381.
- Sternlicht, M.D., 2006. Key stages in mammary gland development The cues that regulate ductal branching morphogenesis., 11.
- Stewart, P.M., Whorwood, C.B. & Mason, J.I., 1995. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 55(5-6), pp.465–471.
- Stocco, D.M., 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review* of physiology, 63(1), pp.193–213.
- Stulnig, T.M. et al., 2002. Liver X receptors downregulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Diabetes*, 51(8), pp.2426–2433.
- Suckling, K.E. & Stange, E.F., 1985. Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *Journal of lipid research*, 26(6), pp.647–671.
- Sui, M. et al., 2006. Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors. *International Journal of Cancer*, 119(3), pp.712–717.

- Sukhanova, A. et al., 2012. Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGF receptor inhibitors via increased EGF receptor degradation. *Cancer Discovery*, 3(1), pp.96–112.
- Sumikawa, T. et al., 2008. Dexamethasone interferes with trastuzumab-induced cell growth inhibition through restoration of AKT activity in BT-474 breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 32(3), pp.683–688.
- Sun, K. & Myatt, L., 2003. Enhancement of glucocorticoid-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by proinflammatory cytokines in cultured human amnion fibroblasts. *Endocrinology*, 144(12), pp.5568–5577.
- Sun, K., Yang, K. & Challis, J.R.G., 1998. Glucocorticoid actions and metabolism in pregnancy: Implications for placental function and fetal cardiovascular activity. *Placenta*, 19(5-6), pp.353– 360.
- Suzuki, S. et al., 2003. Dexamethasone upregulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(9), pp.1244–1249.
- Suzuki, S. et al., 2000. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in primary lung carcinomas. *Anticancer research*, 20(1A), pp.323–328.
- Swinnen, J. V et al., 1996. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology*, 137(10), pp.4468–74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828509.
- Swinnen, J. V et al., 1997. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), pp.12975–80. Available http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24248&tool=pmcentrez&rendertype =abstract.
- Swyer, G., 1942. The cholesterol content of normal and enlarged prostates. Cancer Res 2:372-375. *Cancer Res*, 2, pp.372–375.
- Tait, a S., Butts, C.L. & Sternberg, E.M., 2008. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), pp.924–931.
- Tannin, G.M. et al., 1991. The human gene for 11β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(c), pp.16653–16658.
- Tatidis, L., Masquelier, M. & Vitols, S., 2002. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Biochemical pharmacology*, 63(12), pp.2169–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110376.
- Taves, M.D., Gomez-Sanchez, C.E. & Soma, K.K., 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 301(1), pp.E11–E24.
- Temkin, S. et al., 2006. Type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human ovarian cancer. *Steroids*, 71(11-12), pp.1019–1023.

- Terada, Y. et al., 2012. Aldosterone stimulates nuclear factor-kappa B activity and transcription of intercellular adhesion molecule-1 and connective tissue growth factor in rat mesangial cells via serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase-1. *Clinical and Experimental Nephrology*, 16(1), pp.81–88.
- Thibeault, D. et al., 2008. Chemical synthesis of 2??-amino-5??-androstane-3??,17??-diol N-derivatives and their antiproliferative effect on HL-60 human leukemia cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(9), pp.5062–5077.
- Thompson, E.B., 1998. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual review of physiology*, 60, pp.575–600.
- Tilbrook, a J., Turner, a I. & Clarke, I.J., 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of reproduction*, 5(2), pp.105–113.
- Tomlinson, J.J. et al., 2006. Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology*, 147(11), pp.5284–5293.
- Trauner, M. et al., 2010. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Digestive Diseases*, 28(1), pp.220–224.
- Troxell, M.L., 2012. Clinical & Experimental Pathology PIK3CA / AKT1 Mutations in Breast Carcinoma : a Comprehensive Review of Experimental and Clinical Studies. *Journal of clinical* & *Experimental Pathology*, S1, pp.1–11.
- Turner, N., Tutt, A. & Ashworth, A., 2004. Hallmarks of "BRCAness" in sporadic cancers. *Nature reviews. Cancer*, 4(10), pp.814–819.
- Ulick, S. et al., 1979. A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 49(5), pp.757–764.
- Umetani, M. et al., 2007. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nature medicine*, 13(10), pp.1185–1192.
- Vainio, S. et al., 2006. Significance of sterol structural specificity: Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), pp.348–355.
- Valachis, A. et al., 2010. Fulvestrant in the treatment of advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 73(3), pp.220–227.
- Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C., 2014. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocrine Reviews*, 35(4), pp.671–693.
- Vargo-Gogola, T. & Rosen, J.M., 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews. Cancer*, 7(9), pp.659–672.
- Vejux, a., Malvitte, L. & Lizard, G., 2008. Side effects of oxysterols: Cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(7), pp.545–556.
- Vejux, A. & Lizard, G., 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and

phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), pp.153–170. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006.

- Venkitaraman, A.R., 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), pp.171–182.
- Vilasco, M. et al., 2011. Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(1), pp.1–10.
- Villablanca, E.J. et al., 2010. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nature medicine*, 16(1), pp.98–105. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nm.2074.
- Vyas, S. & Maatouk, L., 2013. Contribution of Glucocorticoids and Glucocorticoid Receptors to the Regulation of Neurodegenerative Processes., pp.1175–1193.
- Walker, B.R. et al., 1991. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart: Implications for cardiovascular responses to glucocorticoids. *Endocrinology*, 129(6), pp.3305–3312.
- Walsh, D. & Avashia, J., 1992. Glucocorticoids in clinical oncology. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 59(5), pp.505–515.
- Wamil, M. et al., 2008. 7-Oxysterols modulate glucocorticoid activity in adipocytes through competition for 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type. *Endocrinology*, 149(12), pp.5909–5918.
- Wang, H. et al., 2007. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: Potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics. *International Journal of Oncology*, 30(4), pp.947–953.
- Wang, H. et al., 2004. Pretreatment with Dexamethasone Increases Antitumor Activity of Carboplatin and Gemcitabine in Mice Bearing Human Cancer Xenografts: In Vivo Activity, Pharmacokinetics, and Clinical Implications for Cancer Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10(5), pp.1633–1644.
- Wang, L. et al., 2002. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), pp.13878–13883.
- Wang, Y. et al., 2010. A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of ROR?? and ROR?? activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(8), pp.917–923.
- Wang, Y. et al., 2008. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXR?? Journal of Biological Chemistry, 283(39), pp.26332–26339.
- Wang, Z. et al., 2003. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), pp.23861–23867.
- Watabe, T. & Sawahata, T., 1979. Biotransformation of cholesterol to cholestane-3beta,5alpha,6betatriol via cholesterol alpha-epoxide (5alpha,6alpha-epoxycholestan-3beta-ol) in bovine adrenal cortex. *The Journal of biological chemistry*, 254(10), pp.3854–3860.

- Watabe, T., Sawahata, T. & Horie, J., 1979. Evidence for the formation of a steroid S-glutathione conjugate from an epoxysteroid precursor. *Biochemical and biophysical research communications*, 87(2), pp.469–475.
- Waterham, H.R. & Wanders, R.J. a, 2000. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), pp.340–356.
- Watson, C.J. & Khaled, W.T., 2008. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development (Cambridge, England)*, 135(6), pp.995–1003.
- Watson, I.R. et al., 2013. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 14(10), pp.703–18. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4014352&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Watts, C.K.W., Murphy, L.C. & Sutherland, R.L., 1984. Microsomal binding sites for nonsteroidal anti-estrogens in MCF 7 human mammary carcinoma cells. Demonstration of high affinity and narrow specificity for basic ether derivatives or triphenylethylene. *Journal of Biological Chemistry*, 259(7), pp.4223–4229.
- Webster, J.I., Tonelli, L. & Sternberg, E.M., 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Structure*, 15(SUPPL. 1).
- Weitzman, E.D. et al., 1971. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 33(1), pp.14–22.
- Whirledge, S. & Cidlowski, J.A., 2010. Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinologica*, 35(2), pp.109–125.
- White, C., 1909. On the occurence of crystals in tumours. J Pathol Bacteriol 13:3-10. J Pathol Bacteriol, 13, pp.3-10.
- White, P.C. et al., 2000. Genotype-phenotype correlations of mutations and polymorphisms in HSD11B2, the gene encoding the kidney isozyme of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrine research*, 26(4), pp.771–780.
- White, P.C. et al., 2007. Hexose 6-phosphate dehydrogenase (H6PD) and corticosteroid metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266(SUPPL.), pp.89–92.
- Wilder, R.L., Cupps, T.R. & Balow, J.E., 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: Basic and clinical correlates. *Annals of Internal Medicine*, 119(12), pp.1198–1208.
- Williams, J.I. et al., 2001. Squalamine treatment of human tumors in nu/nu mice enhances platinumbased chemotherapies. *Clinical Cancer Research*, 7(3), pp.724–733.
- Williams, L.J.S. et al., 2000. C/EBP regulates hepatic transcription of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), pp.30232–30239.
- Williams, T. a. et al., 2005. Role of HSD11B2 polymorphisms in essential hypertension and the diuretic response to thiazides. *Kidney International*, 67(2), pp.631–637.
- Willy, P.J. et al., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes and Development*, 9(9), pp.1033–1045.

- Wu, B. et al., 2004. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), pp.8348–8353.
- Wu, I. et al., 2013. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoidinduced apoptotic transcriptomes. *Cell death & disease*, 4, p.e453. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3563981&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Wu, Q. et al., 2013. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Reports*, 5(3), pp.637–645.
- Wu, W. et al., 2004. Microarray Analysis Reveals Glucocorticoid-Regulated Survival Genes That Are Associated with Inhibition of Apoptosis in Breast Epithelial Cells. *Cancer Research*, 64(5), pp.1757–1764.
- Van Der Wulp, M.Y.M., Verkade, H.J. & Groen, A.K., 2013. Regulation of cholesterol homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368(1-2), pp.1–16.
- Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756), pp.555–556.
- Xu, L. et al., 2011. An oxysterol biomarker for 7-dehydrocholesterol oxidation in cell/mouse models for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of lipid research*, 52(6), pp.1222–1233.
- Yager, J.D. & Davidson, N.E., 2006. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *The New england Journal of Medecine*, pp.270–282.
- Yamaguchi, H. et al., 2012. Molecular docking and structural analysis of cofactor-protein interaction between NAD + and 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Journal of Molecular Modeling*, 18(3), pp.1037–1048.
- Yan, D. & Olkkonen, V.M., 2008. *Characteristics of Oxysterol Binding Proteins*, Elsevier Masson SAS. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(07)65007-4.
- Yoshioka, Y. et al., 2000. Quantitation by 1H-NMR of dolichol, cholesterol and choline-containing lipids in extracts of normal and phathological thyroid tissue. *NMR in Biomedicine*, 13(7), pp.377–383.
- Young, M.J. & Rickard, A.J., 2012. Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), pp.248–255. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.008.
- Yue, S. et al., 2014. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metabolism*, 19(3), pp.393–406.
- Zarrouk, A. et al., 2014. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Research Reviews*, 18, pp.148–162. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163714001093.
- Zelcer, N. & Tontonoz, P., 2006. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 116(3), pp.607–614.

- Zhang, C. et al., 2006. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *International Journal of Oncology*, 29(5), pp.1295–1301.
- Zhang, L. et al., 2015. Androgen Receptor, EGFR, and BRCA1 as Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2015(Im), pp.1–12. Available at: http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/357485/.
- Zhang, M.Z. et al., 2009. Inhibition of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type II selectively blocks the tumor COX-2 pathway and suppresses colon carcinogenesis in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 119(4), pp.876–885.
- Zhang, Y. et al., 2003. Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7b-hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp.11642–11647.
- Zhang, Y. et al., 2009. Estrogen inhibits glucocorticoid action via protein phosphatase 5 (PP5)mediated glucocorticoid receptor dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), pp.24542–24552.
- Zhang, Y.L. et al., 2009. H6PDH interacts directly with 11b-HSD1: Implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(1), pp.45–54. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.004.
- Zhao, B. et al., 2010. Structure-dependent inhibition of human and rat 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activities by phthalates. *Chemico-biological interactions*, 183(1), pp.79–84.
- Zhao, C. & Dahlman-Wright, K., 2010. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *Journal of Endocrinology*, 204(3), pp.233–240.
- Zhou, M.Y. et al., 1995. Cloning, expression, and tissue distribution of the rat nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 136(9), pp.3729–3734.
- Zumoff, B. et al., 1983. Influence of thyroid function on the in vivo cortisol in equilibrium cortisone equilibrium in man. *Journal of steroid biochemistry*, 18(4), pp.437–440.

# Study of the cholesterol metabolism in breast cancer progression and resistance and identification of new therapeutic targets

Author : Maud VOISIN

## Abstract

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer and the leading cause of cancer death in women. Tamoxifen (Tam) is the major drug used for the breast cancer (BC) which expresses estrogen receptors. However some cancers do not respond, or develop resistance to Tam.

Deregulations in cholesterol metabolism can be involved in BC development and resistance to Tam. The team characterized a new metabolic pathway from cholesterol, which produces DDA, a tumor suppressor, or OCDO.

The aims of this work, have been to study this metabolism's deregulations and the role of OCDO in BC, as to identify enzymes involved in its production. Deregulations in this metabolism lead to OCDO production, an oncometabolite that promotes cancer in BC.

The identification of this new metabolic pathway will produce news markers for BC and of the efficacy of anti-cancer compounds, as well as innovative therapeutics to counter the production of this onco-metabolite.

Keywords: Breast cancer - Resistance - Tamoxifen - Metabolism - Cholesterol - ChEH.

#### Etude du métabolisme du cholestérol dans la progression et la résistance des cancers mammaires et identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Auteur : Maud VOISIN Directeurs de thèse : Sandrine SILVENTE-POIROT et Marc POIROT Lieu et date de Soutenance : Toulouse, 29 Septembre 2015

### Résumé

Le Tamoxifène (Tam) est le traitement le plus utilisé pour les cancers du sein (CS), cancer féminin les plus fréquents, exprimant les récepteurs des œstrogènes. De nombreux cancers ne répondent cependant pas, ou développent des résistances au Tam.

Des dérégulations du métabolisme des stérols ont été impliquées dans le développement et la résistance des CS au Tam. L'équipe a caractérisé une nouvelle voie métabolique issue du cholestérol, menant à la formation de la DDA, suppresseur de tumeur, ou de l'OCDO.

Le but de ce travail a été d'étudier les dérégulations de ce métabolisme et le rôle de l'OCDO dans les CS, ainsi que d'identifier les enzymes régulant sa formation. Il a été mis en évidence que des dérégulations de ce métabolisme mènent à la formation de l'OCDO, un onco-métabolite promoteur de tumeur dans les CS.

Cette voie métabolique pourrait fournir de nouveaux biomarqueurs des CS et de l'efficacité de traitements anti-cancéreux, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots-clés : Cancer du sein - Résistance - Tamoxifen - Métabolisme - Cholestérol - ChEH

Discipline administrative : Biotechnologies, cancérologie

#### Laboratoire :

Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse UMR1037 INSERM-Université Toulouse 3 2 avenue Hubert Curien - Oncopole de Toulouse CS 53717 - 31037 TOULOUSE CEDEX 1 - FRANCE