

ÉTIENNE AUDET-WALSH

**RÔLE DES VOIES DE BIOTRANSFORMATION DES
HORMONES STÉROÏDIENNES DANS LES
CANCERS HORMONODÉPENDANTS**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en pharmacie
pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

© Étienne Audet-Walsh, 2012

Résumé

Une surexposition aux hormones stéroïdiennes peut entraîner dans certains tissus une induction de la prolifération et de la survie cellulaires menant à l'hyperplasie puis à la néoplasie. Les travaux de doctorat ont d'abord porté sur les hormones stéroïdiennes, principalement les œstrogènes, en lien avec le cancer de l'endomètre. La quantification de ces hormones au niveau circulant a permis de révéler que le profil hormonal est significativement différent chez les femmes atteintes d'un cancer comparativement à celui des femmes en santé. Les œstrogènes sont les hormones qui augmentent le plus en présence d'un cancer de l'endomètre, bien que les androgènes et les précurseurs surrénaliens circulants soient également plus élevés que chez les femmes saines. De plus, les œstrogènes en circulation sont associés à certaines caractéristiques clinico-pathologiques. Notamment, les femmes atteintes d'un cancer de type I (endométriöide), de bas grade et/ou non-invasif présentent des niveaux d'œstrogènes circulants significativement plus élevés que les femmes atteintes d'un cancer de type II, de grade élevé et/ou invasif. Les analyses d'expression d'ARNm des gènes de la stéroïdogénèse dans les tumeurs vont de pair avec les dosages hormonaux et supportent l'hypothèse d'une augmentation de la synthèse des œstrogènes dans les tumeurs comparativement au tissu normal péri-tumoral. En effet, il semble que le sulfate d'œstrone, qui constitue un réservoir plasmatique d'œstrogènes, soit la source principale de production d'estradiol chez les femmes atteintes d'un cancer, ce qui est appuyé par l'analyse de corrélation des niveaux hormonaux en circulation. De plus, il semble y avoir une augmentation de l'inactivation du 2-méthoxyestradiol à effet protecteur, puisque l'expression en ARN des enzymes nécessaires à son catabolisme est augmentée dans les tumeurs. Cette hypothèse est supportée par l'observation que les niveaux circulants des dérivés glucuronides inactifs du 2-méthoxyestradiol sont plus élevés en présence de néoplasie. Les travaux ont également porté sur l'influence des variations héréditaires sur l'évolution du cancer de la prostate suite à un traitement telle la prostatectomie radicale ou la thérapie de privation d'androgènes. Les polymorphismes génétiques de gènes candidats liés aux voies de synthèse et de métabolisme des hormones stéroïdiennes ont été associés à une modification du risque de récurrence biochimique, de progression clinique et de mortalité chez une population de Caucasiens atteints d'un cancer de la prostate. Des résultats similaires ont été

obtenus pour les patients d'origine asiatique. Ainsi, la génétique du patient semble influencer l'évolution du cancer après traitement. En parallèle, l'analyse des hormones stéroïdiennes circulantes en lien avec ces variations génétiques supporte une altération de la synthèse et du métabolisme hormonal favorisant l'évolution tumorale.

En conclusion, les données supportent que les hormones stéroïdiennes affectent le développement et l'évolution de cancers hormonodépendants, tels ceux de l'endomètre et de la prostate. Une meilleure compréhension du rôle joué par ces hormones et des facteurs génétiques les influençant pourrait permettre de développer de nouveaux marqueurs pronostiques et des traitements plus ciblés visant à contrer ces maladies et, éventuellement, de faire progresser la médecine personnalisée dans ce domaine.

Abstract

Excessive exposition to steroid hormones can lead to aberrant cellular proliferation and survival, which may lead, in some tissues, to hyperplasia and neoplasia. During my Ph.D., I first worked on hormonal steroids, mainly estrogens, and their association with endometrial cancer. After quantification of circulating steroids, it seemed clear that there were significant differences in hormonal profile between cancer cases and healthy women. Estrogens are the most strongly increased hormones in women with endometrial cancer, but circulating androgen and adrenal precursor levels are also increased, and most hormones are associated with an altered risk of endometrial cancer. Moreover, women with type I (endometrioid) cancer, low-grade and/or non-invasive tumors display significantly higher circulating estrogen levels than women with type II cancer, high-grade and/or invasive tumors. Therefore, circulating estrogens and their metabolites appear as novel biomarkers that reflect particular tumor characteristics. Endometrial mRNA expression analysis also suggests an enhanced biosynthesis of estrogens in tumors compared to peritumoral tissues. Indeed, these results support the hypothesis of an increased production of active estrogens from estrone sulfate, which constitutes a large reservoir of circulating estrogens, a proposal that is also supported by correlation analyses of circulating steroid levels. Furthermore, our results support the occurrence of an increased inactivation of the protective estrogen metabolite, 2-methoxyestradiol, which seems reflected by increased concentrations of its inactive glucuronide derivatives in the circulation. The second part of my Ph.D. pertained to the influence of genetic variations on the biochemical recurrence and progression of prostate cancer following radical prostatectomy or androgen deprivation therapy. Several genetic polymorphisms of genes involved in hormonal synthesis and metabolism pathways were significantly associated with a modification of the risk of biochemical recurrence, clinical progression and mortality in Caucasians. Similar results were also obtained with patients of Asian origin. Therefore, the patient's genetic make-up can influence the evolution of a tumor following various treatments. Quantification of circulating steroids demonstrated that some of the identified polymorphisms may affect hormonal metabolism, which may explain how they affect tumor evolution. A better understanding of the roles played by these hormones may lead to the discovery of better clinical tools and, eventually, to the improvement of *personalized medicine*.

Avant-Propos

Cette thèse, intitulée « Rôle des voies de biotransformation des hormones stéroïdiennes dans les cancers hormonodépendants », est présentée à la faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Ph.D. et est rédigée sous forme d'insertion d'articles. La présente section a pour objectif de définir la contribution des différents auteurs à ces articles.

Le premier article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis co-auteur principal est intitulé « *Circulating Estrogens in Endometrial Cancer Cases and Their Relationship With Tissular Expression of Key Estrogens Biosynthesis and Metabolic Pathways* ». Cet article a été publié dans le journal scientifique *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* en juin 2010 (facteur d'impact de 6.202). Dans le cadre de son doctorat, la Dr Johanie Lépine a participé aux expérimentations, au traitement des échantillons des patientes recrutées par les cliniciens et leur équipe de recherche, ainsi qu'au maintien de la base de données. Elle a notamment effectué les expériences de PCR (*polymerase chain reaction*) quantitatif, participé à l'analyse et à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la rédaction des travaux. Les Drs Jean Grégoire, Bernard Têtu et Marie Plante, de l'Hôtel-Dieu de Québec, sont impliqués dans le recrutement des participantes au projet, au prélèvement des spécimens cliniques, à l'analyse des dossiers médicaux et à la coordination du recrutement par leur équipe de recherche. La mise à jour de la base de données cliniques a été effectuée par le Dr Grégoire. Les Drs Pierre Ayotte et Jacques Brisson nous ont permis d'avoir accès à une cohorte de femmes postménopausées saines déjà recrutées ($n=110$). Patrick Caron a effectué l'ensemble des dosages hormonaux par spectrométrie de masse par des méthodes analytiques déjà établies. Lyne Villeneuve a participé à la réception et au traitement des échantillons, au maintien de la base de données ainsi qu'à diverses expériences de laboratoire tout au long du projet telles l'optimisation et la réalisation des PCR quantitatifs. Vincent Ménard a contribué à la préparation d'échantillons pour les PCR quantitatifs. La Dr Chantal Guillemette a conceptualisé et établi l'étude. Elle en a aussi assuré la supervision, incluant la mise en place de l'étude clinique ainsi que la collecte des spécimens et des données. Elle a aussi participé à l'analyse et à l'interprétation des

résultats, à la rédaction et à la révision de l'article scientifique. Le Dr Alain Bélanger a participé à l'interprétation des résultats et à la révision de l'article scientifique. Pour ma part, j'ai été impliqué dans cette étude au moment où l'étudiante au doctorat Johanie Lépine terminait, toutefois ma contribution a été significative. J'ai participé à la réception d'une partie des échantillons, au maintien de la base de données, aux analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et à la restructuration du manuscrit scientifique rédigé par l'étudiante Johanie Lépine. J'estime que le pourcentage de ma contribution à la réalisation des travaux contenus dans cet article correspond à environ 20%.

Le deuxième article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis second auteur s'intitule « *Profiling Endogenous Serum Estrogen and Estrogen-Glucuronides by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* ». Il a été publié dans le journal scientifique *Analytical Chemistry* en décembre 2009 (facteur d'impact de 5.874). Cet article décrit une nouvelle méthode d'analyse d'hormones stéroïdiennes en circulation et est l'aboutissement d'un travail initié dès le début des années 2000 par l'assistant de recherche impliqué dans ce projet, Patrick Caron. Le développement et la validation des méthodes analytiques incluent la préparation et l'extraction des échantillons ainsi que l'ensemble des dosages hormonaux, qui ont été réalisés par Patrick Caron. Le Dr Alain Bélanger a participé au développement des méthodes d'analyse, à l'interprétation des résultats de la recherche et à la révision de l'article scientifique. L'étudiante au doctorat Dr Johanie Lépine a contribué au maintien de la base de données, à l'analyse des données et à la rédaction de certaines sections de l'article. La Dr Chantal Guillemette a conceptualisé et établi l'étude. Elle a assuré la supervision des recherches, participé à l'analyse et à l'interprétation des données ainsi qu'à la rédaction et à la révision de l'article scientifique. Pour ma part, j'ai participé à l'interprétation des données, aux analyses statistiques et à la rédaction du manuscrit. J'estime que le pourcentage de ma contribution à la réalisation de cet article scientifique correspond à environ 15%.

Le troisième article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis premier auteur s'intitule : « *Profiling of Endogenous Estrogens, their Precursors and Metabolites in Endometrial Cancer Patients: Association with Risk and Relationship to Clinical Characteristics* ». Il a été publié dans le journal scientifique *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* en février 2011 (facteur d'impact de 6.202). La Dr Johanie

Lépine a participé à la réception et au traitement des échantillons, ainsi qu'au maintien de la base de données. Les Drs Jean Grégoire, Bernard Têtu et Marie Plante, de l'Hôtel-Dieu de Québec, sont impliqués dans le recrutement des participantes au projet, au prélèvement des spécimens et à la coordination du recrutement par leur équipe de recherche. La mise à jour de la base de données cliniques a été effectuée par le Dr Grégoire. Les Drs Pierre Ayotte et Jacques Brisson nous ont permis d'avoir accès à une cohorte de femmes postménopausées saines déjà recrutées ($n=110$). Patrick Caron a effectué l'ensemble des dosages hormonaux par spectrométrie de masse par des méthodes analytiques déjà établies. Lyne Villeneuve a participé à la réception et au traitement des échantillons dans le cadre de l'étude, ainsi qu'au maintien de la base de données. La Dr Chantal Guillemette a conceptualisé et établi l'étude, en a assuré la supervision, a participé à l'analyse et à l'interprétation des données ainsi qu'à la rédaction et à la révision de l'article scientifique. Le Dr Alain Bélanger a participé à l'interprétation des résultats de la recherche et à la révision de l'article scientifique. Pour ma part, j'ai participé à la réception et au traitement d'une partie des échantillons ainsi qu'à la mise à jour de la base de données. De plus, j'ai effectué les analyses statistiques, participé à l'interprétation des résultats, produit les tableaux et figures de l'article, puis participé à la rédaction et à la révision de l'article scientifique. J'estime que ma contribution est d'environ 40%.

Le quatrième article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis co-premier auteur s'intitule « *SRD5A Polymorphisms and Biochemical Failure After Radical Prostatectomy* ». Il a été publié dans le journal scientifique *European Urology* en décembre 2011 (facteur d'impact de 8.843). Les travaux présentés portent sur l'étude de deux populations de patients atteints d'un cancer de la prostate. La première population est composée de 526 Caucasiens atteints d'un cancer localisé, tous recrutés à l'Hôtel-Dieu de Québec par les Drs Yves Fradet et Louis Lacombe. La deuxième se compose de 320 Asiatiques atteints d'un cancer localisé, recrutés à Taïwan par nos collaborateurs les Drs Shu-Pin Huang et Bo-Ying Bao. La Dr Judith Bellemare a contribué de façon majeure à ces travaux, en participant à la sélection des polymorphismes à l'étude dans les gènes SRD5A, en contribuant à l'extraction de l'ADN génomique (ADNg), au génotypage et aux analyses statistiques. Geneviève Nadeau, étudiante à la maîtrise, a participé à l'extraction de l'ADNg et au développement de la base de données cliniques pour la population des

526 cas de cancer. Les Drs Shu-Pin Huang et Bo-Ying Bao ont quant à eux effectué le recrutement, développé la base de données cliniques et effectué le génotypage de la cohorte de patients taïwannais. Tous les cliniciens du projet ont également participé à l'interprétation des résultats et ont révisé l'article. Le Dr Pierre Douville est le responsable des échantillons plasmatiques de la cohorte des 526 cas de cancer. Le Dr Hugo Girard a contribué à l'élaboration de méthodes d'analyses des données, sa contribution dans le cadre de l'ensemble du projet sur le cancer de la prostate est soulignée dans ce manuscrit en particulier. Le Dr Vincent Fradet a participé spécifiquement aux analyses statistiques de l'indice de concordance. Les Drs Chantal Guillemette et Éric Lévesque ont conceptualisé et établi l'étude, ils en ont aussi supervisé la mise en place et la réalisation. De plus, ils ont participé à l'analyse et à l'interprétation des données, ainsi qu'à la rédaction et à la révision de l'article scientifique. Pour ma part, j'ai effectué la plupart des analyses statistiques et mis à jour les bases de données dans le laboratoire. Enfin, j'ai participé à l'interprétation des données, à la rédaction et à la révision du manuscrit. Je considère que le pourcentage de ma contribution à la réalisation du produit final correspond à environ 45%.

Le cinquième article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis l'un des trois co-premiers auteurs s'intitule : « *Deletions of the Androgen Metabolizing UGT2B Genes Have an Effect on Circulating Steroid Levels and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy in Localized Prostate Cancer* ». Il a été publié dans le journal scientifique *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* en septembre 2011 (facteur d'impact de 6.202). Tout comme l'article précédent, les résultats présentés dans ce chapitre se basent sur l'analyse de deux populations de patients atteints d'un cancer de la prostate localisé (une population de 526 Caucasiens et une de 320 Asiatiques). La Dr Geneviève Nadeau, co-auteure principale, a participé à l'extraction de l'ADNg, a développé la base de données cliniques de cette population, a effectué la majeure partie du génotypage de la population caucasienne, a participé aux analyses statistiques et à la rédaction du manuscrit. La Dr Judith Bellemare a supervisé et a participé à l'extraction et au génotypage de l'ADNg de la population caucasienne, ainsi qu'aux analyses statistiques. Les Drs Shu-Pin Huang et Bo-Ying Bao ont quant à eux effectué le recrutement, ont développé la base de données cliniques et ont effectué le génotypage de leur cohorte. Le Dr Pierre Douville est le responsable des échantillons plasmatiques de la cohorte des 526 cas de cancer. Patrick

Caron a effectué l'ensemble des dosages hormonaux par spectrométrie de masse par des méthodes établies. Christine Flageole a participé aux analyses statistiques des stéroïdes en circulation sanguine dans la population caucasienne. Les Drs Louis Lacombe et Yves Fradet ont constitué la cohorte des 526 cas de cancer de prostate. Tous les cliniciens du projet ont également participé à l'interprétation des résultats et à la révision de l'article. Les Drs Chantal Guillemette et Éric Lévesque ont conceptualisé et établi l'étude, ils en ont supervisé la mise en place et la réalisation. De plus, ils ont participé à l'analyse et à l'interprétation des données, ainsi qu'à la rédaction et la révision de l'article scientifique. Finalement, j'ai participé aux analyses statistiques ainsi qu'à la rédaction et la révision du manuscrit. Je considère que le pourcentage de ma contribution à la réalisation du produit final est de 20%.

Le sixième article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis premier auteur s'intitule : « *The Impact of Germline Genetic Variations in Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenases on Prostate Cancer Outcomes After Prostatectomy* ». Il a été accepté pour publication dans le journal scientifique *European Urology* en décembre 2011 (facteur d'impact de 8.843). Les travaux présentés se basent sur l'étude de deux populations caucasiennes de patients atteints d'un cancer de la prostate. L'une des deux populations est composée de 526 cas de cancer cliniquement localisé tandis que la deuxième se compose de 213 cas de cancer localement avancé, toutes deux constituées par les Drs Yves Fradet et Louis Lacombe. La Dr Judith Bellemare, tel que mentionné, a contribué de façon significative à la sélection des gènes et polymorphismes à l'étude, au génotypage ainsi qu'aux analyses statistiques. Tous les cliniciens du projet ont également participé à l'interprétation des résultats et révisé l'article. Les Drs Chantal Guillemette et Éric Lévesque ont conceptualisé et établi l'étude, en ont assuré sa supervision et sa réalisation. De plus, ils ont participé à l'analyse et à l'interprétation des données, ainsi qu'à la rédaction et la révision de l'article scientifique. Pour ma part, j'ai participé au génotypage de la cohorte de 213 patients ainsi qu'au maintien des bases de données des deux cohortes dans le laboratoire. De plus, j'ai effectué la majorité des analyses statistiques, participé à l'interprétation des données, à la rédaction et à la révision du manuscrit. Je considère que le pourcentage de ma contribution à la réalisation du produit final correspond à environ 45%.

Le septième article auquel j'ai contribué et pour lequel je suis troisième auteur s'intitule : « *Molecular Markers in Key Steroidogenic Pathways Associated With Lethal Prostate Cancer* ». Cet article est actuellement en préparation. Les travaux présentés concernent l'étude d'une population asiatique composée de 601 patients atteints d'un cancer de la prostate et tous traités par thérapie de privation androgénique (TPA). Les Drs Shu-Pin Huang, Bo-Ying Bao, Chao-Yuan Huang et Chia-Cheng Yu ont élaboré la cohorte de patients, ont développé la base de données cliniques et ont effectué le génotypage et les analyses statistiques. Les Drs Chantal Guillemette et Éric Lévesque ont conceptualisé et supervisé l'étude, participé à l'analyse et à l'interprétation des données, ainsi qu'à la rédaction et la révision de l'article scientifique. Tous les cliniciens du projet ont également participé à l'interprétation des résultats et à la révision de l'article. Pour ma part, j'ai analysé les données de génotypage et effectué les analyses statistiques de façon indépendante de nos collaborateurs. J'ai également participé à la rédaction et à la révision du manuscrit. J'estime que le pourcentage de ma contribution est de 25%.

Dans le cadre de ce projet portant sur la découverte de nouveaux marqueurs pronostiques du cancer de la prostate, j'ai également participé de façon importante, suite au départ de l'étudiante au doctorat Judith Bellemare, à diverses analyses qui ne sont pas présentées dans cette thèse mais qui seront possiblement publiées ultérieurement.

Remerciements

Il est évident que la rédaction d'une thèse de doctorat représente à mes yeux bien plus que l'écriture d'un ouvrage imposant. En effet, cette thèse représente pour moi une étape importante au niveau professionnel, pour bien sûr devenir chercheur, mais aussi sur le plan personnel. À cet effet, j'aimerais remercier tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans le cadre de mes études universitaires qui s'achèvent. Notamment, mes ami(e)s les plus proches. Vous m'avez toujours soutenu dans mes entreprises, mes déboires, mes joies et mes idées folles. Vous faites en sorte que j'aime la vie et que j'en profite le plus souvent possible. À vous tous, tellement merci!!!!

J'aimerais ensuite remercier ma directrice de thèse, Chantal Guillemette. Chantal, merci de m'avoir accepté dans ton équipe si dynamique. Tu as un talent non seulement pour l'excellence et la productivité scientifique, mais aussi pour recruter des étudiants et des assistants de recherche exceptionnels, qui deviennent plus que de simples collègues et qui participent activement à une télé-réalité du genre de *Place Melrose*. J'espère avoir acquis durant mon doctorat un tel potentiel pour l'excellence scientifique. J'ai appris énormément sous ta supervision et cela va marquer à jamais ma carrière en recherche. Tu as bien ciblé ce que je désirais faire et tu m'as, dès mon arrivée, positionné à des endroits clés dans le cadre de ma formation, notamment en me permettant de participer à la supervision d'étudiants ainsi qu'à la gestion et à l'avancement de plusieurs projets de recherche. La diversité des projets sur lesquels j'ai travaillé est impressionnante et j'ai, je l'espère, acquis l'expérience nécessaire à faire « rouler un lab » aussi productif que le tien!! La rapidité de tes réponses à mes nombreuses requêtes et les multiples corrections de mes travaux vont me manquer à coup sûr. Tout le monde te le diras, tu en demandes beaucoup à ton équipe mais, en retour, tu en redonnes énormément, voir probablement encore plus, et tu te dévoues jour et nuit pour ton lab. Je suis convaincu qu'avec la formation que j'ai eu sous ta supervision, je saurai mener à bien mon objectif de carrière et de vie, c'est-à-dire devenir un chercheur scientifique productif et respecté en plus d'un mentor et d'un superviseur hors pair, et je t'en remercie sincèrement.

Les prochaines personnes que je tiens à remercier sont les membres de mon jury de thèse, les Drs Frédéric Pouliot, Jacques Laplante et Alain Bélanger. S'ajoute à ces personnes les membres de mon comité d'examen de doctorat en plus du Dr Bélanger, c'est-

à-dire les Drs Thérèse Di Paolo et Yves Tremblay. Un merci spécial au Dr Bélanger, qui m'aura fait part de ses conseils aguerris tout au long de mon doctorat. Merci aussi au Dre Di Paolo, non seulement pour son écoute durant les différents comités sur lesquels nous avons siégé ensemble, mais pour s'être toujours montrée disponible et attentive pour me soutenir dans ma progression et mon doctorat.

Par la suite, j'aimerais remercier l'unique Dr Éric Lévesque, pour sa passion contagieuse si motivante!! Même si tu n'étais pas souvent au lab, ta porte était toujours ouverte, et tu as toujours pris le temps de me parler des recherches en cours et de sonder mon opinion, même si cela te faisait arriver en retard pour tes rendez-vous et tes cours. C'est beaucoup plus que seulement motivant travailler avec toi, c'est carrément génial!!

Un gigantesque merci à tous les membres du laboratoire « CG », vous êtes des personnes extraordinaires, travaillantes, motivées et brillantes et j'ai adoré ces heures incalculables à travailler et à me distraire en votre compagnie tant de jour comme de soir et de fin de semaine!! Hugo, aux goûts douteux, j'ai adoré ces discussions sur... en fait à peu près tout! Johanie (Lépine), je n'ai pas eu l'opportunité de travailler beaucoup en ta compagnie. Par contre, j'ai eu la chance exceptionnelle de suivre tes pas dans le cadre du « projet œstrogènes ». J'aimerais te remercier pour toute l'aide que tu m'as apporté après ton départ du laboratoire et pour l'excellent travail que tu as fait dans le cadre de ce projet. Kim, je me rappellerai pendant longtemps nos sorties en dehors du labo – notamment te voir en chasse au *Liquor Store* ;) – garde ton sourire radieux apprécié de tous! Anne-So, tu es l'une des personnes qui m'a donné le plus de support, entre autres pendant mon prédoc, et j'ai adoré tous ces cafés au pain d'épice ;) Merci de tous ces moments à rigoler, à jaser, à travailler tard les soirs et les fins de semaine!! Marie-Odile, alias MOBB, tu as plus que certainement un caractère unique qui a du mordant et qui te mènera loin j'en suis sûr!! Judith, même si tu m'as décrit comme « un gars à qui on peut parler comme à une fille » (je ne suis pas encore sûr d'aimer ça;), ça a été super de travailler en ta compagnie, sur le projet induction. Je me rappelle ces journées de 16 heures *non-stop* – ça c'est le genre de journées que j'adore. J'ai aussi adoré embarquer sur le « projet prostate » en poursuivant ce que tu avais commencé, tu as fait un travail extraordinaire et je ne pourrai jamais assez te remercier pour ça. J'aimerais par le fait même remercier Geneviève Nadeau, pour son travail de moine avec les UGT dans le cadre

du projet prostate. Olivier, alias Oli ou *that's what she said*, je me souviendrai toujours de tes excellentes blagues, de ton « absence de filtre » et de toutes nos soirées bien arrosées avec Christine où tu nous as fait découvrir les *Jager Bombs*!! Isa, merci de m'avoir dépanné dans certains moments difficiles, je t'en serai toujours reconnaissant. Et comme on dit : « l'avenir appartient à ceux qui se lèvent tôt », quoiqu'à l'heure à laquelle tu te lèves c'est carrément trop tôt!! Mél (Rouleau), tu es un si bon public pour mes blagues plates (avec Pierre)... et celles de Vince, mais surtout ton rire contagieux sème du bonheur partout où tu passes. Lyne, notre chère Lyne nationale, le soleil de la journée avec son sourire radieux et la maîtresse de maison pour classer tous les trucs ;) Michaela, notre Autrichienne préférée qui a su apprendre le français en deux temps trois mouvements. Jo (Roberge), si tranquille, si travaillante et avec un humour parfois dur à cerner (humour de fille j'imagine) : on va l'avoir notre McDo!! Pierre, le p'tit Gaspésien « à m'a dit à moi », malheureusement durant ton séjour je n'aurai pas vraiment réussi à t'apprendre à te contrôler, en fait j'aurais plutôt fait l'inverse! Tu as été un collègue de travail enjoué, motivé, travaillant, mais aussi un ami digne de confiance. Ton parcours est unique et, sincèrement, j'admire ta détermination – tu es sans aucun doute la personne la plus courageuse et la plus déterminée qu'il m'ait été donné de rencontrer. Garde en vue tes objectifs et continue à foncer pour réaliser tes rêves. Mario, personnage unique, jeune de cœur et toujours agréable de compagnie. Ton soutien indéfectible envers toute l'équipe restera l'un des meilleurs souvenirs de mes études doctorales. Tu t'es dévoué corps et âme à tous et chacun afin de nous aider à faire avancer les divers projets en cours. Tout le temps que tu as pu passer à régler nos problèmes, tant professionnels que personnels, est, crois-moi, apprécié de tous. Prends soin de toi et, surtout, n'embarque pas trop souvent sur notre *crazy carpette* métaphorique!! Vincent Ménard, alias *Vince*, merci de ton soutien indéfectible, de ta grande disponibilité, de tes *mannn*, de tous ces moments à déconner, mais aussi à parler de sciences, de nos travaux, de nos déboires, de nos recherches, des femmes et de tout ce qui touche la vie d'un être humain. Plus qu'un collègue, tu es un ami comme on en trouve peu, en qui on peut avoir confiance et sur qui on peut compter (même si tu es toujours en retard!). Enfin, je sais que l'avenir te fait peur, mais ne t'inquiète pas, nous allons fonder un empire avec notre entreprise et te garder un poste à la conciergerie ;)

Un merci aussi aux membres présents et passés de l'équipe de bioanalyse, incluant Patrick Caron, Véronique Turcotte, René Bérubé, Simon Caron et Patrick Bherer. Vous avez effectué un travail exemplaire et m'avez fourni un nombre impressionnant de données pour toutes mes analyses. Un merci tout spécial à Patrick Caron, que j'ai dérangé plus que tous les autres – tu as toujours pris le temps de bien m'expliquer les concepts essentiels à ma bonne compréhension du domaine.

Un passage dans le « labo CG » implique nécessairement une étroite collaboration avec le groupe du Dr Olivier Barbier, chercheur à l'humour pince-sans-rire qui s'investit à fond pour ses étudiants. Jocelyn, alias *Joce*, je vais bientôt te rejoindre au niveau des « Dr » héhé ;) Mél (Verreault), demande à ton boss une augmentation, tu le mérites à endurer pareille équipe!! Martin, bonne chance avec tes deux enfants, ne leur le bon exemple et partage leur ta passion pour les sciences! Cyril, le français d'apparence si tranquille mais qui se déchaîne lors des *partys*. Sophie, d'une patience d'ange et devenue chef en matière de gâteaux! Laurent *Ré-al_Time* Grosse, je t'ai demandé je ne sais plus combien de fois de m'aider dans mes trucs ou de me rendre des « petits » services. Tu as toujours été disponible, serviable et compréhensif et je t'en remercie du fond du cœur. Tu fais partie de ces rares personnes qui n'ont aucune malice et qui ont le cœur sur la main, qui donne de leur temps sans compter et ça fait beaucoup de bien aux personnes qui t'entourent, surtout lorsque tu es en *speedo* ☺ – ne lâche pas et continue d'être si... français!!

Enfin, je dois aussi ma réussite en recherche au Dr Alan Anderson, alias Doc. Doc, vous avez été pour moi un mentor qui m'a inspiré non seulement mon esprit critique en recherche et ma curiosité, mais vous m'avez transmis votre passion pour l'enseignement. Votre porte a toujours été ouverte et vous m'avez donné de votre temps sans compter, en prenant toujours le soin de répondre à mes innombrables questions. Vos bons conseils ont et seront toujours appréciés, tout comme les discussions politiques et philosophiques sur la souveraineté et sur le parti conservateur pendant une dégustation de vins et fromages ;) Doc, j'aurai toujours l'empreinte de votre enseignement dans mon travail en tant que chercheur, je vous dis donc merci du fond du cœur!

J'aimerais aussi remercier toutes ces personnes qui ont contribué à l'avancement de mes travaux et que j'ai n'ai pas eu l'occasion de rencontrer. C'est-à-dire tous les cliniciens

et les infirmières de recherche qui ont participé au recrutement des patient(e)s et à l'échantillonnage dans le cadre des « projets œstrogènes et prostate » ainsi que tou(te)s les patient(e)s qui ont contribué à l'avancement de la science. Je remercie aussi les graphistes du centre de recherche, principalement France, pour leur patience malgré les multiples corrections et volte-faces que je leur ai faits faire. Merci aussi à Catherine, notre réceptionniste à la voix si douce et à l'équipe de nuit du CHUL, particulièrement Alain, vous êtes des gens merveilleux qui aiguisent chacune de nos journées (et de nos soirées)!!

À toute la famille Audet-Walsh, mille mercis! Mom, pop, vous avez tout donné à vos trois enfants. Passion, temps, éducation, mais surtout beaucoup, beaucoup d'amour. Vous nous avez toujours supportés dans nos choix de vie et vous avez toujours pris le temps de nous conseiller sur le chemin de la vie. Vous êtes pour moi plus que mes parents, vous êtes mes modèles et mes exemples. Vous représentez chacun à votre façon ce à quoi j'aspire dans la vie, tant au niveau personnel qu'au niveau professionnel. Vous savez rester fidèles à vos principes et évoluer avec toute la passion que, je crois bien, je partage avec vous pour la recherche et la science, mais aussi pour le travail bien fait, le respect des autres et l'intégrité. À ma p'tite sœur, Cath, si tranquille comparée à moi, merci de tes blagues, de ton sourire, de ta douce tranquillité, de tes encouragements et de ton soutien. Deviens une professionnelle de laboratoire exceptionnelle car, qui sait, nous travaillerons peut-être ensemble dans l'avenir - tu connais mon envie de fonder un « empire Audet-Walsh » ;) À mon p'tit frère, Céd, tellement trop *NOOB*, merci d'être toujours là pour que je puisse t'embêter et qui reste quand même patient avec moi, le moins mature des deux malgré mes 10 années de plus. Merci de me changer les idées avec des massacres de zombies, mais surtout merci de prendre exemple sur moi et de m'avoir comme idole absolue (tousse). À toute ma famille, mais aussi à mes oncles, tantes, cousins, cousines et grands-parents, trop nombreux pour être tous nommés merci, mille mercis pour tous vos encouragements, votre soutien et votre amour indéfectible. Et un merci spécial à mon oncle Jacques Laplante, pour avoir évalué ma thèse malgré les belles journées d'été et m'avoir fait une « pré-soutenance » avec ma mère!!!

Enfin, ma très chère Christine, ma douce moitié, l'Amour de ma vie, merci d'être là! Tu m'encourages, tu me supportes dans mes choix, et même dans les moments difficiles

je sais que je peux compter sur toi et que tu seras toujours là pour me soutenir. Plus que tout, tu crois en moi, tu me le fais sentir, tu me pousses à réaliser mes rêves et ça me donne toute la force et la conviction nécessaire pour continuer à avancer! J'ai non seulement adoré travailler avec toi au laboratoire, et je crois bien que l'élève a (presque;) fini par dépasser le maître – tu t'es montrée d'une persévérance hors du commun et d'un désir de perfection qui t'ont poussée à accomplir un travail exemplaire. Tu es devenue une collègue de travail des plus remarquables, avec qui j'ai formé une équipe du tonnerre mais, par-dessus tout, tu es devenue la meilleure compagne de vie dont j'aurais pu rêver. Tu me donnes tout le soutien dont j'ai besoin, en m'encourageant dans mes folles entreprises et en partageant ma passion pour presque tout, notamment les *Jager Bombs* et le *Captain*, et même si tu n'aimes pas mes jeux vidéo, ma chère Christine, je t'aime et je te remercie, tout simplement d'exister, mais surtout de m'aimer comme tu le fais!

Alea Jacta Est – Jules César

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iv
Avant-Propos	v
Remerciements.....	xi
Table des matières.....	xviii
Liste des tableaux.....	xx
Liste des figures	xxi
Liste des abbréviations.....	xxii
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	24
1. Les hormones stéroïdiennes sexuelles et le cancer	25
2. Hormones stéroïdiennes sexuelles	29
2.1 Stéroïdogénèse et hormones stéroïdiennes sexuelles.....	29
2.2 Métabolisme des hormones stéroïdiennes sexuelles.....	34
2.2.1 Catabolisme des androgènes	34
2.2.2 Métabolisme des œstrogènes	36
2.3 Synthèse hormonale chez l'humain	41
2.4 Actions des hormones stéroïdiennes sexuelles	44
2.4.1 Transport des hormones	44
2.4.2 Récepteur aux androgènes.....	45
2.4.3 Récepteurs aux œstrogènes	48
3. Cancer de l'endomètre	52
3.1 Introduction générale	52
3.2 Rôle des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre	55
3.2.1 L'hypothèse des <i>unopposed estrogens</i>	55
3.2.2 L'hypothèse associée au métabolisme des œstrogènes.....	58
3.3 Dosage des hormones stéroïdiennes chez la femme postménopausée atteinte du cancer de l'endomètre	61
3.4 Biomarqueurs	62
4. Cancer de la prostate	65
4.1 Introduction générale	65
4.2 Récidive et progression.....	68
4.3 Rôle des androgènes.....	70
4.4 Rôle des œstrogènes.....	76
4.5 Susceptibilité génétique	78
5. Hypothèses, objectifs, méthodologies et résultats.....	85
5.1 Association des œstrogènes en circulation à l'expression des gènes de synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre	85
5.2 Profil des œstrogènes et de leurs métabolites glucuronidés dans la circulation sanguine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	87

5.3 Profil des œstrogènes endogènes, de leurs précurseurs et de leurs métabolites dans la circulation sanguine chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre : association au risque et aux caractéristiques clinico-pathologiques.....	88
5.4 Variations génétiques des gènes de la stéroïdogénèse et évolution du cancer de la prostate.....	89
CHAPITRE II. Association des œstrogènes en circulation à l'expression des gènes de synthèse et de métabolisme des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre ...	92
CHAPITRE III. Profil des œstrogènes et de leurs métabolites glucuronides dans le sérum par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	129
CHAPITRE IV. Profil des œstrogènes, de leurs précurseurs et de leurs métabolites endogènes chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre : association au risque et aux caractéristiques clinico-pathologiques	157
CHAPITRE V. Plusieurs polymorphismes des gènes SRD5A sont associés à une récurrence biochimique du cancer de la prostate après prostatectomie radicale.....	198
CHAPITRE VI. Les délétions des gènes UGT2B, enzymes du catabolisme des androgènes, ont un impact sur les niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes et sur la récurrence biochimique du cancer de la prostate localisé après prostatectomie radicale.....	232
CHAPITRE VII. Impact des variations génétiques héréditaires des 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases sur l'évolution du cancer de la prostate après prostatectomie	264
CHAPITRE VIII. Des marqueurs génétiques de gènes de la stéroïdogénèse sont associés à une forme létale du cancer de la prostate.....	305
CHAPITRE IX. DISCUSSION	337
9. Rôle des hormones stéroïdiennes dans les cancers hormonodépendants	338
9.1. Cancer de l'endomètre.....	338
9.1.1 Modèle des <i>unopposed estrogens</i>	338
9.1.2 Métabolisme des œstrogènes	343
9.1.3 Relation entre les hormones circulantes et les caractéristiques clinico-pathologiques.....	346
9.2 Cancer de la prostate.....	350
9.2.1 Identification de marqueurs génétiques associés à la stéroïdogénèse et influençant l'évolution du cancer de la prostate	350
9.2.2 Effet des variations génétiques sur les niveaux hormonaux.....	354
9.2.3 La génétique du patient, celle de la tumeur et la progression du cancer	365
9.2.4 Validité des polymorphismes génétiques en clinique.....	369
9.3 Les hormones stéroïdiennes : du diagnostic à la mort.....	372
Bibliographie	375

Liste des tableaux

Tableau 1. Niveaux circulants des hormones stéroïdiennes sexuelles chez l'humain	43
Tableau 2. Comparaison des cancers de l'endomètre de types I et II	54
Tableau 3. Étude non-exhaustive des variations génétiques des gènes de la stéroïdogénèse en association avec la susceptibilité au cancer de l'endomètre	64
Tableau 4. Définitions des stades TNM cliniques pour le cancer de la prostate	67
Tableau 5. Polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate	80
Tableau 6. Comparaison des différentes études d'association entre les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse et la susceptibilité au cancer de la prostate	82
Tableau 7. Les polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate dans le contexte de la progression de cette maladie	83

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la stéroïdogénèse	30
Figure 2. La synthèse de la DHT peut se faire par l'intermédiaire de voies alternatives	31
Figure 3. Activité enzymatique de différentes 17 β -HSD chez l'humain	33
Figure 4. Spécificité et régio-sélectivité des enzymes UGT2B pour les principaux androgènes	35
Figure 5. Voies majeures d'hydroxylation de l'E ₁ et l'E ₂	36
Figure 6. Moyennes géométriques des niveaux urinaires d'œstrogènes et de leurs métabolites provenant des 3 voies majeures d'hydroxylation chez la femme	40
Figure 7. Régio-sélectivité des enzymes UGT humaines pour les métabolites des œstrogènes des voies 2-OH et 4-OH	41
Figure 8. Représentation schématique de l'AR	46
Figure 9. Mode d'action génomique des androgènes	47
Figure 10. Représentation schématique de la distribution tissulaire des récepteurs ER α et ER β	50
Figure 11. Zones de la prostate	65
Figure 12. Traitements pharmacologiques du cancer de la prostate ciblant l'axe des androgènes	73
Figure 13. Mécanismes d'hyperactivation de l'AR dans les CRPC	75
Figure 14. Il y a des différences génétiques du gène <i>SRD5A2</i> selon l'origine ethnique de l'individu	352
Figure 15. Localisation schématique des htSNP de <i>SRD5A2</i> associés à une récurrence biochimique ainsi que de leurs SNP liés	357
Figure 16. Variants d'épissage du gène <i>SRD5A2</i>	357
Figure 17. La variation rs518673A diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur <i>SRD5A1</i>	359
Figure 18. L'allèle rs518673A altère la formation de complexes ADN-protéine	360
Figure 19. Étapes du développement du cancer de la prostate chez l'humain	366
Figure 20. Cooccurrence des variations génétiques <i>SRD5A</i> et <i>UGT2B</i> et risque de récurrence biochimique	371

Liste des abréviations

16 α -OHE ₁	16 α -hydroxyestrone
16-OH	Voie d'hydroxylation en position C16 des œstrogènes
17 β -HSD	17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
2-OH	Voie d'hydroxylation en position C2 des œstrogènes
2-MeOE ₁ -3G	2-méthoxyestrone-3-glucuronide
2-MeOE ₂	2-méthoxyestradiol
2-MeOE ₂ -3G	2-méthoxyestradiol-3-glucuronide
3 α -diol	Androstane-3 α , 17 β -diol
3 α -diol-3G	Androstane-3 α , 17 β -diol-3-glucuronide
3 α -diol-17G	Androstane-3 α , 17 β -diol-17-glucuronide
3 β -HSD	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
4-dione	Androstènedione
4-OH	Voie d'hydroxylation en position C4 des œstrogènes
5-diol	Androst-5-ène-3 β , 17 β -diol
ABC	Transporteur de la superfamille des <i>ATP-binding cassettes</i>
A-dione	Androstanedione
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADT	Androstérone
ADT-G	ADT-3-glucuronide
AF	<i>Activation function</i>
Akt	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ANCOVA	Analyses de covariance
APS	Antigène prostatique spécifique
AR	<i>Androgen receptor</i>
ARE	<i>Androgen response element</i>
AromKO	Inactivation ciblée du gène codant pour l'aromatase
CAPRA	<i>Cancer of the Prostate Risk Assessment</i>
COMT	Catéchol- <i>O</i> -méthyltransférase
CTC	Cellules tumorales circulantes
CTD	Cellules tumorales disséminées
CRPC	<i>Castration resistant prostate cancer</i>
CYP	Cytochromes P450
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHEA-S	Sulfate de déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
E ₁	Estrone
E ₁ -3G	Estrone-3-glucuronide
E ₁ -S	Sulfate d'estrone
E ₂	Estradiol
E ₂ -3G	Estradiol-3-glucuronide
E ₂ -17G	Estradiol-17-glucuronide
E ₃	Estriol

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER α	<i>Estrogen receptor alpha</i>
ER β	<i>Estrogen receptor beta</i>
ERE	<i>Élément de réponse aux œstrogènes</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
GPER	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>
GST	<i>Glutathion S-transférase</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
htSNP	<i>Haplotype-tagging SNP</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
HPC	<i>Hereditary prostate cancer</i>
HPCX	<i>Hereditary prostate cancer on chromosome X</i>
HPLC-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IC95%	<i>Intervalle de confiance à 95%</i>
IMC	<i>Indice de masse corporelle</i>
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LHRH	<i>Luteinizing hormone releasing hormone</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
PIN	<i>Prostatic intraepithelial neoplasia</i>
NQO	<i>NAD(P)H quinone oxidoreductase</i>
NTD	<i>N-terminal domain</i>
OATP	<i>Organic anion-transporting polypeptides</i>
P450scc	<i>Cytochrome P450scc side-chain clivage</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLCO	<i>Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial</i>
PR	<i>Récepteur à la progestérone</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RR	<i>Risques relatifs (odds ratios)</i>
RTK	<i>Récepteurs tyrosines kinases</i>
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SHBG	<i>Sex hormone-binding globulin</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
SRC-1	<i>Steroid receptor coactivator 1</i>
STS	<i>Sulfatase</i>
SULT	<i>Sulfotransférase</i>
TMMM	<i>Tumeurs mixtes müllériennes malignes</i>
TNM	<i>Système de classification Tumors, Nodes, Metastasis</i>
TPA	<i>Thérapie de privation androgénique</i>
UGT	<i>Uridine diphospho-glucuronosyltransférase</i>

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1. Les hormones stéroïdiennes sexuelles et le cancer

Les cas de cancer les plus fréquemment diagnostiqués sont des cancers dit hormonodépendants et ce, tant chez la femme que chez l'homme. De façon générale, un cancer hormonodépendant se définit par: 1) la présence des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, 2) l'implication de ces récepteurs dans la stimulation de la carcinogenèse et 3) une réponse positive aux traitements ciblant l'action de ces récepteurs (Henderson et al. 2000; Cai and Balk 2011). Au Canada, le cancer du sein est le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme, tandis que c'est celui de la prostate qui a la plus grande incidence chez l'homme (Société canadienne du cancer 2011). En 2011 seulement, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués pour chacune de ces deux formes de cancer est estimé à 23 400 et 25 500, respectivement, et elles comptent pour environ le tiers des nouveaux cas répertoriés à chaque année pour chacun des sexes, tant au Canada qu'aux États-Unis (Société canadienne du cancer 2011; Jemal et al. 2011). Le cancer du corps de l'utérus (de l'endomètre) est un autre cancer hormonodépendant fréquent. En effet, il est le 4^e cancer en terme d'incidence au Canada, représentant 5,5% des cas de cancers chez la femme (Société canadienne du cancer 2011). Les cancers associés aux hormones stéroïdiennes sexuelles sont donc un problème de santé publique majeur dans les pays occidentaux.

L'âge et les antécédents familiaux de cancer représentent des facteurs de risque associés à la majorité des cancers. Toutefois, entre autres pour les cancers du sein et de l'endomètre, plusieurs autres facteurs de risque hormonaux entrent en ligne de compte. Ceux-ci engendrent généralement une exposition prolongée aux hormones stéroïdiennes telles l'obésité, des premières menstruations précoces, une ménopause tardive, ou la nulliparité (Bokhman 1983; Henderson et al. 2000; Kaaks et al. 2002; Powles 2002; Liu 2007; Eliassen et al. 2008; Phipps et al. 2008). En fait, certaines hormones stéroïdiennes affectent la prolifération et la survie cellulaires. Si cette stimulation devient excessive ou désordonnée, elle peut entraîner la transformation maligne et favoriser le développement tumoral. Ainsi, chez la femme, les cancers hormonodépendants sont principalement associés aux œstrogènes, alors que chez l'homme ce sont principalement les androgènes qui sont associés au cancer de la prostate.

Les premiers cas de cancer du sein répertoriés remontent à l'époque des Égyptiens, 3000 ans avant Jésus Christ (Rayter et al. 2008). Toutefois, il fallut attendre les années 1890 pour avoir les premiers liens de causalité entre les hormones stéroïdiennes et ce cancer hormonodépendant, alors que Beaston relia l'ovariectomie à une régression temporaire du cancer du sein métastatique chez deux patientes (Buzdar 2003; Rayter et al. 2008). À cette époque, la mastectomie et l'ovariectomie étaient les moyens chirurgicaux utilisés pour combattre la maladie. L'isolation du récepteur des œstrogènes alpha (ER α pour *estrogen receptor alpha*) en 1966 (Toft et al. 1966) et la caractérisation de son expression dans les tumeurs du sein confirmèrent la dépendance hormonale de cette maladie (Nadji et al. 2005). Les premières évidences quant au rôle des androgènes dans le cancer de la prostate remontent aux années 40 du dernier siècle. À cette époque, Huggins et Hodges ont observé qu'une réduction des androgènes dans la circulation sanguine entraînait une régression du cancer de la prostate métastatique et, qu'au contraire, l'administration d'androgènes stimulait la croissance tumorale (Huggins et al. 1941, 2002). Charles B. Huggins reçut notamment le prix Nobel de physiologie ou médecine de 1966 suite à la publication de ses travaux. L'utilisation de l'ovariectomie et l'orchiectomie comme traitements des cancers du sein et de la prostate, respectivement, a donc démontré l'hormonodépendance de ces cancers, jetant les bases des thérapies médicales contemporaines.

Les thérapies anti-cancer ciblant la synthèse et l'action des hormones stéroïdiennes sont de plus en plus fréquentes grâce à une meilleure connaissance de l'étiologie moléculaire des cancers hormonodépendants. Le fer de lance thérapeutique dans le traitement du cancer du sein est le blocage du récepteur aux œstrogènes ou l'inhibition de la synthèse des œstrogènes (Coombes et al. 2004; Thurlimann et al. 2005; Dodwell et al. 2006; Jordan 2006; Moulder et al. 2008; Mouridsen et al. 2009). Pour le traitement des cancers de l'endomètre récurrents ou avancés qui expriment les récepteurs hormonaux, les progestatifs pourront être utilisés pour freiner la progression tumorale (NCI 2012). L'arsenal médical ciblant le cancer de la prostate n'est pas très différent, puisqu'il inclut la castration (chirurgicale ou pharmacologique) afin de diminuer la production d'androgènes par les testicules, mais aussi différents antagonistes du récepteur aux androgènes (*androgen receptor* ou AR) et des inhibiteurs de la synthèse androgénique extra-testiculaire

(Thompson et al. 2003; Attard et al. 2009; Andriole et al. 2010; Sharifi et al. 2010; Attard et al. 2011; de Bono et al. 2011; Labrie 2011). Bien que l'importance des hormones stéroïdiennes dans ces cancers ne soit plus à démontrer, l'élucidation des mécanismes moléculaires sous-jacents demeure une priorité de la recherche scientifique actuelle.

L'objectif général de cette thèse est de mieux définir la relation entre les hormones stéroïdiennes sexuelles et l'évolution des cancers hormonodépendants de l'endomètre et de la prostate. L'hypothèse sous-jacente est que le déséquilibre de la synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes sexuelles est associé à une modification dans les processus de transformation maligne et d'évolution de ces 2 cancers. Ainsi, une meilleure compréhension de leur rôle dans ces cancers pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et d'identifier des biomarqueurs pronostiques.

Les prochaines sections du Chapitre I de cette thèse ont pour objectif de définir les voies de synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes, mais aussi leur rôle dans la transformation maligne et la progression de deux cancers hormonodépendants, celui de l'endomètre et celui de la prostate, sur lesquels mes travaux de doctorat portent. Par la suite, les résultats des recherches auxquelles j'ai participé sont présentés aux Chapitres II à VIII de cette thèse sous la forme d'insertion d'articles.

Tout d'abord, les Chapitres II à IV portent sur l'étude du rôle des hormones stéroïdiennes, et plus particulièrement des œstrogènes et de leurs métabolites, dans le contexte du cancer de l'endomètre. Les résultats documentent la quantification de l'expression de 19 gènes de la stéroïdogénèse ainsi que l'analyse des niveaux circulants de 18 stéroïdes. Par conséquent, une attention particulière sera portée, tout au long de cette thèse, sur la mise en évidence du rôle des hormones stéroïdiennes, par l'étude de leurs niveaux tissulaire et circulant, mais aussi de l'expression de leurs voies de synthèse et de métabolisme, dans le contexte du cancer de l'endomètre.

Par la suite, les Chapitres V à VIII portent sur la relation entre des variations génétiques et la progression du cancer de la prostate, en s'attardant principalement à des polymorphismes de gènes candidats de la stéroïdogénèse. Étant donné l'évolution lente et particulière du cancer de la prostate, une attention spéciale sera portée dans l'introduction

sur le développement et la progression de cette maladie, sur les modèles de prédiction du risque de progression et finalement sur le lien entre la génétique et ce cancer.

Pour conclure, le Chapitre IX est une discussion des résultats présentés dans le cadre de ma thèse. Une description critique des limites et des forces des travaux de recherche sera effectuée, tout en discutant des perspectives et des avenues rendues possibles grâce à ces résultats.

2. Hormones stéroïdiennes sexuelles

2.1 Stéroïdogénèse et hormones stéroïdiennes sexuelles

La synthèse de toutes les hormones stéroïdiennes se fait à partir du cholestérol (**Figure 1**). L'entrée du cholestérol dans les mitochondries est facilitée par la *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), possiblement en association avec le récepteur périphérique aux benzodiazépines (Hauet et al. 2002; Bogan et al. 2007). Ces deux protéines font partie d'un complexe appelé *transduceosome* qui permet au cholestérol de traverser les membranes externes et internes des mitochondries, dans lesquelles s'effectue la première étape de la conversion du cholestérol (Midzak et al. 2011). Cette étape est catalysée par l'action de l'enzyme cytochrome P450 (CYP) famille 11, sous-famille A, polypeptide 1 (CYP11A1), aussi connue sous le nom du cytochrome P450_{scc} (*side-chain cleavage*), et permet la formation du prégnénolone. À partir de cette molécule, plusieurs transformations enzymatiques entraînent la formation de la progestérone, des glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone), des minéralocorticoïdes (aldostérone) et des hormones stéroïdiennes sexuelles (androgènes et œstrogènes) (**Figure 1**). La dernière voie est celle d'intérêt dans le cadre de mes travaux.

La double action de la CYP17A1, i.e. l'hydroxylation en position C17 puis l'activité 17,20 lyase, permet la synthèse des précurseurs androgéniques : la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione (4-dione) (Luu-The et al. 2008). Les 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénases (3 β -HSD) de types 1 et 2, avec leur activité Δ^5 - Δ^4 isomérase, permettent la conversion de la DHEA en 4-dione, mais aussi de l'androst-5-ène-3 β , 17 β -diol (5-diol) en testostérone (Luu-The 2001; Labrie et al. 2005; Luu-The et al. 2008; Luu-The et al. 2010).

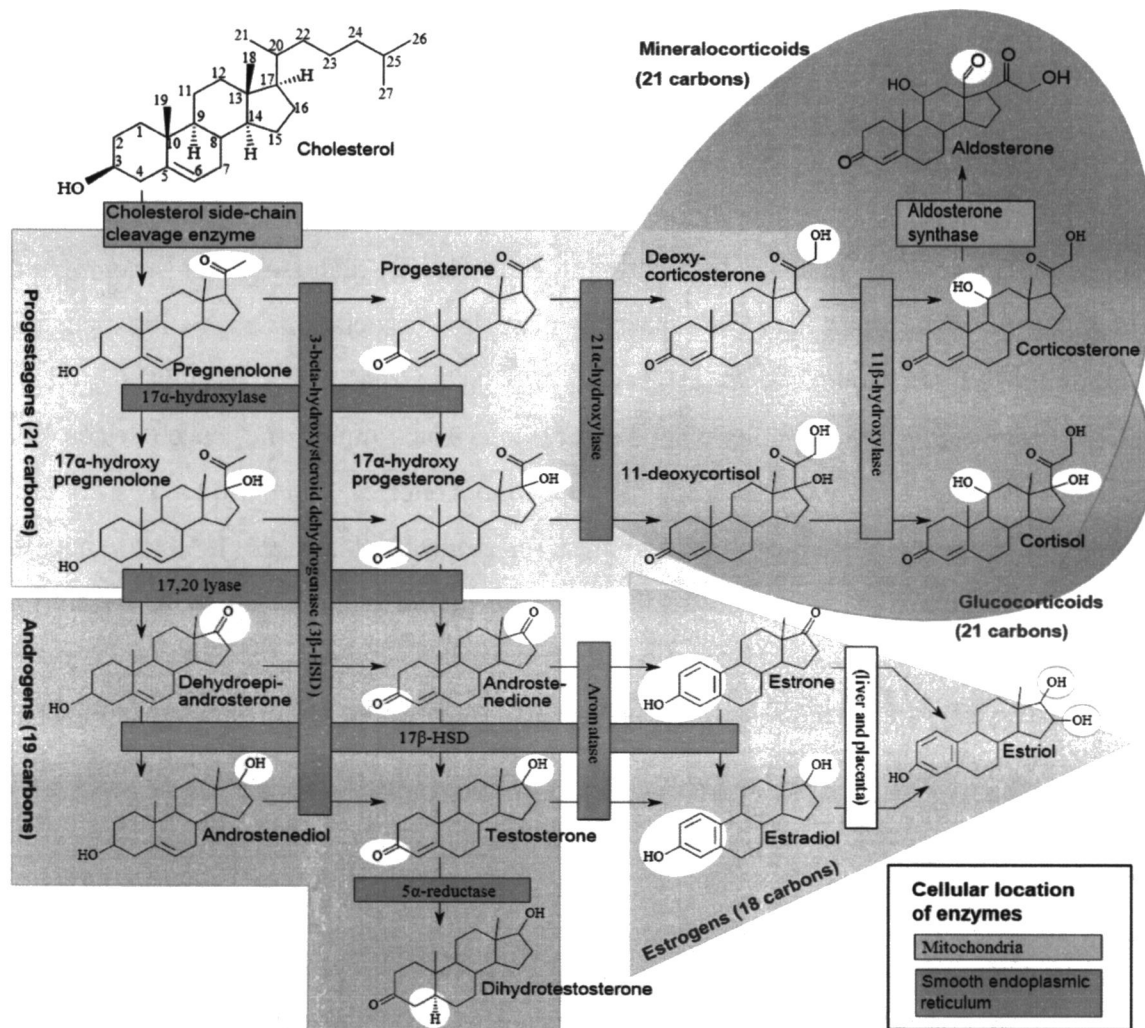


Figure 1. Schéma de la stéroïdogénèse. Tous les stéroïdes dérivent du cholestérol, qui est transformé en C21 suite à l'action de CYP11A1. Les cercles blancs indiquent les changements moléculaires suivant les différentes réactions enzymatiques qui sont indiquées dans les rectangles vert et orange. L'action irréversible 17,20 lyase de CYP17A1 permet la conversion des stéroïdes C21 en C19, parmi lesquels figurent les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone [DHT]). L'action irréversible de l'aromatase, à partir de la 4-dione ou de la testostérone permettra la synthèse des stéroïdes C18, c'est-à-dire les œstrogènes (E₁ et E₂). Figure tirée de Häggström, 2009.

L'action des 5 α -réductases de types 1 et 2 permet la conversion de la 4-dione et de la testostérone en androstane-dione (A-dione) et en DHT, respectivement (Andersson et al. 1990; Jenkins et al. 1991; Labrie et al. 1992; Sugimoto et al. 1995). Bien

qu'historiquement il était considéré que la DHT était formée à partir de la testostérone, il est maintenant évident que la DHT peut aussi être formée par d'autres voies (Auchus 2004; Luu-The et al. 2008; Mohler, Titus and Wilson 2011; Penning 2011). En effet, puisque les 5α -réductases ont une plus forte affinité pour la 4-dione que pour la testostérone (Andersson et al. 1990; Luu-The et al. 2010), la 4-dione peut être préalablement transformée en A-dione par les 5α -réductases, puis en DHT par l'action des 17β -hydroxystéroïde déshydrogénases (17β -HSD) de types 3, 5 et 15 (Luu-The et al. 2008; Chang et al. 2011). Une autre voie de synthèse de la DHT a été décrite dans les testicules de souris et de Kangourou (*Tammar wallaby*) et surnommée *the backdoor pathway to DHT* (Auchus 2004). Cette voie implique la réduction 5α des C21 qui seront par la suite convertis en C19 par la CYP17A1, donc après l'action des 5α -réductases, et non avant comme dans la voie classique de synthèse de la DHT (**Figure 2**). Ainsi, la DHT pourra être formée par plusieurs voies différentes, selon l'expression respective des enzymes correspondantes.

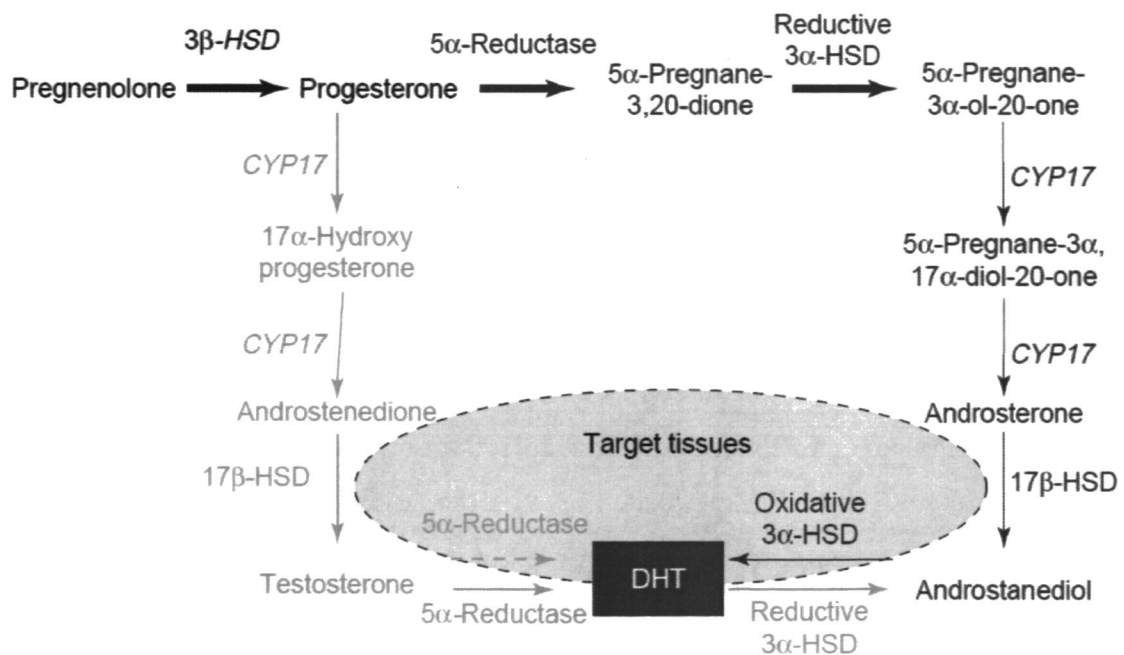


Figure 2. La synthèse de la DHT peut se faire par l'intermédiaire de voies alternatives. La voie classique de synthèse de la DHT, par l'intermédiaire de la testostérone, est en orange et celle de la *backdoor pathway* chez la souris est en bleu. Dans la voie classique, CYP17A1 effectue son activité enzymatique avant l'action des 5α -réductases, tandis que dans la voie alternative c'est l'inverse. Tiré de Auchus, 2004.

Les œstrogènes estrone (E_1) et estradiol (E_2) sont produits à partir des précurseurs de la DHT. En fait, l'action irréversible de l'aromatase (CYP19) convertit la 4-dione et la testostérone en E_1 et en E_2 , respectivement (Baggett et al. 1956; Thompson et al. 1974b, 1974a; Yoshida et al. 1991; Bulun et al. 2005; Bukulmez et al. 2008). Il est à noter que l'aromatase a une affinité plus grande pour la 4-dione que pour la testostérone. Ainsi, la synthèse des œstrogènes se ferait principalement par la conversion du 4-dione en E_1 , suivi de la conversion en E_2 par les 17β -HSD œstrogéniques (Luu-The 2001; Vihko et al. 2006; Luu-The et al. 2008; Luu-The et al. 2010). Enfin, le sulfate d'estrone (E_1 -S) est formé à partir de l' E_1 par les sulfotransférases (SULT) SULT1E1 et SULT1A1, tandis que la sulfatase stéroïdienne a une action inverse et permet la formation de l' E_1 (Hempel et al. 2007; Purohit et al. 2011; Suzuki et al. 2011). L' E_1 -S en circulation constitue un réservoir d'œstrogènes pour la production d' E_2 intra-tissulaire.

Pour la synthèse d'hormones actives, tant des androgènes que des œstrogènes, une hydroxylation en position C17 est requise (réaction de réduction; **Figure 3**). Cette réaction est catalysée par plusieurs membres de la famille des 17β -HSD. Notamment, les 17β -HSD de types 3 et 5 permettent la conversion du 4-dione en testostérone et du A-dione en DHT (Luu-The 2001; Vihko et al. 2006; Luu-The et al. 2008; Luu-The et al. 2010). Les 17β -HSD de types 1, 7 et 12 sont quant à elles considérées comme œstrogéniques et catalysent la transformation de l' E_1 en E_2 , ce dernier étant l'œstrogène endogène le plus puissant (Peltoketo et al. 1999; Luu-The 2001; Luu-The et al. 2006; Vihko et al. 2006; Luu-The et al. 2008; Luu-The et al. 2010). Au contraire, certaines 17β -HSD sont connues pour catalyser la réaction opposée (oxydation), inactivant par le fait même les stéroïdes sexuels (Luu-The 2001; Vihko et al. 2006; Luu-The et al. 2008; Luu-The et al. 2010). Par exemple, la 17β -HSD de type 2 inactive la testostérone et l' E_2 en les convertissant en 4-dione et en E_1 , respectivement. L'équilibre de l'oxido-réduction régira donc, de façon réversible, le ratio entre stéroïdes actifs et stéroïdes inactifs.

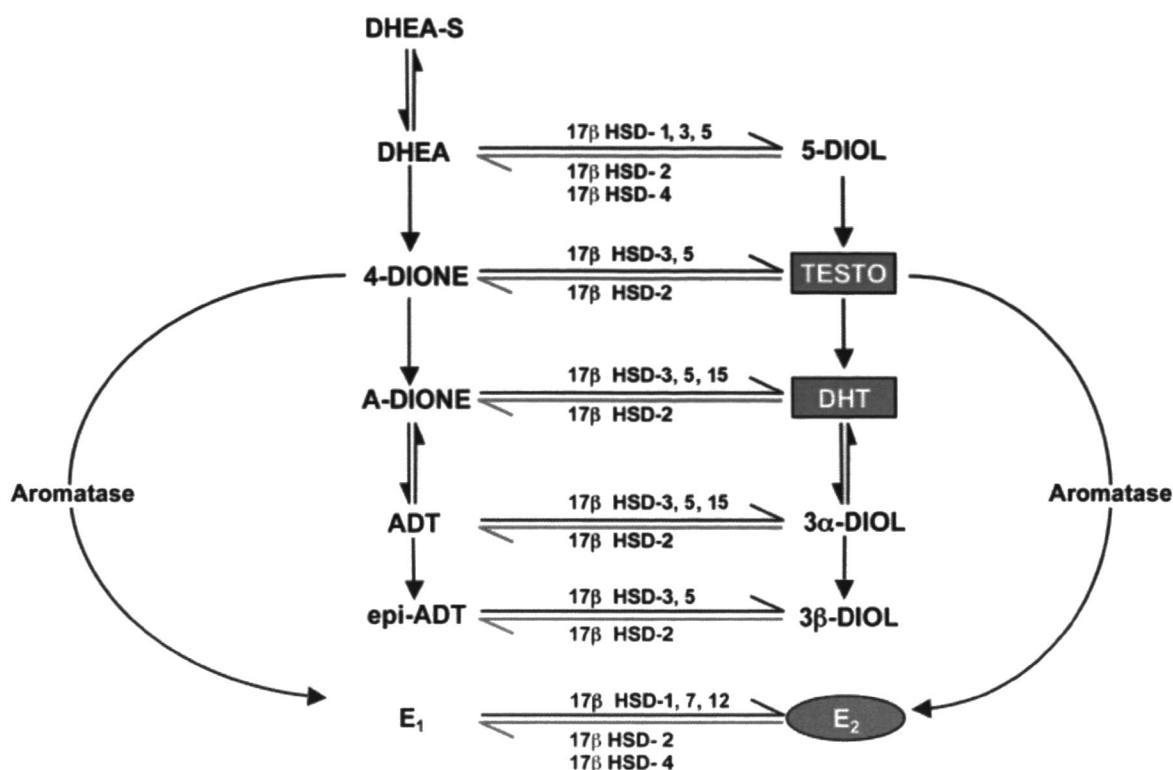


Figure 3. Activité enzymatique de différentes 17 β -HSD chez l'humain. À noter que les enzymes favorisant la conversion de la gauche vers la droite du schéma catalysent une réaction de réduction alors qu'à l'inverse, celles qui catalysent la réaction de droite à gauche favorisent une réaction d'oxydation. Figure basée sur plusieurs publications (Luu-The 2001; Labrie et al. 2005; Luu-The et al. 2008).

En résumé, la synthèse et le métabolisme des stéroïdes sexuels impliquent que plusieurs voies alternatives peuvent conduire à la synthèse de la même molécule. De plus, puisqu'il y a une redondance d'activité entre plusieurs enzymes (3 17 β -HSD permettant la synthèse de l'E₂, 3 17 β -HSD permettant la synthèse de la DHT), le contrôle de l'expression génique va jouer un rôle déterminant dans la production hormonale. Par exemple, la 3 β -HSD type 2, bien qu'ayant une affinité 10 fois moindre que la type 1 pour la DHEA (Rheume et al. 1991), est la seule des deux qui cause une malformation congénitale lorsque mutée (Rheume et al. 1992; Simard et al. 2000; Luu-The et al. 2008). Ainsi, l'importance d'une enzyme n'est pas seulement fonction de ses constantes cinétiques, mais dépendra aussi de son expression, tant temporelle que tissulaire.

2.2 Métabolisme des hormones stéroïdiennes sexuelles

2.2.1 Catabolisme des androgènes

Il est maintenant établi que les niveaux circulants de DHT ne sont pas représentatifs de l'exposition à laquelle les cellules cibles des androgènes sont soumises. Notamment, dans le contexte de la castration chez l'homme, on observe une diminution de plus de 90% de la testostérone et de la DHT en circulation, mais de seulement 50% des niveaux de DHT intra-prostatiques (Geller et al. 1978; Bélanger et al. 1989; Labrie et al. 2001; Labrie et al. 2009). Dans la circulation sanguine, les glucuronides de l'androstérone (ADT) et de l'androstane-3 α , 17 β -diol (3 α -diol), des dérivés de la DHT, sont en plus grande quantité que cette dernière. En effet, la DHT peut être convertie de façon réversible en ADT et en 3 α -diol, qui pourront par la suite être conjuguées par les uridine diphospho-glucuronosyltransférases (UGT). Ainsi, l'inactivation du signal androgénique se fait par la conjugaison de ces deux dérivés, ce qui les rend plus solubles et plus facilement éliminables par la bile ou l'urine (Bélanger et al. 2003; Chouinard et al. 2008). Par exemple, l'ADT-3-glucuronide (ADT-G) est 25 à 100 fois plus concentrée que la testostérone-glucuronide en circulation (Peng et al. 2000; Peng et al. 2002). En circulation, ces métabolites glucuronides de la DHT sont des indicateurs de l'activité androgénique dans les tissus périphériques (Bélanger et al. 1986; Bélanger et al. 2003; Labrie et al. 2006).

La voie de la glucuronidation des androgènes est effectuée par les enzymes UDP-glucuronosyltransférases (UGT) des sous-familles 1A (UGT1A), 2A (UGT2A) et 2B (UGT2B) (Beaulieu et al. 1996; Lévesque et al. 1997; Coffman et al. 1998; Albert et al. 1999; Cheng et al. 1999; Dubois et al. 1999; Lévesque et al. 2001; Bélanger et al. 2003; Sten, Bichlmaier, et al. 2009; Sten, Kurkela, et al. 2009). Toutefois, ce sont les membres de la sous-famille UGT2B qui possèdent l'activité de conjugaison des androgènes la plus élevée (Bélanger et al. 2003). Par exemple, les UGT1A3, UGT1A4, UGT1A8, UGT1A9 et UGT1A10 conjuguent la testostérone, mais avec une activité de 50 à 100 fois moindre que celle de l'UGT2B17 (Sten, Bichlmaier, et al. 2009). Les enzymes UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17 sont les UGT2B ayant la plus grande activité de conjugaison de la DHT et de ses métabolites (Beaulieu et al. 1996; Lévesque et al. 1997; Coffman et al. 1998; Dubois et

al. 1999; Bélanger et al. 2003; Turgeon et al. 2003). Ces différentes enzymes inactivent la DHT et ses dérivés avec une spécificité de substrat et une régio-sélectivité propre à chaque UGT2B (**Figure 4**). Par exemple, l'enzyme UGT2B7 effectue la conjugaison d'un groupement glucuronide en position C3 du 3 α -diol, tandis que les enzymes UGT2B15 et UGT2B17 agissent principalement en position C17 (Bélanger et al. 2003). L'enzyme UGT2B28 a aussi été décrite comme pouvant catalyser la réaction de glucuronidation de la testostérone, du 3 α -diol et de l'ADT, sans que les constantes cinétiques ou la position de glucuronidation n'aient été déterminées avec précision (Lévesque et al. 2001). Par conséquent, les enzymes UGT2B7, UGT2B15, UGT2B17, et possiblement UGT2B28, sont considérées comme les principales enzymes participant à la conjugaison de la DHT et de ses dérivés.

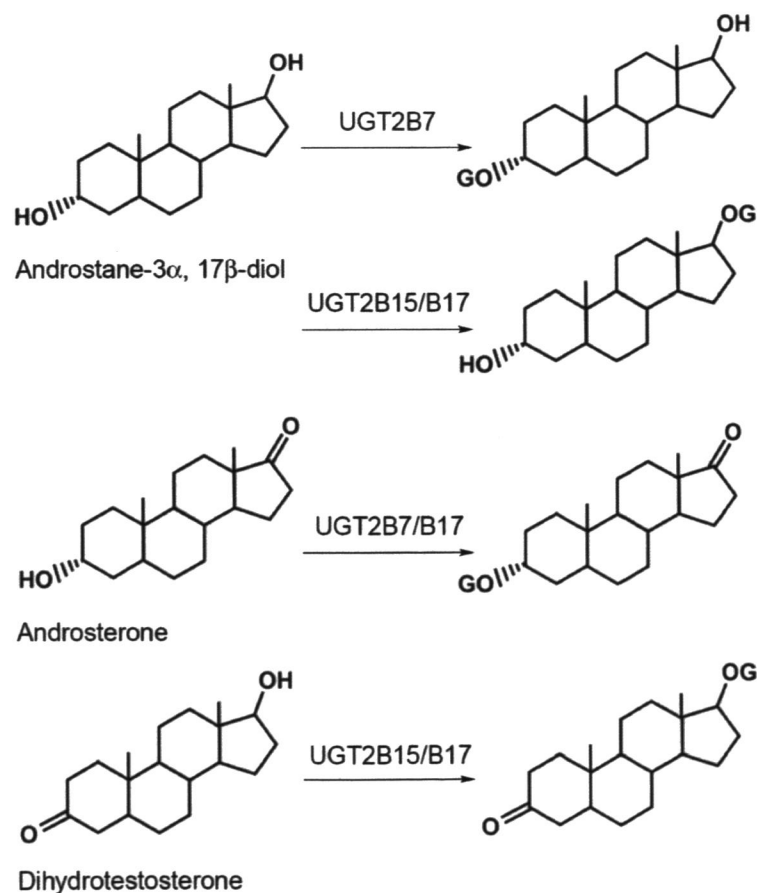


Figure 4. Spécificité et régio-sélectivité des enzymes UGT2B pour les principaux androgènes. G : glucuronide. Tiré de Bélanger et coll. 2003.

2.2.2 Métabolisme des œstrogènes

Le métabolisme des œstrogènes parentaux (E_1 et E_2) par des enzymes du métabolisme de phases I (CYP) et II (SULT, catéchol-*O*-méthyltransférase [COMT], UGT, glutathion S-transférase [GST], NAD(P)H quinone oxidoréductase [NQO]) entraîne la synthèse de dizaines de nouvelles molécules, permettant l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques pour certaines d'entre elles. Plusieurs membres de la superfamille des CYP peuvent hydroxyler les œstrogènes parentaux. Lors de cette première étape enzymatique, trois voies prédominent : la 2-, la 4- ou la 16-hydroxylation (2-OH, 4-OH et 16-OH, respectivement, **Figure 5**) (Zhu et al. 1998a; Xu et al. 1999; Lee, Cai, et al. 2003; Tsuchiya et al. 2005; Xu et al. 2005; Eliassen et al. 2012).

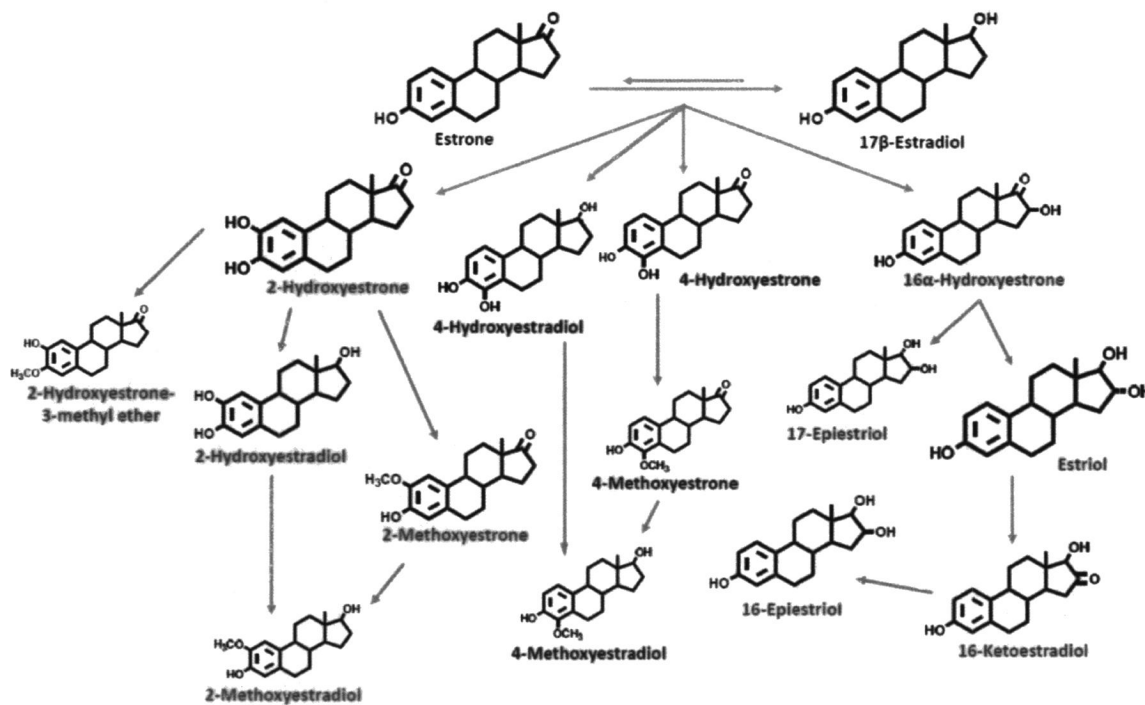


Figure 5. Voies majeures d'hydroxylation de l' E_1 et de l' E_2 . Les métabolites des œstrogènes sont illustrés selon les trois voies principales d'hydroxylation, i.e. la formation des dérivés 2-OH (vert), 4-OH (bleu) et 16-OH (mauve). Adapté d'Eliassen et coll. 2012.

L'activité enzymatique des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A4 entraîne la formation des dérivés de la voie 2-OH (Lee, Cai, et al. 2003; Tsuchiya et al. 2005). Ces dérivés n'induisent pas la prolifération des cellules utérines comme le fait l' E_2 chez des rattes ovariectomisées (Westerlind et al. 1998), ce qui est en accord avec une diminution de

$\geq 75\%$ de l'affinité et de l'activité de l'ER α envers le 2-OHE₂ comparativement à l'E₂ (Schutze et al. 1993; Schutze et al. 1994). Ces métabolites sont donc considérés comme faiblement œstrogéniques. Toutefois, les dérivés 2-OH peuvent être méthylés de façon réversible par la COMT, avec la formation de 2 à 3 fois plus de dérivés méthylés en position C2 qu'en position C3 (Dawling et al. 2001; Dawling et al. 2003; Dawling et al. 2004; Bai et al. 2007). Formé à la suite de cette réaction, le 2-méthoxyestradiol (2-MeOE₂) a des propriétés anti-angiogéniques, anti-prolifératives et pro-apoptiques. Tout comme les dérivés 2-OH, le 2-MeOE₂ a une affinité pour l'ER α et l'ER β très faible, soit de 500 à 3000 fois inférieure à celle de l'E₂ (Merriam et al. 1980; LaVallee et al. 2002; Zhu et al. 2006). Par conséquent, l'action du 2-MeOE₂ ne passe pas par ces récepteurs. En fait, ce métabolite empêche la polymérisation de la tubuline en se liant au site de liaison de la colchicine (D'Amato et al. 1994; Cushman et al. 1995) et en activant l'apoptose via p53 (Carothers et al. 2002). Le 2-MeOE₂ représente donc un métabolite endogène anti-tumoral, ce qui est aussi illustré par sa capacité à bloquer la prolifération de plusieurs lignées cellulaires dérivées de tumeurs (Cushman et al. 1995; Zhu et al. 1998b; Carothers et al. 2002; Li, Heldin, et al. 2004). La voie de la 2-OH est donc considérée comme protectrice via l'inactivation de l'E₂ et la production du 2-MeOE₂ anti-cancérogène.

Les métabolites de la voie 4-OH sont principalement formés par l'action de CYP1B1 (Lee, Cai, et al. 2003). Bien que plusieurs autres CYP puissent produire des dérivés 4-OH (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4), seul CYP1B1 forme préférentiellement des 4-OH (Lee, Cai, et al. 2003). En effet, il entraîne la formation de 300% plus de dérivés 4-OH que de 2-OH, contrairement aux autres CYP qui généralement forment de 200 à plus de 800% plus de dérivés 2-OH (Lee, Cai, et al. 2003). Les dérivés 4-OH forment des dérivés instables qui peuvent être oxydés en quinones œstrogènes et former des adduits dépurinants à l'ADN (Cavalieri et al. 1997; Cavalieri et al. 2006; Fussell et al. 2011). Lors de la formation de ces quinones, il y a production de radicaux libres, donc production de stress oxydatif et de dommages à l'ADN (Chen et al. 2005; Fussell et al. 2011). Les GST permettent la conjugaison et l'inactivation irréversible des quinones, tandis que les NQO permettront la reconversion de ces quinones en catéchol, processus réversible, mais protecteur (Cavalieri et al. 2004; Cavalieri et al. 2006; Gaikwad et al. 2007; Chandrasena et al. 2008; Gaikwad, Yang, Rogan, et al. 2009). Les dérivés 4-OH entraînent aussi une

instabilité des microsattellites, indiquant un accroissement d'erreurs de type mésappariement (Salama et al. 2008). Enfin, les dérivés 4-OH peuvent, tout comme ceux de la voie 2-OH, être méthylés de façon réversible par la COMT, ce qui les inactivera et protégera contre des dommages à l'ADN (Dawling et al. 2001; Dawling et al. 2003; Dawling et al. 2004; Bai et al. 2007). Les 4-OH sont donc considérés comme cancérogènes, principalement à cause de leurs effets mutagènes.

L'hydroxylation en position C16 entraîne la synthèse de deux des métabolites des œstrogènes les plus étudiés. Le premier est l'estriol (E_3), dont les niveaux urinaires varient jusqu'à 10 fois durant le cycle menstruel et jusqu'à 100 fois durant la grossesse (Adlercreutz et al. 1970; Iwai et al. 1981; Berg et al. 1992; Qin et al. 2008). En fait, des niveaux faibles ou indétectables d' E_3 en circulation lors de la grossesse sont indicateurs de malformations fœtales et de prématurité (Farquhar 1971; McGregor et al. 1995; Goodwin 1999). L'affinité de l' $ER\alpha$ est 10 fois moindre pour l' E_3 que pour l' E_2 , ce qui explique pourquoi l' E_3 doit se retrouver à des concentrations 10 fois supérieures à l' E_2 pour activer la transcription au même niveau (Lippman et al. 1977; Katzenellenbogen 1984; Melamed et al. 1997). Le deuxième dérivé principal de cette voie est le 16α -hydroxyestrone (16α -OHE₁), formé majoritairement par CYP3A4 et CYP3A7 (Lee, Cai, et al. 2003; Lee, Conney, et al. 2003), qui se lie de façon covalente à l' $ER\alpha$ (Swanek et al. 1988). Une fois lié au récepteur, ce métabolite y reste donc plus longtemps accroché que l' E_2 (Swanek et al. 1988). Cette liaison covalente à l' $ER\alpha$ pourrait expliquer comment le 16α -OHE₁ induit 18 fois plus que l' E_2 certains phénotypes tumoraux, notamment la croissance *anchorage-independent* (Telang et al. 1992). Ainsi, notamment à cause du 16α -OHE₁, la voie 16-OH est considérée comme cancérogène, même si les autres métabolites de cette voie, tel l' E_3 , sont peu ou pas cancérogènes ou œstrogéniques.

Les dérivés de ces trois voies d'hydroxylation des œstrogènes ont été principalement étudiés dans l'urine chez les femmes pré- et postménopausées. Dans l'urine, les métabolites des voies 2-OH et 16-OH sont les métabolites prédominants (**Figure 6**) (Falk et al. 2008; Faupel-Badger et al. 2010; Eliassen et al. 2012; Huang et al. 2012). Généralement les niveaux des dérivés 2-OH et 16-OH sont similaires, bien que ceux de la voie 16-OH puissent représenter jusqu'à 60% de tous les œstrogènes urinaires (Falk et al. 2008; Faupel-Badger et al. 2010; Eliassen et al. 2012; Huang et al. 2012). La voie 4-

OH ne correspond quant à elle qu'à une petite fraction des œstrogènes urinaires (<5%), tant chez les femmes préménopausées que postménopausées (Falk et al. 2008; Faupel-Badger et al. 2010; Eliassen et al. 2012; Huang et al. 2012). Toutefois, des dérivés 4-OH associés à une purine (guanine ou adénine), donc qui ont endommagé l'ADN, sont détectables dans l'urine des hommes et des femmes, ce qui implique que même à des niveaux très faibles ils peuvent entraîner la dépurination de l'ADN et possiblement des mutations (Gaikwad, Yang, Pruthi, et al. 2009; Yang et al. 2009). Il est aussi à noter que les métabolites des voies 2-OH, 4-OH et 16-OH sont aussi détectables chez les hommes de façon similaire aux femmes postménopausées, tant en ce qui a trait aux concentrations urinaires qu'aux pourcentages que représentent chaque voie d'hydroxylation des œstrogènes (Falk et al. 2008). Ainsi, les métabolites des voies majeures d'hydroxylation des œstrogènes sont détectables chez la femme mais aussi chez l'homme.

Toutefois, même dans les récentes études portant sur les œstrogènes, les dosages sont effectués après l'hydrolyse des groupements sulfate et glucuronide (Xu et al. 2007; Faupel-Badger et al. 2010; Eliassen et al. 2012; Fuhrman et al. 2012; Huang et al. 2012). En effet, les métabolites des voies 2-OH, 4-OH et 16-OH peuvent être conjugués de façon réversible par l'action des SULT ou des UGT, tout comme le sont les œstrogènes parentaux (Faucher et al. 2001; Lépine et al. 2004; Starlard-Davenport et al. 2007). Bien que l'étude exhaustive de la conjugaison d'un groupement sulfate n'ait pas été encore faite, la spécificité et la régio-sélectivité des enzymes UGT pour les métabolites des œstrogènes sont mieux caractérisées (**Figure 7**). Ce sont principalement les membres de la sous-famille UGT1A qui sont responsables de l'élimination des œstrogènes (Guillemette et al. 2004; Lépine et al. 2004; Starlard-Davenport et al. 2007). Toutefois, certaines UGT2B ont aussi une activité de conjugaison non-négligeable envers certains œstrogènes, notamment l'UGT2B7 qui possède une vitesse maximale (V_{max}) de 5 à 800 fois plus grande que les UGT1A1, UGT1A8 et UGT1A9 pour la conjugaison du 4-OHE₁ (Lépine et al. 2004; Starlard-Davenport et al. 2007). L'importance de la voie de la glucuronidation dans la conjugaison des métabolites des œstrogènes est illustrée par différentes expériences *in vitro*. Notamment, dans des essais enzymatiques chez des cellules dérivées d'un hépatocarcinome humain (HepG2), la glucuronidation est la voie majeure de catabolisme des dérivés 4-OH (Gerstner et al. 2008). Ainsi, plus de 90% des métabolites des œstrogènes

sériques et urinaires se retrouvent sous forme conjuguée, que ce soit avec un groupement sulfate ou glucuronide (Xu et al. 2007; Ziegler et al. 2010). Par conséquent, une quantification précise des métabolites des œstrogènes libres, des dérivés sulfates et des dérivés glucuronides pourrait être plus informative de l'activité des œstrogènes dans les tissus périphériques, sain ou malade, que le dosage des œstrogènes totaux.

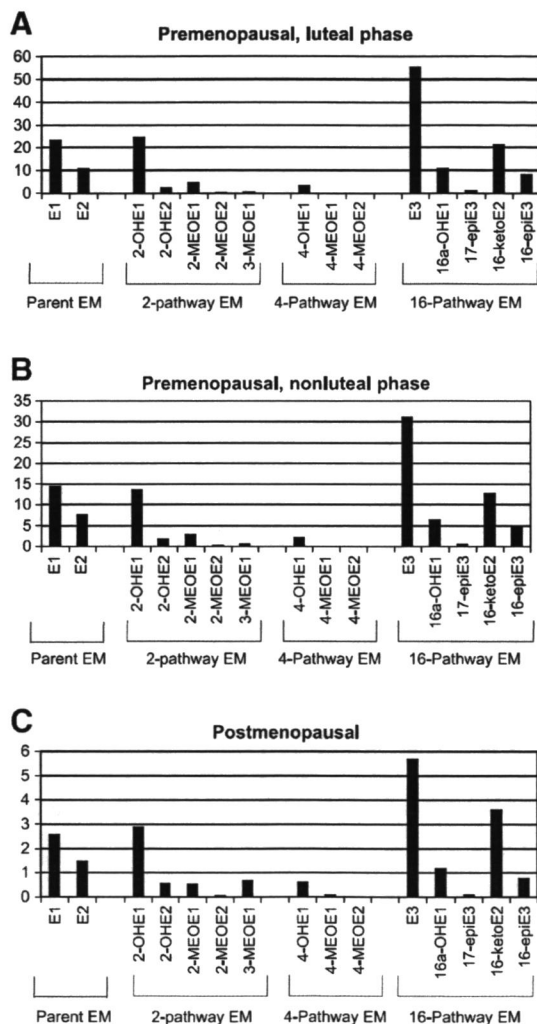
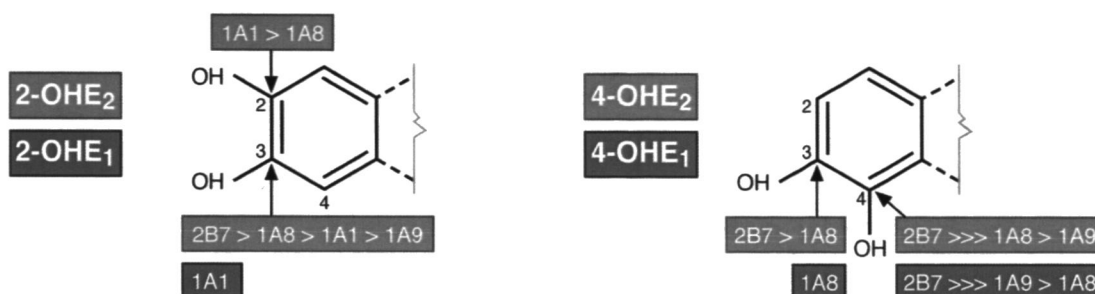


Figure 6. Moyennes géométriques des niveaux urinaires d'œstrogènes et de leurs métabolites provenant des 3 voies majeures d'hydroxylation chez la femme (pmol/mg créatinine). Niveaux des œstrogènes chez 264 femmes en phase lutéale (A), 98 femmes en phase non-lutéale (B) et 168 femmes postménopausées (C). Les femmes prenant des contraceptifs ou sous thérapie hormonale ont été exclues. Le dosage par LC-M/MS a été effectué chez des Américaines d'origine asiatique pour les œstrogènes totaux (non-conjugués et conjugués). Les niveaux diffèrent significativement entre chaque groupe, mis

à part le 4-MeOE₁, le 4-MeOE₂ et le 3-MeOE₁. L'importance relative de chaque voie est similaire entre les groupes. Figure tirée de Faupel-Badger et coll. 2010.

Hydroxylated metabolites:



Methoxy metabolites:

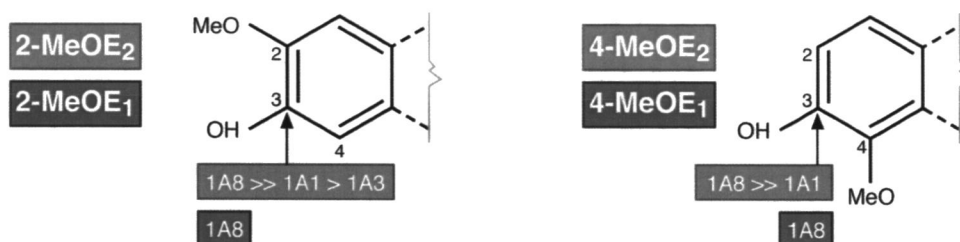


Figure 7. Régio-sélectivité des enzymes UGT humaines pour les métabolites des œstrogènes des voies 2-OH et 4-OH. La couleur rouge indique les dérivés de l'E₂ tandis que la couleur bleue indique ceux de l'E₁. Figure adaptée de Lépine et coll., 2004.

2.3 Synthèse hormonale chez l'humain

Chez l'humain, deux sources majeures d'hormones stéroïdiennes existent : les gonades et les glandes surrénales qui produisent les hormones pour les différents tissus cibles de ces hormones (système cardio-vasculaire, tissu adipeux, système uro-génital, os, etc.). Les gonades sont responsables de la production d'hormones actives en circulation, principalement la testostérone et l'E₂, tandis que les glandes surrénales vont produire des quantités importantes de leurs précurseurs (DHEA-S, DHEA, 4-dione), surnommés les précurseurs surrénaux.

Chez l'homme, les testicules sont responsables de plus de 90% et de 85% de la production de testostérone et de l'E₂ en circulation, respectivement (Labrie et al. 2001;

Labrie et al. 2009). Chez la femme, avant la ménopause, les ovaires produisent plus de 75% de l'E₂, mais aussi de la testostérone, en circulation (Maroulis et al. 1976; Labrie et al. 2001; Labrie et al. 2005). Toutefois, c'est majoritairement après la ménopause que surviennent les cancers hormonodépendants (sein et utérus), donc lorsque les niveaux circulants d'œstrogènes sont à leur plus bas (**Tableau 1**). À ce stade, les ovaires ne sont plus très actifs et ne produisent que peu ou pas d'œstrogènes (Sluijmer et al. 1995; Laughlin et al. 2000; Labrie et al. 2001; Fogle et al. 2007). Par contre, ceux-ci produisent de 20 à 40% des niveaux circulants de 4-dione et de testostérone (Sluijmer et al. 1995; Laughlin et al. 2000; Fogle et al. 2007). Il n'y aura pas chez l'homme, de changement hormonal si « brutal » que la ménopause chez la femme. Toutefois, certains auteurs décrivent une diminution graduelle de la testostérone circulante avec le vieillissement (Bélanger et al. 1994; Vermeulen et al. 2002), bien que d'autres travaux ne décrivent pas de changement de cette hormone en circulation (Labrie et al. 1997).

Les glandes surrénales chez l'humain produisent une quantité importante de précurseurs surrénaux: la DHEA, son dérivé sulfate (DHEA-S), la 4-dione et la 5-diol. À partir de 6 à 8 ans, la production de ces stéroïdes augmente graduellement suite à l'activité de synthèse des glandes surrénales. Le pic de production est atteint dans la vingtaine, puis les niveaux de ces précurseurs chutent graduellement, pour atteindre une diminution de 70% et plus 50 ans plus tard, tant chez l'homme que chez la femme (Labrie et al. 1997). Toutefois, même à cet âge, leurs concentrations circulantes sont de 100 à 1000 fois supérieures aux niveaux circulants des androgènes et des œstrogènes (**Tableau 1**) (Labrie et al. 1997; Labrie et al. 2006; Labrie et al. 2007; Stener-Victorin et al. 2010). Les précurseurs surrénaux circulants peuvent être captés par les tissus puis transformés en hormones actives androgéniques et œstrogéniques (processus d'intracrinologie) (Labrie 1991). Cette production importante de précurseurs d'hormones stéroïdiennes sexuelles par les surrénales est presque exclusivement retrouvée chez les primates (Bélanger et al. 1989). Chez les rongeurs par exemple, la production d'androgènes se fait exclusivement dans les testicules, sans contribution majeure des glandes surrénales (Bélanger et al. 1989). Ainsi, au niveau tissulaire chez l'homme, les androgènes actifs sont d'origines testiculaire (60%) et surrénalienne (40%) (Labrie 1991; Labrie et al. 1993; Labrie et al. 2001). Après la ménopause, les données actuelles suggèrent que près de 100% des œstrogènes tissulaires et

circulants sont produits à partir des précurseurs surrénaliens (Labrie 1991; Labrie et al. 2001). Ainsi, chez les hommes âgés et chez les femmes postménopausées, la contribution à la production intra-tissulaire d'hormone active par les précurseurs surrénaliens est majeure.

Tableau 1. Niveaux circulants des hormones stéroïdiennes sexuelles chez l'humain

Hormones	Concentration plasmatique			
	Homme ¹		Femme ²	
	Jeune <50 ans	Âgé ≥50 ans	Préménopausée 20-40 ans	Postménopausée 55-65 ans
Précurseurs surrénaliens				
DHEA-S	1600 ng/ml	650 ng/ml	1250 ng/ml	600 ng/ml
DHEA	7 ng/ml	2 ng/ml	5 ng/ml	2 ng/ml
4-dione	1,4 ng/ml	1 ng/ml	1 ng/ml	0,4 ng/ml
5-diol	5 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	0,3 ng/ml
Androgènes				
Testostérone	4,8 ng/ml	4,5 ng/ml	0,18 ng/ml	0,14 ng/ml
DHT	0,6 ng/ml	0,4 ng/ml	0,07 ng/ml	0,04 ng/ml
Métabolites des androgènes				
ADT-G	66 ng/ml	50 ng/ml	40 ng/ml	16 ng/ml
3α-diol-3G	1,6 ng/ml	1,5 ng/ml	1 ng/ml	0,6 ng/ml
3α-diol-17G	4,6 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,6 ng/ml
Œstrogènes				
E ₁ -S	500 pg/ml	500 pg/ml	360 pg/ml	230 pg/ml
E ₁	25 pg/ml	33 pg/ml	35 pg/ml	18 pg/ml
E ₂	20 pg/ml	20 pg/ml	35 pg/ml	4 pg/ml

¹ Les données représentent des moyennes des niveaux circulants quantifiés chez des cohortes caucasiennes par des méthodes de dosage par spectrométrie de masse (Vandenput, Labrie, et al. 2007; Vandenput, Mellstrom, et al. 2007; Chouinard et al. 2008; Labrie et al. 2009; Vandenput et al. 2010; Giton et al. 2011).

² Les données représentent les moyennes des niveaux circulants quantifiés chez des cohortes caucasiennes par des méthodes de dosage par spectrométrie de masse (Labrie et al. 2006; Labrie et al. 2007; Labrie et al. 2009; Stener-Victorin et al. 2010).

Chez la femme postménopausée, le surpoids et l'obésité entraînent une augmentation significative des niveaux circulants d'œstrogènes par l'aromatase dans le tissu adipeux (Mahendroo et al. 1991; Mahendroo et al. 1993; Szymczak et al. 1998; Key et al. 2003; Allen et al. 2008). Le tissu adipeux exprime les enzymes de la stéroïdogénèse, notamment l'aromatase (Mahendroo et al. 1991; Mahendroo et al. 1993; Blouin et al.

2009), et l'augmentation des niveaux circulants d'œstrogènes produits par ce tissu est proportionnelle au surpoids de l'individu, généralement calculé à partir de l'indice de masse corporelle (IMC, en kg/m^2) (Kaaks et al. 2002; Key et al. 2003; Key et al. 2011). Les femmes obèses ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$) ont des niveaux circulants d'E₁ et d'E₂ de près de 50% plus élevés que les femmes maigres ($\text{IMC} < 22.5\text{kg/m}^2$) (Key et al. 2011). Le tissu adipeux va relâcher en circulation de l'E₁ et de l'E₂, mais aussi de l'E₁-S. Les tissus périphériques tels le sein et l'utérus vont pouvoir capter ces œstrogènes, qui pourront stimuler la prolifération et la survie cellulaire et favoriser le développement du cancer.

2.4 Actions des hormones stéroïdiennes sexuelles

2.4.1 Transport des hormones

Avant de pouvoir effectuer leurs actions dans les différents tissus de l'organisme, les hormones actives, ou leurs précurseurs, doivent d'abord être transportés des gonades, des glandes surrénales ou du tissu adipeux jusqu'aux cellules cibles par la circulation sanguine. Les stéroïdes non conjugués sont des molécules hydrophobes; leur transport se fait donc en liaison avec des protéines circulantes. De façon générale, la testostérone et l'E₂ sont faiblement liés à l'albumine (50-60%), fortement liés à la SHBG (*sex hormone-binding globulin*; 40%) et sous forme libre ($\approx 1\%$), bien que les différentes fractions peuvent varier en importance (Vermeulen et al. 1999; Diver 2006). La fraction libre, ce dernier 1%, ainsi que parfois la fraction liée faiblement à l'albumine (selon les auteurs), sont dites « actives » puisqu'elles pourront être captées par les tissus périphériques par diffusion passive (Mendel 1989; Key et al. 2002; Diver 2006). Comme ce sont des molécules hydrophobes, on considère qu'elles peuvent facilement traverser les membranes plasmiques des cellules pour aller y accomplir leurs actions.

La situation est toutefois plus complexe, entre autres de par la caractérisation d'un récepteur membranaire à la SHBG, connu depuis plus de 10 ans, mais qui n'a pas encore été identifié (Fortunati 1999; Fortunati et al. 2010). S'ajoute en plus le fait que des précurseurs majeurs des hormones actives se retrouvent sous forme conjuguée dans la circulation sanguine. C'est le cas pour la DHEA-S et l'E₁-S, ainsi que pour d'autres stéroïdes conjugués plus hydrophiles, qui peuvent entrer dans la cellule par le biais de plusieurs transporteurs. Mentionnons notamment des membres de la superfamille des

organic anion-transporting polypeptides (OATP; gènes *SLCO2B1*, *SLCO1B3*, *SLC21A9* et *SLC21A6*), mais aussi des membres de la superfamille des transporteurs *ATP-binding cassettes* (ABC; gènes *ABCC2* et *ABCG2*) (Sasaki et al. 2002; Pizzagalli et al. 2003; Suzuki, Suzuki, et al. 2003; Grube et al. 2006; Hamada et al. 2008; Yang et al. 2011). Malheureusement, il n'existe pas de description exhaustive de l'affinité et de l'activité des multiples transporteurs membranaires pour les hormones stéroïdiennes sexuelles.

Les hormones stéroïdiennes, tant les androgènes que les œstrogènes, sont essentiels à l'embryogenèse, au développement ou au fonctionnement de plusieurs organes et ce, tant chez l'homme que chez la femme (système reproducteur, système cardiovasculaire, peau, tissu adipeux, muscles, etc.). En effet, les hormones stéroïdiennes sexuelles ne sont pas essentielles qu'au développement des caractères sexuels. Par exemple, les androgènes constituent un facteur clé dans le gain et la conservation de la masse osseuse chez l'humain (Tok et al. 2004; Vandenput, Labrie, et al. 2007; Sinnesael et al.). Les œstrogènes quant à eux sont impliqués dans le maintien de cette masse osseuse, ce qui explique en partie pourquoi les femmes postménopausées, qui ont des niveaux diminués d'œstrogènes, ont des os plus fragiles et donc des fractures plus fréquentes que les femmes préménopausées (Goderie-Plomp et al. 2004; Sinnesael et al.). De façon similaire, des faibles niveaux d'œstrogènes sont aussi associés à un risque élevé de fracture chez l'homme : par exemple, une diminution des niveaux moyens d'E₂ de 40% est associée à une augmentation de 40% du risque de fracture de la hanche (Mellstrom et al. 2008). Toutefois, pour accomplir leurs actions dans le système reproducteur ou dans tout autre tissu, les hormones stéroïdiennes devront activer leurs récepteurs respectifs.

2.4.2 Récepteur aux androgènes

Le gène codant pour l'AR est présent en une seule copie chez les hommes, sur le chromosome X. Cette protéine, tout comme l'ER α et l'ER β , fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999). Les membres de cette famille ont une structure protéique bien conservée, incluant un domaine de liaison au ligand (ou *ligand binding domain*; LBD), un domaine de liaison à l'ADN (ou *DNA binding domain*; DBD), ainsi que différents domaines d'activation (ou *activation function*; AF; **Figure 8**) (Handschin et al. 2003; Koochekpour 2010).

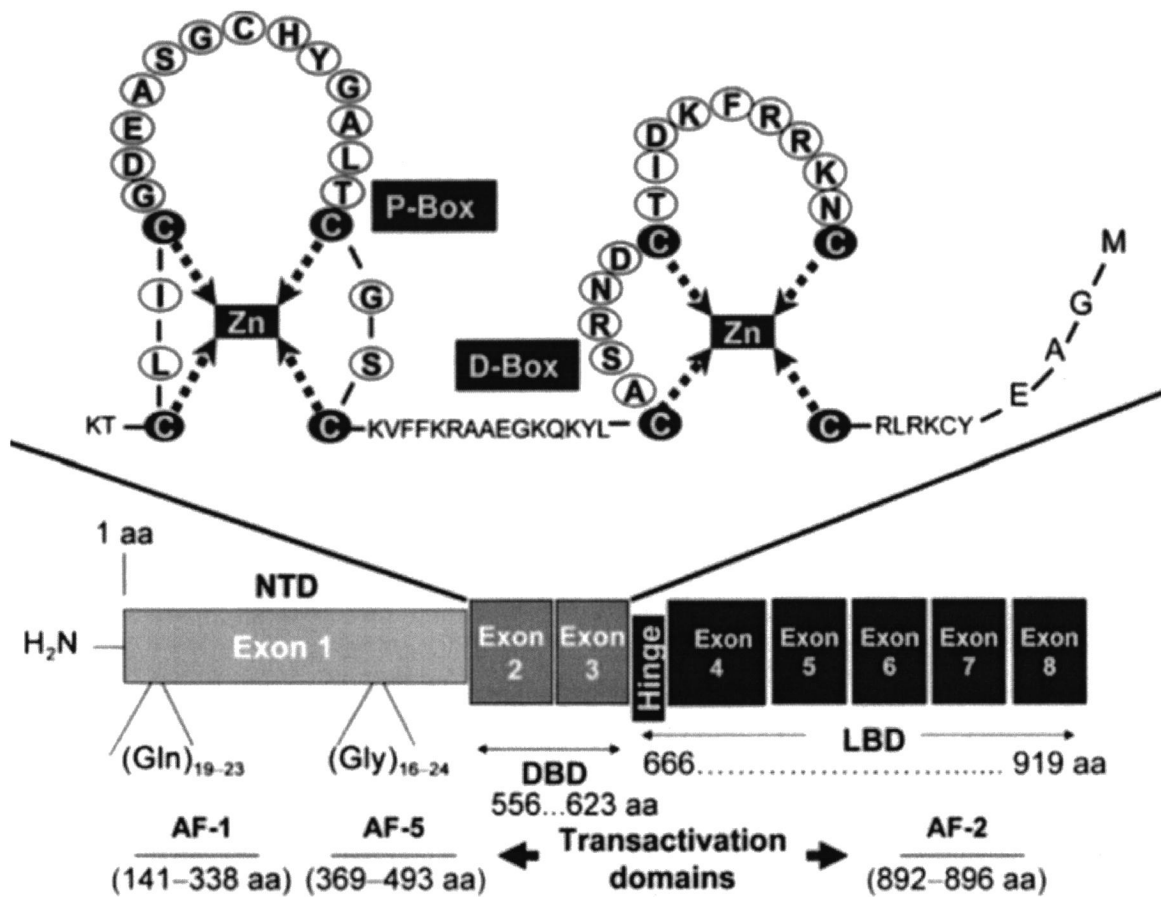


Figure 8. Représentation schématique de l'AR. Les exons 1 à 8 du récepteur nucléaire sont illustrés au centre de la figure. Les exons 2 et 3 codent pour le DBD avec les deux domaines en « doigts de zinc ». Les autres portions du récepteur, notamment ses différents domaines AF, sont illustrés au bas de la figure. Tiré de Koochekpour, 2010.

De façon générale, en absence d'hormone, l'AR est maintenu dans une conformation inactive dans le cytoplasme (**Figure 9**) (Feldman et al. 2001; Li et al. 2009; Koochekpour 2010; Schiewer et al.). Plusieurs protéines chaperonnes le maintiennent inactif tout en lui donnant une conformation optimale pour la liaison à la testostérone ou à la DHT (Feldman et al. 2001; Li et al. 2009; Koochekpour 2010; Schiewer et al.). Après liaison avec son ligand, l'AR change de conformation et est phosphorylé, ce qui permet sa libération des chaperonnes. Il s'en suit une relocalisation du récepteur au noyau où il y aura activation ou répression transcriptionnelle (Feldman et al. 2001; Li et al. 2009; Koochekpour 2010; Schiewer et al.).

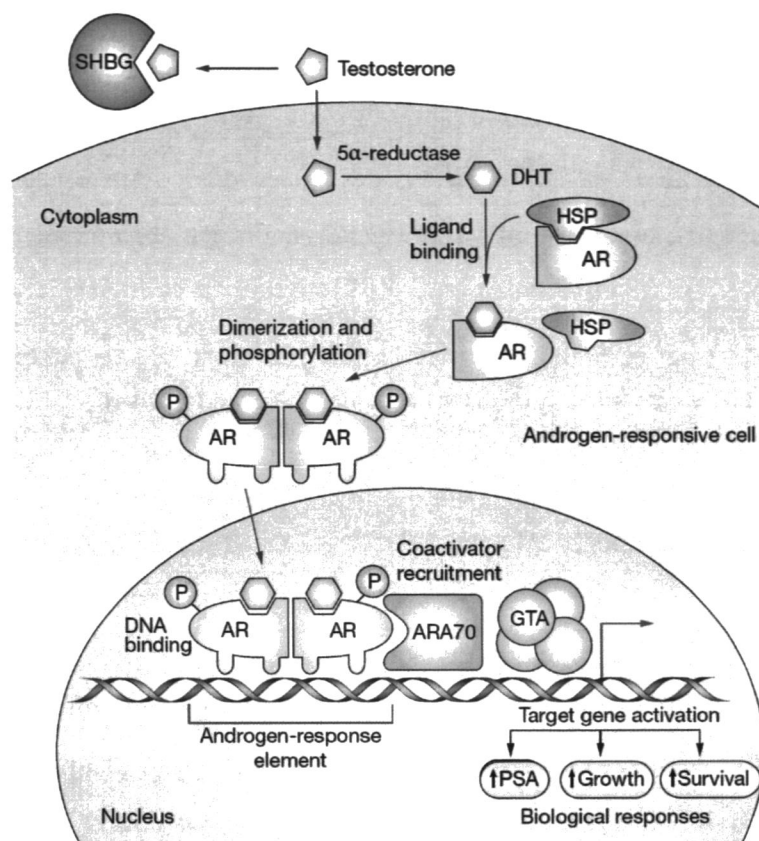


Figure 9. Mode d'action génomique des androgènes. La testostérone circule dans le sang liée à différentes protéines, notamment la SHBG. Une fois dans les cellules prostatiques, la testostérone est convertie en DHT par l'action des 5 α -réductases, qui se liera à l'AR. Il est à noter que la DHT intra-prostatique peut être synthétisée à partir des précurseurs surrénaliens présents en circulation (non illustré). Une fois lié à la DHT, l'AR se libère de ses chaperonnes, notamment des protéines de choc thermique (HSP ou *heat shock proteins*), et subira différentes modifications post-traductionnelles. Sous forme d'homodimère, l'AR est relocalisé du cytoplasme au noyau et peut s'associer à des co-activateurs (ARA70) ou des corépresseurs (non illustrés) afin de favoriser ou de bloquer la transcription géniques. Cette activation (ou répression) génique entraîne une réponse biologique qui inclue la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que la production de marqueurs spécifiques à la prostate comme l'APS (antigène prostatique spécifique ou PSA en anglais). Tiré de Feldman et Feldman, 2001.

La liaison à l'ADN se fait à des sites bien précis, les *androgen response elements* (ARE) pour activer ou réprimer les gènes cibles (Claessens et al. 2008; Li et al. 2009; Koochekpour 2010). Parmi ceux-ci on retrouve des gènes impliqués dans le cycle et la survie cellulaire (*NKX3.1*, *hTERT*, *PTEN*), des gènes de la stéroïdogénèse (*HSD17B6*, *UGT2B17*, *UGT2B15*), ainsi que différents gènes androgénodépendants spécifiques à la prostate (*TMPRSS2*, *KLK3*) (Riegman et al. 1991; Beaulieu et al. 1997; Guillemette et al. 1997; Lin et al. 1999; Tomlins et al. 2005; Chouinard et al. 2007; Moehren et al. 2008; Thomas et al. 2010; Verreault et al. 2010; Mohler, Titus and Wilson 2011; Wang, Romigh, et al. 2011).

L'AR peut également effectuer des actions dites non-génomiques. Celles-ci conduisent généralement à des modifications post-traductionnelles, telle l'activation de seconds messagers et de cascades de phosphorylation. Par exemple, l'activation de l'AR augmente la demi-vie de la kinase Pim-1 qui phosphoryle BAD, ce qui l'inactive et bloque l'apoptose (Kumar et al. 2011). D'autres voies associées à la prolifération et la survie cellulaire sont aussi activées de cette façon, notamment la voie Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) (Baron et al. 2004).

Ainsi, l'activation de l'AR par les androgènes entraîne une série d'effets rapides (non-génomiques), pouvant affecter plusieurs paramètres du cycle cellulaire, mais aussi une multitude d'effets à plus long terme (génomiques), qui vont eux aussi affecter la croissance et la prolifération cellulaire.

2.4.3 Récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes peuvent agir via différentes voies. La première est la voie classique : la voie génomique par l'ER α et l'ER β . Les mécanismes moléculaires sont similaires à ceux décrits pour l'AR. Les récepteurs sont, en absence d'œstrogènes, confinés au cytoplasme. La liaison avec l'E₂ permettra la libération du récepteur de ses chaperonnes, certaines modifications post-traductionnelles et la relocalisation au noyau pour l'activation transcriptionnelle des gènes cibles via les éléments de réponse aux œstrogènes (ERE).

Les deux ER ont seulement 55% d'homologie au niveau de leur LBD et l'ER α a une meilleure affinité pour l'E₂, bien que les deux récepteurs activent la transcription de

façon maximale à 10^{-8} M (Mosselman et al. 1996; Morito et al. 2001; Leitman et al. 2010). En fait, seul leur DBD a une forte homologie (97%), alors que l'homologie entre les autres domaines des 2 récepteurs est assez faible (<35%) (Leitman et al. 2010). Par conséquent, même après traitement avec l' E_2 qui se lie et active les deux récepteurs, jusqu'à 80% des gènes modulés par l' $ER\alpha$ et l' $ER\beta$ seront différents (Tee et al. 2004). L'une des raisons expliquant cette différence dans les patrons d'expression est la liaison différentielle aux ERE, avec un chevauchement des sites de liaison de l' $ER\alpha$ et de l' $ER\beta$ qui peut être aussi faible que 30% entre leurs sites de liaison à l'ADN (Leitman et al. 2010). Parmi les gènes cibles de l' $ER\alpha$, on retrouve des gènes associés à la stéroïdogénèse comme le récepteur à la progestérone (PR), des UGT, des gènes associés à la prolifération et à la survie cellulaire, tel c-myc et diverses cyclines, ou bien encore des gènes de diverses fonctions comme la lactotransferrine (Kastner et al. 1990; Teng et al. 1992; Paruthiyil et al. 2004; Harrington et al. 2006; Chen et al. 2009; Hu et al. 2009). Au contraire, l' $ER\beta$ va inhiber la transcription des gènes associés à la prolifération et à la survie cellulaire (c-myc, cycline D1, cycline B1, etc.) (Paruthiyil et al. 2004). De plus, Charn et coll. ont montré dans une étude à la grandeur du génome qu'il peut y avoir compétition entre les deux récepteurs pour un même ERE, où de façon générale l' $ER\alpha$ va se fixer à l'ADN au dépend de l' $ER\beta$ (Charn et al. 2010). Ainsi, la présence ou l'absence d'expression de l'un des récepteurs dans un tissu, ou le ratio des deux, définira la réponse aux œstrogènes dans ces cellules (**Figure 10**).

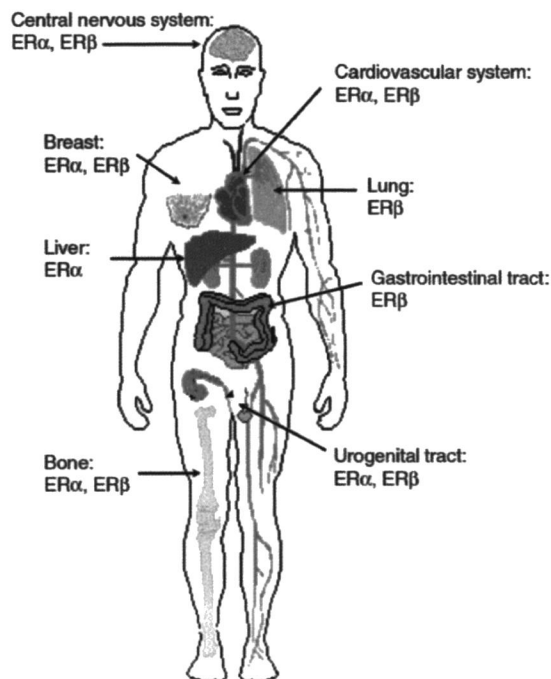


Figure 10. Représentation schématique de la distribution tissulaire des récepteurs ER α et ER β . Figure tirée de Nilsson et Gustafsson, 2011.

La présence des coactivateurs et des corépresseurs aura aussi une importance capitale en ce qui a trait à la spécificité d'action de l'ER α et de l'ER β . Par exemple, le tamoxifène diminue la croissance des cellules malignes du sein, mais favorise le développement du cancer de l'endomètre. Cette molécule, un anti-estrogène de la classe des *SERM* (*selective estrogen receptor modulator*), est un ligand antagoniste de l'ER α dans la glande mammaire et les tumeurs qui en découlent (Shang et al. 2002). Au contraire, il est un ligand agoniste de ce récepteur dans l'endomètre via la présence de la protéine *SRC-1* (*steroid receptor coactivator 1*), qui altère l'activité de l'ER α et permet au complexe ER α -tamoxifène d'activer la transcription (Shang et al. 2002). Ce concept, assez bien caractérisé pour l'ER α , s'applique fort probablement aussi à l'ER β .

L'ER α et l'ER β peuvent aussi agir de façon non-génomique, i.e. par l'activation de cascades moléculaires très rapides ne nécessitant pas de passer par l'activation transcriptionnelle de gènes cibles. Les deux récepteurs peuvent en effet être localisés au niveau de la membrane plasmique, des mitochondries ou du réticulum endoplasmique (Levin 2009). C'est la fraction associée à la membrane plasmique de l'ER α qui a été la

plus étudiée et la mieux décrite. Celle-ci représente de 5 à 10% de toutes les protéines ER α dans une cellule et va, lorsque stimulée par les œstrogènes, activer la production de seconds messagers et l'activation de différentes cascades de phosphorylation, notamment celle d'Akt (Pedram et al. 2002; Levin 2009; Nilsson and Gustafsson 2011).

Une voie d'action œstrogénique distincte des récepteurs nucléaires passerait par un récepteur couplé à une protéine G, le GPER (pour *G protein-coupled estrogen receptor 1*, aussi connu sous le nom de GPR30) (Revankar et al. 2005; Thomas, Pang, et al. 2005; Barton 2012). Ce récepteur serait responsable d'une partie des effets non-génomiques (à action rapide) des œstrogènes. Il est localisé à la membrane du réticulum endoplasmique (Revankar et al. 2005; Barton 2012). Après stimulation à l'E₂, le GPER participe à l'activation de différentes voies de phosphorylation intracellulaire, notamment celle d'Akt (Revankar et al. 2005). Toutefois, aucune altération des organes sexuels n'est observée dans les modèles de souris transgéniques où le GPER a été inactivé (Levin 2009; Otto et al. 2009). L'importance du GPER humain dans la réponse aux œstrogènes reste donc encore à éclaircir (Barton 2012).

L'expression temporelle et tissulaire de ces différents récepteurs, ainsi que celle de leurs coactivateurs/corépresseurs, permettent une régulation fine de l'activité œstrogénique dans les tissus cibles. De façon générale dans les cancers hormonodépendants, l'action de l'ER α est promotrice de prolifération et de survie cellulaire, tandis que l'ER β favorise la différenciation cellulaire (Bonkhoff et al. 2009; Hartman et al. 2009; Nilsson and Gustafsson 2011; Nilsson, Koehler, et al. 2011; Younes et al. 2011).

3. Cancer de l'endomètre

3.1 Introduction générale

L'utérus accueille l'œuf fécondé pour permettre le développement embryonnaire et il est, chez la femme, l'une des cibles principales de l'action des œstrogènes. Cet organe se présente en trois couches : la séreuse, le myomètre et l'endomètre. La séreuse compose la couche externe de l'utérus. Le myomètre est un muscle lisse qui compose la couche intermédiaire. L'endomètre est la membrane qui borde la lumière interne de l'utérus et se divise en deux parties : la couche basale, qui est permanente, et la couche fonctionnelle, qui est libérée lors des menstruations. Mes travaux de doctorat portent sur le cancer de l'endomètre chez la femme postménopausée, puisque de 75 à 80% des cas de cancer de l'endomètre sont diagnostiqués après la ménopause (Gallup et al. 1984; Engelsen et al. 2009; Jemal et al. 2011; Sivridis et al. 2011).

La détection du cancer de l'endomètre s'effectue en général par l'apparition de symptômes révélateurs, notamment des douleurs abdominales ou pelviennes ou des saignements vaginaux, présents chez plus de 95% des femmes atteintes de cette maladie (van Hanegem et al. 2012). L'un des traitements préconisés est l'hystérectomie, qui consiste en l'ablation chirurgicale de l'utérus et qui s'accompagne généralement de l'ablation des ovaires, l'ovariectomie bilatérale. Dans le cadre des travaux présentés aux Chapitres II et IV, toutes les patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre ont subi une hystérectomie. De façon générale, le cancer de l'endomètre, même si détecté suite à l'apparition de symptômes, se traite efficacement. En effet, l'hystérectomie est curative dans environ 85% des cas (Gadducci et al. 2011; Uzan et al. 2012). Toutefois, une récurrence de la maladie suite à l'opération est associée à un mauvais pronostic. Les cas de récurrence sont majoritairement détectés dans les 3 années suivant l'opération (Gadducci et al. 2011; Uzan et al. 2012) et sont associés à un taux de survie de 50% et moins après 5 ans post-hystérectomie (Sartori et al. 2010; Fabrini et al. 2012).

Le cancer de l'endomètre peut être considéré comme héréditaire ou sporadique. Environ 10% des cas de cancer de l'endomètre sont dits héréditaires et sont liés pour la

plupart au syndrome de Lynch (ou l'*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC) (Ryan et al. 2005). En effet, le cancer extra-colonique le plus fréquent chez les femmes atteintes de ce syndrome est celui de l'endomètre, qui serait même plus fréquent que celui du côlon (Lu et al. 2005; Ryan et al. 2005; Olschwang et al. 2006). Dans le cadre de mes travaux de doctorat, j'ai étudié le rôle des hormones stéroïdiennes dans les cancers de l'endomètre non-héréditaires (sporadiques). Ces cas représentent 90% de tous les cas de cancer de l'endomètre et se divisent en deux types (Bokhman 1983; Ryan et al. 2005). Le type I (endométriïde) compte pour 80% des cas de cancer et origine d'une hyperplasie bénigne de l'endomètre (Bokhman 1983; Sherman 2000; Kaaks et al. 2002; Liu 2007; Boruban et al. 2008). Ce type de tumeurs exprime l'ER α et le PR, et la plupart des facteurs de risque sont associés à une exposition prolongée aux œstrogènes (**Tableau 2**). Le type II, moins fréquent mais plus agressif, compte pour 20% des cas, correspond aux types non-endométriïde (carcinome séropapillaire, à cellules claires, indifférenciées, mixtes ou tumeurs mixtes müllériennes malignes [TMMM]) et se développe généralement dans un endomètre atrophique (Bokhman 1983; Sherman 2000; Kaaks et al. 2002; Liu 2007; Boruban et al. 2008). Selon la littérature actuelle, ces tumeurs ne seraient pas reliées aux œstrogènes, notamment parce qu'elles n'expriment pas les récepteurs hormonaux (ER α et PR) et qu'elles répondent faiblement aux traitements à la progestérone (Bokhman 1983; Sherman 2000; Sivridis, Giatromanolaki, et al. 2001; Shabani et al. 2007). Toutefois, étant donné que l'activité et l'expression de l'aromatase est plus élevée dans les tumeurs de type II que celles de type I (Berstein et al. 2005), il est possible que ce type de cancer soit associé aux hormones stéroïdiennes même s'il se développe dans un environnement pauvre en œstrogènes. Smith et coll. ont observé une augmentation de l'expression protéique du GPER dans les tumeurs de stades 3-4, généralement enrichis en tumeurs de type II, et soutiennent que : « ... *GPR30 [GPER] signaling is a critical pathway for tumor proliferation, especially for type II endometrial carcinomas.* » (Smith et al. 2007). Par conséquent, les cancers de l'endomètre de type I sont clairement associés aux œstrogènes tandis que les cancers de type II, généralement considérés comme indépendants des œstrogènes, pourraient aussi être influencés par ces hormones par des voies alternatives à l'ER α comme le GPER.

Tableau 2. Comparaison des cancers de l'endomètre de type I et de type II

Type I (endométriöïde)	Type II (non-endométriöïde)
Facteurs de risque	
Menstruation précoce Ménopause tardive Surpoids/Obésité Thérapie de remplacement hormonal (œstrogènes sans progestatif) Aucun contraceptif combiné (progestatif) Grossesses tardive ou nullipare Niveaux endogènes élevés d'E ₁ -E ₂	Menstruation normale Ménopause < 50 ans Pas de problème de surpoids Pas associé aux hormones exogènes
Environnement précurseur	
Hyperplasie de l'endomètre	Endomètre atrophié
Expression génique intra-tumorale	
Expression de l'ER α et du PR Absence d'expression de l'ER β CYP19 : expression et activité faible	Expression négative de l'ER α et du PR Absence d'expression de l'ER β CYP19 : expression et activité plus élevées
Caractéristiques cliniques	
Tumeur différenciée (bas grade) Sensible aux progestatifs Bon pronostic	Tumeur dédifférenciée (haut grade) Insensible aux progestatifs Mauvais pronostic

Tableau basé sur des travaux de plusieurs sources (Bokhman 1983; Henderson et al. 2000; Sherman 2000; Sivridis, Giatromanolaki, et al. 2001; Kaaks et al. 2002; Lukanova et al. 2004; Berstein et al. 2005; Liu 2007; Shabani et al. 2007; Eliassen et al. 2008).

Deux principaux modèles expliquent le rôle des œstrogènes dans la transformation maligne et le développement du cancer de l'endomètre. Le premier suggère que l'endomètre est exposé de façon prolongée aux œstrogènes, ce qui active l'ER α et entraîne ses effets cancérogènes, sans opposition par la progestérone qui n'induit donc pas la différenciation et ne bloquera pas la prolifération cellulaire (hypothèse des *unopposed estrogens*) (Kistner 1976; Gambrell 1977; Nagamani et al. 1986; Henderson et al. 2000; Akhmedkhanov et al. 2001). Le deuxième se base sur l'observation que certains dérivés des œstrogènes (le 2-MeOE₂, les dérivés 4-OH et le 16 α -OHE₁) acquièrent de nouvelles propriétés biologiques qui peuvent influencer la transformation maligne et le développement tumoral. L'hypothèse sous-jacente implique un déséquilibre entre la production de métabolites protecteurs ou cancérogènes, qui pourra favoriser le cancer ou protéger contre celui-ci. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs et contribuent probablement de façon simultanée à l'apparition et au développement du cancer de l'endomètre.

3.2 Rôle des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre

3.2.1 L'hypothèse des *unopposed estrogens*

Les œstrogènes, avant la ménopause, stimulent la croissance de l'endomètre et des glandes mammaires lors de la phase proliférative (folliculaire) du cycle menstruel. De façon complémentaire, la progestérone vient bloquer cette stimulation dans la phase sécrétoire (lutéale) en induisant la différenciation cellulaire. À la ménopause, le déséquilibre des niveaux d'œstrogènes par rapport au niveau de la progestérone (ratio œstrogène/progestérone élevé) entraîne une stimulation excessive et prolongée de la croissance de l'endomètre, sans induire la différenciation cellulaire par la progestérone. C'est sur ce déséquilibre que se base l'hypothèse des *unopposed estrogens* qui explique principalement les cancers de type I, et qui implique que la progestérone ne viendra plus contrebalancer l'effet des œstrogènes sur l'endomètre.

En effet, les cancers endométriaux sont associés à des facteurs de risque entraînant une exposition accrue aux œstrogènes et une exposition diminuée aux progestatifs (**Tableau 2**). Parmi ces facteurs, on retrouve des menstruations précoces et une ménopause tardive, qui indiquent une exposition prolongée aux œstrogènes au cours de la vie, ainsi que l'obésité, associée à des niveaux plus élevés d'œstrogènes après la ménopause (Bokhman 1983; Henderson et al. 2000; Sherman 2000; Kaaks et al. 2002; Liu 2007; Eliassen et al. 2008). En fait, l'obésité explique 40% de tous les cas de cancer de l'endomètre dans les pays occidentaux puisqu'elle est associée à une augmentation du risque de développer cette maladie pouvant aller jusqu'à un facteur 20 (Akhmedkhanov et al. 2001; Bergstrom et al. 2001; Crosbie et al. 2010).

Il est bien établi que les niveaux circulants d'œstrogènes (E_2 , E_1 et E_1-S) et de leurs précurseurs (DHEA-S, 4-dione, testostérone) sont augmentés de 30-80% et de 20-40%, respectivement, chez les femmes postménopausées atteintes d'un cancer de l'endomètre (Austin et al. 1991; Nyholm et al. 1993; Potischman et al. 1996; Sherman et al. 1997; Lukanova et al. 2004; Allen et al. 2008). De même, les œstrogènes et leurs précurseurs sont aussi plus élevés de 10-30% et 5-15% en circulation chez les femmes postménopausées atteintes d'un cancer du sein en comparaison de femmes saines (Hankinson et al. 1998; Key et al. 2002; Missmer et al. 2004; Zeleniuch-Jacquotte et al. 2004; Hankinson 2005;

Tamimi et al. 2007; Tworoger et al. 2011; Baglietto et al. 2012). En fait, l'augmentation du risque de développer un cancer de l'endomètre double à chaque fois que les niveaux d'E₂ en circulation doublent, et les femmes dans le quartile supérieur des niveaux d'E₁ et d'E₂ circulants ont un risque de 4 à 5 fois plus élevés de développer un cancer de l'endomètre que les femmes dans le quartile inférieur (Lukanova et al. 2004). Plusieurs études ont aussi associé des niveaux élevés de précurseurs des œstrogènes (DHEA-S, 4-dione, testostérone) à la présence d'un cancer de l'endomètre (Bonney et al. 1986; Austin et al. 1991; Nyholm et al. 1993; Potischman et al. 1996; Sherman et al. 1997; Lukanova et al. 2004; Allen et al. 2008). L'hypothèse sous-jacente est que l'augmentation des niveaux de ces précurseurs entraîne l'augmentation subséquente des niveaux d'œstrogènes et que leur effet sur le cancer de l'endomètre est donc indirect. Ainsi, une exposition prolongée aux œstrogènes endogènes et à leurs précurseurs favorisera l'apparition et le développement du cancer de l'endomètre de type endométrioïde. Toutefois, aucune étude ne s'est penchée pour l'instant sur la voie des androgènes (DHT et ses métabolites), mise à part la testostérone, ou sur les métabolites des œstrogènes en relation avec le cancer de l'endomètre.

Cette élévation de la concentration des hormones stéroïdiennes en circulation s'explique en partie par la production d'œstrogènes par le tissu adipeux, mais aussi par la sécrétion plus élevée d'androgènes par les ovaires des femmes postménopausées ayant un cancer de l'endomètre (testostérone et 4-dione) (Bremond et al. 1982; Nagamani et al. 1986). En effet, dans deux petites études d'une vingtaine de patientes les niveaux sériques de testostérone et de 4-dione dans la veine ovarienne sont augmentés de plus de 300% et 200%, respectivement, chez les femmes atteintes du cancer de l'endomètre comparativement aux femmes sans cancer (Bremond et al. 1982; Nagamani et al. 1986). Au niveau tissulaire, les niveaux intra-tumoraux d'E₂ sont significativement plus élevés de 50% comparativement au tissu péri-tumoral (Berstein et al. 2003). Ainsi, il semble que chez les femmes atteintes du cancer de l'endomètre, plusieurs facteurs endogènes influencent les niveaux circulants d'hormones stéroïdiennes comme l'obésité et l'activité résiduelle des ovaires.

Les œstrogènes exogènes aussi peuvent influencer le développement du cancer de l'endomètre. En effet, les cas de cancer de l'endomètre ont augmenté de façon importante après l'utilisation massive dans les années 60 et 70 d'œstrogènes exogènes dans le cadre

des thérapies hormonales de remplacement, qui augmentaient le risque de cancer de 5 à 10 fois après 5 à 10 années d'utilisation, respectivement (Gambrell 1977; Grady et al. 1995; Weiderpass et al. 1999; Akhmedkhanov et al. 2001). Ces œstrogènes étaient principalement donnés comme thérapie hormonale de remplacement à la ménopause, afin de palier au déficit hormonal suite à l'arrêt de la cyclicité hormonale ovarienne. De nos jours, ces thérapies contiennent des progestatifs qui, au niveau de l'utérus, contrebalancent les effets œstrogéniques. Les thérapies hormonales de remplacement comprenant des progestatifs n'affectent plus, ou beaucoup moins, l'incidence du cancer de l'endomètre (Voigt et al. 1991; Grady et al. 1995; Allen et al. 2008; Allen et al. 2010).

Dans le modèle des *unopposed estrogens*, ce sont des niveaux élevés d'œstrogènes et des niveaux faibles de progestérone qui augmentent le risque de cancer de l'endomètre. Toutefois, les niveaux de progestérone endogène à la ménopause chez les femmes saines et chez les femmes atteintes du cancer de l'endomètre n'ont pas encore été clairement déterminés. À ce stade, les niveaux circulants de progestérone sont généralement indétectables avec les méthodes actuelles, ou se situent à la limite de détection des méthodes conventionnelles. Par exemple, Missmer et coll. ont quantifié les niveaux circulants de progestérone chez 800 femmes postménopausées avec ou sans le cancer du sein (Missmer et al. 2004). Les niveaux médians dans ces deux populations étaient de 4ng/dL, ce qui est ≈ 400 fois moindre que chez les femmes préménopausées (Eliassen et al. 2006), tandis que la limite de détection était de 3ng/dL et que le coefficient de variation inter-expérience était de 15% (Missmer et al. 2004). Dans ces conditions, il est difficile de réellement déterminer l'effet de la progestérone endogène sur le risque de cancer de l'endomètre. Par contre, la prise de thérapie de remplacement hormonal avec ou sans progestatif vient supporter le modèle des *unopposed estrogens*, puisque l'ajout de progestatif vient protéger contre l'effet cancérigène des œstrogènes dans les thérapies hormonales (Voigt et al. 1991; Grady et al. 1995; Allen et al. 2008; Allen et al. 2010).

En se basant sur les facteurs de risque des deux types de cancer de l'endomètre (**Tableau 2**), il est considéré qu'une exposition accrue et prolongée aux œstrogènes est associée aux cancers de type I (cancers endométrioïdes), bien qu'une seule étude ait évalué l'association entre les hormones stéroïdiennes en circulation et le type de cancer. En effet, Sherman et coll. ont comparé les niveaux d'œstrogènes en circulation entre les femmes

atteintes d'un cancer de l'endomètre de type I et celles avec un cancer de type II, pour lesquelles les niveaux d'E₂, d'E₁ et d'E₁-S étaient plus élevés de 50% à 65% chez les femmes atteintes d'un cancer endométrioïde (Sherman et al. 1997). Ainsi, les niveaux circulants des hormones stéroïdiennes pourraient être associés aux caractéristiques clinico-pathologiques. Toutefois, la relation avec d'autres stéroïdes, tels les métabolites des œstrogènes ou les précurseurs surrenaliens, ou d'autres caractéristiques clinico-pathologiques, tels le grade et la récurrence, n'ont encore jamais été étudiées.

3.2.2 L'hypothèse associée au métabolisme des œstrogènes

Ce deuxième modèle, bien que plus récent, se base sur l'observation que les œstrogènes parentaux, l'E₁ et l'E₂, peuvent être transformés en métabolites qui acquièrent de nouvelles propriétés biologiques (**Section 2.2.2**), qu'elles soient anti-prolifératives et anti-apoptotiques ou, au contraire, cancérogènes. L'hypothèse sous-jacente est qu'un déséquilibre dans le profil métabolique des œstrogènes, s'il s'incline en faveur des métabolites cancérogènes (dérivés 4-OH et 16 α -OHE₁), favorisera le développement tumoral. Au contraire, un ratio métabolique favorisant la synthèse d'œstrogènes protecteurs (2-MeOE₂ et dérivés 2-OH) diminuera le développement tumoral. La plupart des résultats allant de pair avec ce modèle ont été obtenus dans le contexte du cancer du sein, en utilisant des modèles *in vitro* (lignées cellulaires) ou des modèles de rongeurs et seront discutés afin d'expliquer cette hypothèse dans le contexte du cancer de l'endomètre.

L'action des métabolites des trois voies majeures d'hydroxylation des œstrogènes a été bien décrite *in vitro*. Le 2-MeOE₂ bloque la prolifération et induit la mort cellulaire dans plusieurs lignées cellulaires dérivées de tumeurs, incluant des tumeurs mammaires et endométriales (Zhu et al. 1998b; Carothers et al. 2002; Li, Heldin, et al. 2004; Kato et al. 2007). Ce métabolite induit l'apoptose des lignées dérivées de tumeurs endométriales, mais pas dans les cellules endométriales saines (Kato et al. 2007). Chez des lignées de cancer du sein et de l'endomètre, le 4-OHE₂ est mutagène (Fernandez et al. 2006; Salama et al. 2008). Enfin, le 16 α -OHE₁ stimule la prolifération cellulaire *in vitro*, avec un modèle de cancer du sein (Telang et al. 1992), et *in vivo*, dans un modèle de cancer de l'endomètre chez les rongeurs (Takahashi et al. 2004).

Chez l'humain, la plupart des recherches ont porté sur les différences de niveaux urinaires chez les femmes atteintes du cancer du sein en comparaison de femmes saines. Notamment, plusieurs études se sont intéressées au ratio favorisant la 16 α -hydroxylation aux dépens de la 2-hydroxylation de l'estrone (ratio 2-OHE₁/16 α -OHE₁), bien qu'aucune association significative et reproductible n'a pu être détectée entre les niveaux urinaires ou circulants et le cancer du sein (Meilahn et al. 1998; Ursin et al. 1999; Muti et al. 2000; Cauley et al. 2003) ou celui de l'endomètre (Zeleniuch-Jacquotte et al. 2011). Le développement récent de méthodes plus spécifiques et sensibles de dosage des métabolites des œstrogènes, incluant les dérivés 4-OH, a permis d'élargir le spectre de métabolites des œstrogènes étudiés. Par exemple, des femmes atteintes du cancer du sein ($n=86$) ont des niveaux urinaires significativement plus élevés de 4-OHE₂ ($\uparrow 97\%$) et plus faible de 2-MeOE₂ ($\downarrow 70\%$) que des femmes saines ($n=36$), appuyant le modèle de débalancement du métabolisme hormonal en faveur des métabolites cancérigènes (Huang et al. 2012). Lors d'une étude avec un petit nombre de patientes ($n=49$ contrôles et 28 cas), Rogan et coll. ont pu montrer une augmentation de plus de trois fois des niveaux des dérivés 4-OH et des quinones-conjuguées dans des tumeurs mammaires en comparaison de tissus recueillis chez des femmes saines (Rogan et al. 2003). De façon similaire, la même équipe a montré que chez des femmes atteintes du cancer du sein ($n=40$) ou des femmes à haut risque de développer un tel cancer ($n=40$), les niveaux urinaires des adduits dépurinants des œstrogènes sont 2 fois plus élevés que ceux des femmes saines ($n=40$) (Gaikwad, Yang, Pruthi, et al. 2009). Enfin, Fuhrman et coll. ont démontré, chez 277 femmes atteintes du cancer du sein et 423 femmes saines postménopausées, que le ratio des métabolites 2-OH par rapport aux œstrogènes parentaux (E₁ et E₂) était protecteur ($\downarrow 44\%$ du risque) alors qu'au contraire celui des dérivés 4-OH catéchols/méthylés augmentait le risque de cancer du sein ($\uparrow 34\%$ du risque) (Fuhrman et al. 2012). Étant donné les similitudes avec le cancer du sein, on peut penser que les métabolites des œstrogènes, notamment les dérivés 2-OH et 4-OH, influencent aussi l'évolution du cancer de l'endomètre.

Au début de mes travaux de doctorat, aucune étude n'avait décrit de façon détaillée l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et le métabolisme des œstrogènes dans l'endomètre sain ou tumoral. Les travaux dans le contexte du cancer du sein ont démontré un débalancement des niveaux urinaires des métabolites des œstrogènes (Rogan et al.

2003; Gaikwad, Yang, Pruthi, et al. 2009; Fuhrman et al. 2012; Huang et al. 2012), ce qui va de pair avec l'observation que l'expression des enzymes de synthèse du 4-OHE₂ (CYP19, CYP1B1) sont surexprimées dans les tumeurs du sein et, qu'au contraire, il y a une diminution de l'expression des enzymes d'inactivation du 4-OHE₂ (COMT, NQO1, UGT1A10) dans ces tumeurs (Singh et al. 2005; Vaclavikova et al. 2007; Wen et al. 2007; Starlard-Davenport et al. 2008). Ainsi, il est possible que de telles modifications surviennent dans le contexte du cancer de l'endomètre, altérant ainsi le métabolisme des œstrogènes. Il est aussi connu que plusieurs CYP sont exprimés dans l'endomètre sain, notamment CYP1A1 (voie 2-OH), CYP1B1 (voie 4-OH) et CYP3A4/CYP3A7 (voie 16-OH) (Hakkola et al. 1997; Vadlamuri et al. 1998; Sarkar et al. 2003; Tsuchiya et al. 2004; Singh et al. 2008). La COMT a elle aussi été détectée dans l'endomètre sain (Salih et al. 2008; Singh et al. 2008). En fait, Sasaki et coll. ont observé un changement dans le profil de méthylation des îlots CpG des promoteurs de la COMT, dont le gène contient deux promoteurs distincts. Ils ont remarqué une hyper- et une hypométhylation des promoteurs de la MB-COMT et de la S-COMT, respectivement, ce qui indique que l'expression de ces deux formes de la COMT est probablement altérée dans les tumeurs de l'endomètre, bien que les auteurs ne l'ait pas démontré (Sasaki et al. 2003). De plus, plusieurs membres de la famille des UGT sont exprimés dans l'endomètre sain, notamment les UGT1A1, UGT1A8/1A9 et UGT2B7 (Duguay et al. 2004; Lépine et al. 2004; Thibaudeau et al. 2006). Ainsi, plusieurs enzymes du métabolisme des œstrogènes sont exprimées dans l'endomètre et, au moment où notre étude sur l'expression génique a été effectuée, on ne savait pas si leur expression était altérée dans l'endomètre tumoral.

Enfin, puisqu'aucune étude n'avait comparé entre eux les niveaux d'expression des gènes de la stéroïdogénèse, les voies majeures et les voies mineures de synthèse et de métabolisme des hormones stéroïdiennes dans l'endomètre sain et tumoral n'étaient pas déterminées. Qui plus est, les changements d'expression de seulement quelques enzymes avaient été étudiés, ne dressant qu'un profil incomplet de l'expression génique de la stéroïdogénèse dans le cancer de l'endomètre. La caractérisation des niveaux d'expression génique des enzymes de la stéroïdogénèse dans l'endomètre sain et tumoral permettrait donc de déterminer : 1) les voies potentiellement prédominantes de synthèse et de

métabolisme des œstrogènes dans l'endomètre sain et 2) les voies dont l'expression en ARNm est altérée dans la tumeur.

3.3 Dosage des hormones stéroïdiennes chez la femme postménopausée atteinte du cancer de l'endomètre

Les niveaux d'œstrogènes parentaux en circulation et tissulaires sont clairement associés à la présence d'un cancer de l'endomètre, mais la totalité des études précédentes ont utilisé des méthodes de dosage basées sur l'immunologie, généralement des techniques de *radioimmunoassay* (RIA) (Vermeulen-Meiners et al. 1984; Vermeulen-Meiners et al. 1986; Austin et al. 1991; Nyholm et al. 1993; Potischman et al. 1996; Sherman et al. 1997; Berstein et al. 2003; Lukanova et al. 2004; Allen et al. 2008). Bien que sensibles et relativement spécifiques lorsque les niveaux hormonaux sont élevés, comme chez la femme préménopausée, ces méthodes peuvent manquer de spécificité. Il a en effet été démontré que ces méthodes, particulièrement chez la femme postménopausée, manquent de spécificité et donnent des valeurs de dosage significativement différentes que celles des méthodes plus robustes de chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse (Stanczyk et al. 1980; Chen et al. 1996; Leung et al. 1997; Ziegler et al. 1997; Falk et al. 1999; Sinicco et al. 2000; Rinaldi et al. 2001; Lee et al. 2006; Labrie et al. 2007; Stanczyk et al. 2007; Faupel-Badger et al. 2010). Cette problématique est bien dépeinte dans le cadre de l'étude effectuée par Lee et coll., où le dosage médian de l'E₂ par des techniques immunologiques dans un groupe de 40 femmes postménopausées était 3 fois plus élevé que par GC-MS (Lee et al. 2006). La détermination des niveaux d'œstrogènes chez les femmes postménopausées, atteintes ou non du cancer de l'endomètre, avec des méthodes plus spécifiques et reproductibles semblait donc nécessaire.

Ce besoin est particulièrement essentiel dans le cadre de l'étude des métabolites des œstrogènes, puisque les méthodes immunologiques sont encore moins reproductibles pour ces stéroïdes que pour les œstrogènes parentaux. En effet, le coefficient de corrélation du ratio 2-OHE₁/16α-OHE₁ n'est que de 0.17 entre le dosage par LC-MS/MS et celui par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), comparativement à 0.79 et 0.63 pour l'E₁ et l'E₂, respectivement (Faupel-Badger et al. 2010). D'ailleurs, Ziegler et coll. ont déjà démontré que la spécificité d'une trousse de dosage urinaire basée sur l'immunologie était

problématique, particulièrement chez les femmes postménopausées (Klug et al. 1994; Ziegler et al. 1997). En fait, le dosage de leurs échantillons, un an après le dosage initial, montrait des valeurs de 2-OHE₁ augmentées de 57% et des valeurs de 16α-OHE₁ augmentées de plus de 100%. Ainsi, il faut rester prudent quant à l'analyse et l'interprétation des résultats découlant de l'utilisation de cette technique (Ursin et al. 1999; Muti et al. 2000). En effet, Ziegler et coll. la décrit ainsi : « *Laboratory reproducibility over a 12-month interval [...] was noticeably poor in postmenopausal women, with mean readings increasing 50 to 100%* » (Ziegler et al. 1997). Le développement de méthodes sensibles et spécifiques pour le dosage des métabolites des œstrogènes dans le contexte du cancer de l'endomètre chez les femmes postménopausées est donc essentiel afin d'étudier leur relation avec la tumeur.

Les métabolites glucuronides des œstrogènes représentent une famille de métabolites encore peu connue, étudiée jusqu'à présent de façon indirecte ou avec des méthodes inadéquates (RIA) (Stanczyk et al. 1980; Xu et al. 2007). De façon générale, de 50 à plus de 90% des œstrogènes sanguins ou urinaires se retrouvent sous forme conjuguée avec un groupement sulfate ou glucuronide (Xu et al. 2007; Fuhrman et al. 2012). Les dérivés glucuronidés des œstrogènes représentent donc une voie d'élimination potentiellement importante des œstrogènes cancérogènes (dérivés 4-OH ou 16α-OHE₁) ou protecteurs (2-MeOE₂) (Lépine et al. 2004; Thibaudeau et al. 2006; Starlard-Davenport et al. 2007; Gerstner et al. 2008). Les informations scientifiques actuellement disponibles semblent indiquer que les œstrogènes-glucuronides sont des candidats intéressants pour étudier l'activité tumorale du cancer de l'endomètre.

3.4 Biomarqueurs

Tel que mentionné préalablement, l'hystérectomie se révèle un traitement efficace dans 85% des cas de cancer de l'endomètre, mais pour le 15% restant, la récurrence de la maladie sera associée à un mauvais pronostic. Une meilleure compréhension de l'association entre les hormones stéroïdiennes et le cancer de l'endomètre pourrait permettre de mieux caractériser les cancers agressifs (les plus à risque de récidiver), par exemple par la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs.

De façon générale, un biomarqueur se définit comme un paramètre biologique chez un patient qui permet de diagnostiquer un état anormal particulier, d'en constater l'évolution ou d'en assurer le suivi après un traitement. Cela peut être une molécule ou plusieurs molécules quantifiées dans une matrice biologique (urine, sérum, tissu, etc.), que ce soit sous la forme d'ADN (marqueur génétique), d'ARN (profil d'expression), de protéines (niveau d'expression), ou de n'importe quel autre composé susceptible d'être informatif. Certains biomarqueurs sont déjà utilisés en clinique dans le contexte du cancer de l'endomètre. Par exemple, le marqueur CA 125 est connu pour être associé à la récurrence de ce cancer depuis près de trente ans (Niloff et al. 1984). Depuis, les niveaux sériques de CA 125 ont été associés à une maladie avancée qui envahit les tissus extra-utérins et ils sont utilisés afin de guider les cliniciens lors du diagnostic et dans le cadre de suivis post-chirurgie (Dotters 2000; Sebastianelli et al. 2010; Chen et al. 2011). Toutefois, c'est un marqueur qui manque de spécificité et de sensibilité. Par exemple, en séparant un groupe de 254 patientes atteintes du cancer de l'endomètre selon le seuil de 25 kU/mL de CA 125, Sebastianelli et coll. ont obtenu une sensibilité de 67% et une spécificité de 77% afin de discriminer les femmes atteintes d'un cancer de stade 1 ou 2 des femmes atteintes d'un cancer de stade 3 ou 4 (Sebastianelli et al. 2010). Similairement, Chen et coll. ont obtenu une sensibilité de 58% et une spécificité de 78% en utilisant les niveaux sériques de CA 125 pour déterminer les femmes les plus à risque de récurrence après une hystérectomie chez une cohorte de 120 femmes (Chen et al. 2011). Il est à noter que plusieurs polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse ont été associés à la susceptibilité au cancer de l'endomètre (**Tableau 3**), bien que cet aspect ne sera pas abordé dans le cadre de cette thèse en relation avec ce cancer. Une compréhension approfondie des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du cancer de l'endomètre permettrait de développer de nouveaux outils de laboratoire ou cliniques plus sensibles et plus spécifiques.

Tableau 3. Étude non-exhaustive des variations génétiques des gènes de la stéroïdogénèse en association avec la susceptibilité au cancer de l'endomètre

Gène	Polymorphisme étudié	Impact sur la susceptibilité au cancer de l'endomètre	Référence
<i>CYP1A1</i>	3 SNP	≠ impact	(McGrath et al. 2007)
<i>CYP1B1</i>	C4326G	Méta-analyse (6 études) ≠ impact	(Wang, Chen, et al. 2011)
<i>CYP11A1</i>	3 SNP et 1 microsatellite	↑ risque ≠ impact	(Terry et al. 2010) (Olson et al. 2008)
<i>CYP17A1</i>	-34T>C (rs743572)	≠ impact ≠ impact ≠ impact ↓ risque ↓ risque	(Olson et al. 2008) (Gaudet et al. 2008) (Szylo et al. 2006) (Berstein et al. 2004) (Haiman et al. 2001)
<i>CYP19A1</i>	Microsatellite (TTTA) _n	↑ risque ↑ risque ≠ impact ↓ risque	(Berstein et al. 2001) (Paynter et al. 2005) (Ashton et al. 2010) (Olson et al. 2008)
<i>COMT</i>	1 SNP	↑ cancer de type I	(Berstein et al. 2006)
<i>UGT1A1</i>	UGT1A1*28	↓ risque ≠ impact ≠ impact ≠ impact	(Duguay et al. 2004) (Ashton et al. 2010) (Deming et al. 2008) (McGrath et al. 2009)
<i>UGT2B7</i>	-79 G>A H ²⁶⁸ Y	≠ impact	(McGrath et al. 2009)
<i>HSD17B2</i>	2 SNP (rs4243229)	↑ risque	(Karageorgi et al. 2011)
<i>HSD17B4</i>	2 SNP	↑ risque	(Karageorgi et al. 2011)
<i>StAR</i>	2 SNP	≠ impact	(Terry et al. 2010)

Il est à noter que la plupart des études dans le contexte du cancer de l'endomètre sont de petites ou moyennes tailles (<200 cas) et que très peu de variants de susceptibilité ont été identifiés dans les rares GWAS effectuées (Spurdle et al. 2011; Long et al. 2012).

Étant donné le rôle causal joué par les œstrogènes dans le développement du cancer de l'endomètre, que ce soit par l'action des œstrogènes parentaux (E₁ et E₂) ou de leurs métabolites (dérivés 2-OH, 4-OH et 16-OH), les hormones stéroïdiennes représentent des candidats pertinents dans la compréhension de cette maladie et dans la découverte de nouveaux biomarqueurs. En effet, la détermination de leurs niveaux circulants et l'étude de leur métabolisme intra-tumoral permettrait peut-être, en relation avec les caractéristiques clinico-pathologiques, de mettre en évidence de nouveaux outils diagnostiques et pronostiques ainsi que de nouvelles avenues thérapeutiques.

4. Cancer de la prostate

4.1 Introduction générale

La prostate est une glande faisant partie de l'appareil génital masculin. Elle se situe sous la vessie et permet de sécréter de 10 à 30% du liquide séminal constituant le sperme, le reste étant produit par les vésicules séminales situées à l'arrière de la prostate, les glandes de Cowper, l'épididyme et les spermatozoïdes (canaux déférents). La zone centrale constitue 25% de la prostate, tandis que la zone de transition et la zone périphérique en constituent 5% et 70%, respectivement (**Figure 11**). En fait, c'est dans cette dernière zone que la majorité des cancers surviennent ($\approx 80\%$) (Matlaga et al. 2003).

Considéré au 19^e siècle comme un cancer extrêmement rare, le cancer de la prostate est maintenant le cancer le plus fréquent chez l'homme dans les pays industrialisés (Société canadienne du cancer 2011; Siegel et al. 2011). Avec le vieillissement, plusieurs foci tumoraux peuvent apparaître dans la prostate et, contrairement à la majorité des tumeurs solides, ce cancer est généralement multifocal (Aihara et al. 1994; Bostwick et al. 1998; Macintosh et al. 1998; Mehra et al. 2007; Clark et al. 2008). Il y a donc plusieurs foyers distincts dans la prostate où la transformation maligne a lieu et, dans plus de 99% des cas, le cancer sera de type adénocarcinome acineux, bien qu'il existe d'autres types rares de cancer de la prostate (Scosyrev et al. 2011; Marcus et al. 2012).

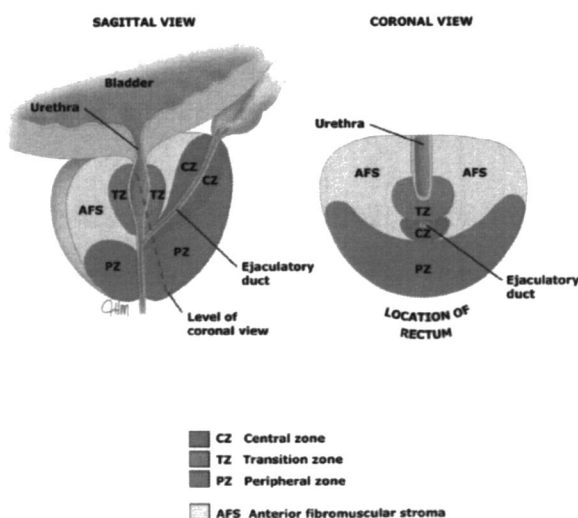


Figure 11. Zones de la prostate. Figure tirée de UpToDate®, 2012a.

La détection du cancer de la prostate se fait principalement par le toucher rectal et le dosage sérique de l'APS, deux outils qui permettent de diagnostiquer la plupart des cancers de la prostate de façon précoce. En fait, l'utilisation de ces outils de diagnostic permet la détection aussi bien des cancers agressifs que des cancers indolents. La détection de ces tumeurs a donc entraîné le traitement de plusieurs patients chez lesquels le cancer n'aurait pas évolué de façon importante avant leur mort (Strope et al. 2010; Welch et al. 2010; Wolf et al. 2010). Le cancer de la prostate a en effet la particularité d'évoluer lentement, i.e. que le temps requis de la détection jusqu'à la mort du patient se compte en dizaine d'années (Jacobs 1983; Wolf et al. 2010). Par conséquent, le « surdiagnostic », ou la détection de cancer indolent, pourrait représenter jusqu'à 60% des cancers de la prostate (Welch et al. 2010). Ainsi, bien des patients vont mourir avec leur cancer plutôt que de mourir directement de celui-ci. Par conséquent, une des problématiques actuelles est de déterminer si le cancer est indolent ou agressif (Strope et al. 2010; Wolf et al. 2010).

Pour décrire l'agressivité de la maladie lors du diagnostic et prédire le risque de progression, différents outils pronostiques sont utilisés à partir de la biopsie de la tumeur. Notamment, le score de Gleason (grade) permet d'évaluer la différenciation et la croissance cellulaire, tandis que le système TNM (*Tumors, Nodes, Metastasis*) caractérise le stade de la tumeur. Ce dernier sera indicatif de la taille de la tumeur, mais aussi du degré d'invasion des tissus adjacents et périphériques (**Tableau 4**). Des tumeurs de stades 1 et 2 sont considérées comme cliniquement localisées, celles de stade 3 sont dites localement avancées et celles de stade 4 sont métastatiques. De plus, les niveaux d'APS au diagnostic représentent un excellent marqueur de l'activité de la prostate, puisque cette protéine est sécrétée sous l'influence des androgènes, bien que non spécifique au cancer (Stamey et al. 1987; Strope et al. 2010). Grâce aux outils de diagnostic précoce, les tumeurs cliniquement localisées ou localement avancées représentent plus de 95% des nouveaux cas de cancer de la prostate diagnostiqués (Cooperberg et al. 2004; Stanbrough et al. 2006; Jemal et al. 2011; Scosyrev et al. 2011; Siegel et al. 2012).

Tableau 4. Définitions des stades TNM cliniques pour le cancer de la prostate

Classification		Description
T		
T		Tumeur primitive (T)
	T1	Tumeur non palpable et non visible à l'imagerie
	T2	Tumeur limitée à la prostate T2a : atteinte de la moitié d'un lobe ou moins T2b : atteinte de plus de la moitié d'un lobe sans toucher aux 2 lobes T2c : atteinte des deux lobes
	T3	Extension au-delà de la capsule T3a : extension extra-capsulaire uni- ou bilatérale T3b : extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale
	T4	Extension aux organes adjacents autres que les vésicules séminales
N		Ganglions régionaux (N – nodes)
	N0	Absence de métastase ganglionnaire
	N1	Atteinte ganglionnaire régionale
M		Métastases (M)
	M0	Absence de métastase à distance
	M1	Métastase à distance

Les subdivisions pour le stade T1 et M1 ne sont pas indiquées. Tableau adapté de (AJCC Cancer Staging Manual 2010).

Lorsque la tumeur est cliniquement localisée ou localement avancée, plusieurs options thérapeutiques sont disponibles. Les deux principales sont la radiothérapie (irradiation externe et/ou curiethérapie) ainsi que la chirurgie (prostatectomie)(Thompson et al. 2007; Heidenreich et al. 2008; Miocinovic et al. 2011; Boorjian et al.). Bien que le *watchful waiting* soit de plus en plus populaire pour les cancers localisés, en comparaison la prostatectomie radicale et la radiothérapie entraînent une diminution d'environ 40% du risque de mortalité par le cancer de la prostate, ainsi qu'une diminution de la mortalité globale (Bill-Axelsson et al. 2005; Chou R 2011; Boorjian et al.). Lorsque détecté à un stade avancé (métastatique), le traitement privilégié sera une TPA, afin de bloquer les androgènes nécessaires à la progression du cancer (**Section 4.3**).

Les recherches présentées dans le cadre de cette thèse portent principalement sur le risque de récurrence biochimique et de progression du cancer de la prostate après traitement (prostatectomie radicale ou TPA). Ainsi, ce n'est pas dans un contexte de détection du

cancer que se situent les résultats présentés dans le cadre des Chapitres V à VIII, mais bien dans un contexte où le cancer a été diagnostiqué, puis initialement traité. Les Chapitres V à VII s'intéressent à des patients atteints de cancers cliniquement localisés ou localement avancés, tous traités par prostatectomie radicale. Le Chapitre VIII porte sur l'étude de cas de cancers localement avancés ou métastatiques, tous traités par TPA.

4.2 Récidive et progression

Suivant la prostatectomie radicale, les taux d'APS doivent devenir nuls ou indétectables. Ainsi, lorsque les niveaux d'APS redeviennent au-dessus d'un certain seuil, cette augmentation est associée à une recrudescence de la prolifération des cellules tumorales. Malgré la chirurgie, environ 25-30% des patients auront une récurrence dite biochimique et, dans 90% des cas, elle aura lieu durant les 5 années post-prostatectomie (Caire et al. 2009). Selon les directives des associations européenne et américaine d'urologie, une récurrence biochimique se définit par deux dosages consécutifs de l'APS $\geq 0,2$ ng/ml suivant la chirurgie (Cookson et al. 2007; Heidenreich et al. 2008). Une récurrence biochimique pourra précéder de plusieurs années une récurrence clinique, qui se définit par la détection d'une tumeur au niveau local ou la présence de métastases, qui de façon générale se localiseront aux os.

Cette récurrence peut s'expliquer par une résection incomplète de la tumeur lors de la chirurgie (récurrence locale) ou par la présence de cellules disséminées ou de métastases n'ayant pas été détectées au diagnostic. En fait, même lorsque la tumeur est confinée à la prostate, des cellules tumorales circulantes (CTC) ainsi que des cellules tumorales disséminées (CTD), i.e. des cellules tumorales présentes dans la moelle osseuse, sont détectables chez les patients avec des cancers de la prostate localisés (Morgan et al. 2009; Ali et al. 2010). La détection des CTC est maintenant un test approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine comme outil pronostique dans les cas de cancer métastatique (test CellSearchTM), et un compte cellulaire de $\geq 4-5$ CTC augmente de plus du double le risque de mortalité chez les patients (de Bono et al. 2008; Goodman et al. 2009; Wang, Yang, et al. 2011). De plus, chez des cohortes composées majoritairement de cas de cancer localisé, 50 à 60% des patients présentent des CTD après prostatectomie radicale, ce qui augmente de 2 à 7 fois le risque de récurrence biochimique (Morgan et al.

2009; Weckermann et al. 2009). Il s'agit de cellules tumorales isolées, souvent appelées « dormantes », qui peuvent probablement donner naissance aux métastases. Toutefois, peu importe la provenance des cellules impliquées dans la récurrence biochimique, cette élévation des niveaux circulants d'APSA précédera presque invariablement une récurrence clinique, qu'elle soit locale ou métastatique.

Afin de prédire le risque de récurrence du cancer de la prostate après une prostatectomie radicale, plusieurs modèles de prédiction pré- et post-opératoires ont été développés. Mentionnons entre autres celui de D'Amico et coll., basé sur le grade et le stade de la tumeur ainsi que les niveaux d'APSA au diagnostic, qui permet de séparer de façon simple les patients en trois groupes distincts : ceux à risque faible, à risque intermédiaire, puis à risque élevé de récurrence biochimique suivant la prostatectomie (D'Amico et al. 1998; Boorjian et al. 2008). D'autres modèles sont aussi disponibles, tel le *Cancer of the Prostate Risk Assessment (CAPRA)* et le nomogramme de Kattan (Kattan et al. 1998; Cooperberg et al. 2005; Stephenson et al. 2005; Stephenson et al. 2006; Kattan et al. 2009). Les modèles de prédiction de la récurrence du cancer de la prostate dans le contexte de la prostatectomie radicale peuvent notamment inclure des données pathologiques, comme le stade et le score de Gleason, mais aussi le statut des marges chirurgicales et l'expérience de l'urologue.

L'utilité d'un nomogramme, d'un biomarqueur ou d'un outil de prédiction dépend de sa sensibilité et de sa spécificité. La sensibilité est la capacité du biomarqueur de donner un résultat positif lorsque la caractéristique d'intérêt est présente, tandis que la spécificité est la capacité du marqueur à donner un résultat négatif lorsque la caractéristique d'intérêt est absente (faux-positif). Une autre façon d'évaluer un marqueur prédictif est l'indice de concordance, qui permet d'évaluer à la fois sa sensibilité et sa spécificité. Ainsi, une valeur de 0,80 indiquera que le test prédit correctement la variable d'intérêt dans 80% des cas, alors que de l'information supplémentaire serait nécessaire pour rendre le test idéal, c'est-à-dire à 100% (1,0). De façon générale, les modèles de prédiction de la récurrence du cancer de la prostate ont des indices de concordance entre 0,66 et 0,80, indiquant que la prédiction est à mi-chemin entre l'absence de prédiction (0,50 ou 50%, équivalent à un pile-ou-face) et la prédiction parfaite de 1,0 (100%) (Roupret et al. 2009; Lughezzani et al. 2010; Korets

et al. 2011; Swanson et al. 2011). Ces différents outils demeurent donc imparfaits et leurs indices de concordance sont inadéquats lors de validations externes. Par conséquent, de nouveaux marqueurs pronostiques doivent être développés afin de discriminer entre les cancers de la prostate indolents et agressifs. Puisque le cancer de la prostate a tout au long de son évolution une dépendance marquée pour les androgènes, l'inclusion de données supplémentaires associées à la stéroïdogénèse pourrait permettre d'améliorer ces tests pronostiques.

4.3 Rôle des androgènes

Contrairement au cancer de l'endomètre où des niveaux circulants élevés ont été associés à un risque accru de développer cette maladie, aucune association reproductible n'a été observée entre les androgènes circulants et le cancer de la prostate. En effet, dans le cadre d'une méta-analyse de 18 études prospectives incluant plus de 10 000 hommes, le regroupement *Endogenous Sex Hormones and Prostate Cancer* n'a pas observé d'association entre le risque de cancer de la prostate et les niveaux circulants de testostérone, de DHT, de DHEA, de DHEA-S, de 4-dione, de 3 α -diol-G ou d'E₂ (Roddam et al. 2008). Des résultats similaires ont été obtenus par le consortium *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial* (Weiss et al. 2008). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence de relation entre les androgènes en circulation et le cancer de la prostate. Notamment, les niveaux d'androgènes circulants ne reflètent pas l'activité des androgènes dans la prostate. De plus, la plupart des études ont utilisé des méthodes de dosage basées sur l'immunologie (Roddam et al. 2008; Weiss et al. 2008), qui peuvent manquer de spécificité et de sensibilité. Dans un contexte où les hormones ont une grande variabilité inter-individuelle et où les niveaux de certains stéroïdes changent avec l'âge (**Tableau 1**), l'utilisation de méthodes plus robustes est essentielle afin de mettre à jour des variations hormonales probablement subtiles (Rosner et al. 2007). Il est aussi connu depuis longtemps que les hormones circulantes ont une cyclicité circadienne qui peut faire varier du double les niveaux en circulation (Sjoberg et al. 1979; Plymate et al. 1989; Walton et al. 2007; Hayes et al. 2010). Enfin, certains auteurs ont émis l'hypothèse de l'équilibre entre les œstrogènes et les androgènes comme élément important, et non seulement les niveaux d'androgènes. Cet équilibre entre les C19 et les C18 serait critique

pour le développement du cancer de la prostate bien que leur ratio est plus rarement étudié (**section 4.4**). Quoiqu'il en soit, même si les niveaux circulants d'androgènes ne semblent pas associés au développement du cancer de la prostate, il ne fait plus aucun doute que l'activation de l'AR dans la prostate est essentielle à la prolifération et à la survie des cellules tumorales.

L'action des androgènes dans la prostate est centrée sur l'AR, qui est activé faiblement par la testostérone, mais possiblement significativement, et fortement par la DHT. Cette distinction d'activation s'explique notamment par une affinité plus grande de l'AR pour la DHT, par la formation d'un complexe plus stable AR-DHT que le complexe AR-testostérone et par une capacité différente à recruter les corégulateurs essentiels à l'activité de l'AR (Zhou et al. 1995; Askew et al. 2007). La dépendance de la prolifération des cellules prostatiques à la DHT est illustrée par le fait que l'inhibition des 5 α -réductases est devenue un pilier dans le contrôle de l'hyperplasie bénigne de la prostate (van der Sluis et al. 2011). L'utilisation du finastéride, un inhibiteur de la 5 α -réductase de type 2, et du dutastéride, un inhibiteur des 5 α -réductases de type 1 et de type 2, est une approche permettant une diminution de 25% de l'incidence du cancer de la prostate (Thompson et al. 2003; Andriole et al. 2010). L'utilisation du dutastéride entraîne une diminution de plus de 90% de la DHT intra-tumorale et une augmentation de plus de 4000% de la testostérone intra-prostatique (Gleave et al. 2006). Ainsi, la DHT, et non la testostérone, active l'AR et promouvoit le développement du cancer de la prostate.

À la suite d'une récurrence, ou lorsque le cancer est avancé au diagnostic (métastatique), le traitement de choix sera la TPA. L'objectif de cette thérapie est de réduire la disponibilité des androgènes, principalement en bloquant la production testiculaire d'androgènes, avec ou sans co-traitement avec un inhibiteur de l'AR (**Figure 12**) (Harris et al. 2009; Horwitz 2009; Attard et al. 2011). Ce traitement, qui consiste en la castration chimique du patient, constitue l'une des pièces maîtresses dans l'arsenal médical pour combattre le cancer de la prostate et est une démonstration évidente de la dépendance des cellules tumorales aux androgènes (Harris et al. 2009; Horwitz 2009; Attard et al. 2011). En effet, plus de 90% des patients auront une réponse favorable à ce type de traitement, indiquant clairement que la castration chimique permet de contrôler le cancer

de la prostate avancé (Shiota et al.). Toutefois, la TPA ne permet une rémission du cancer que pour une durée limitée, variant de 2 à 5 ans (Kirby et al. 2011). Au cours de cette période de castration suite à la TPA, la maladie progressera éventuellement vers un cancer de la prostate résistant à la castration (ou *castration resistant prostate cancer*, CRPC). Suivant le diagnostic, de 10 à 20% de tous les cancers de la prostate progresseront vers un CRPC, qui entraîne généralement le décès en deçà de deux ans suivant le début de la progression (Pienta et al. 2006; Kirby et al. 2011; Yap et al. 2011). Malgré l'éventuelle résistance à la castration, l'efficacité de la TPA dans le contrôle du cancer de la prostate, même à un stade avancé, démontre sans équivoque le rôle central joué par l'AR en ce qui a trait à la survie et la prolifération des cellules tumorales.

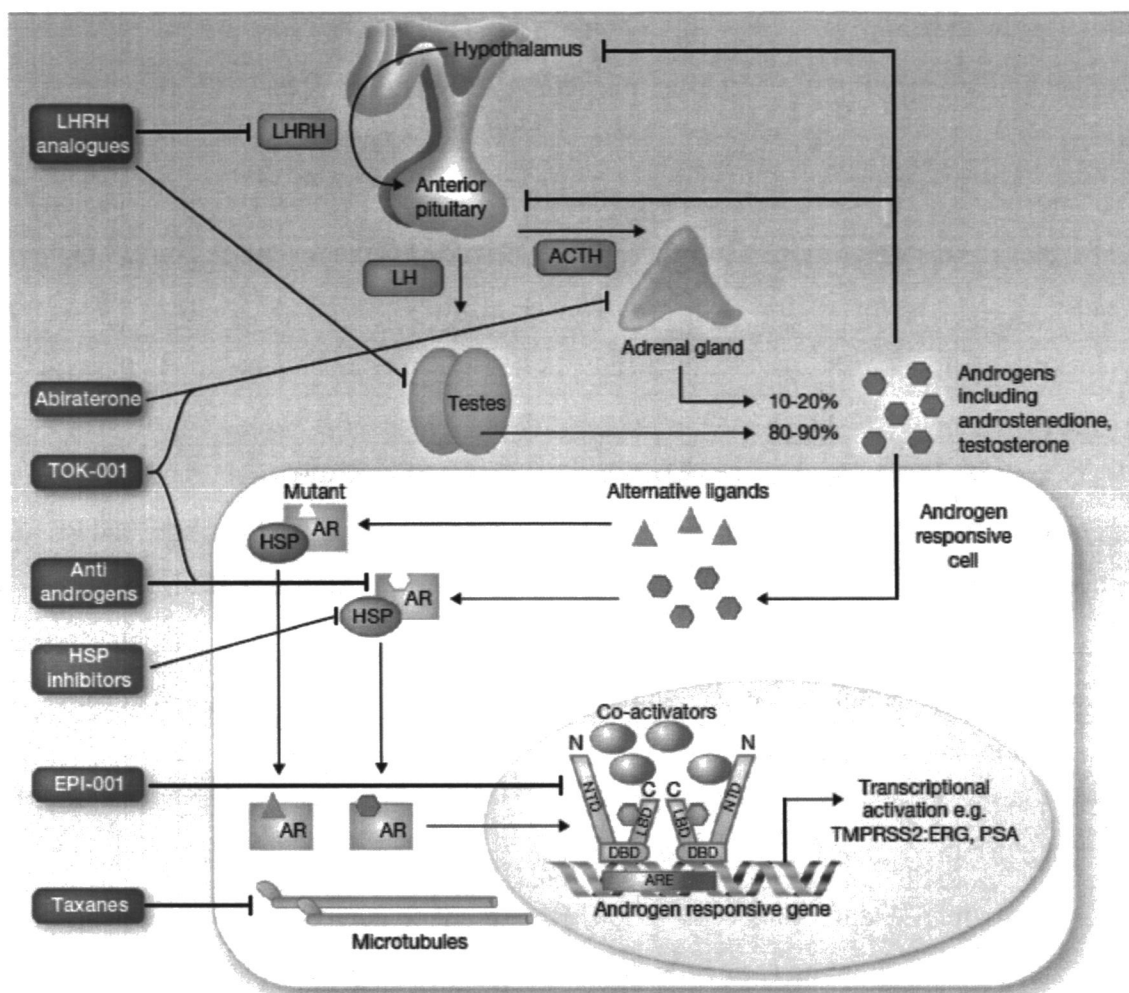


Figure 12. Traitements pharmacologiques du cancer de la prostate ciblant l'axe des androgènes. Les analogues de la *luteinizing hormone-releasing hormone* (LHRH) permettent la castration chimique, puisqu'ils bloquent la stimulation de la production testiculaire d'androgènes. L'abiratéronne bloque la production des précurseurs surrénaliens par les glandes surrénales, mais peut aussi bloquer l'activité de CYP17A1 dans les cellules tumorales. Les anti-androgènes vont bloquer, en se liant à l'AR, l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles. Le TOK-001 est un double-inhibiteur qui inactive à la fois CYP17A1 et l'AR. L'inhibition des co-activateurs de l'AR, telles des HSP, va aussi inhiber l'activité de l'AR. Certains domaines de l'AR (LBD, DBD et le *N-terminal domain* [NTD]) sont aussi illustrés. Puisque les taxanes interfèrent avec l'agencement des microtubules, il est possible qu'elles interfèrent avec l'action de l'AR. À noter que certaines des molécules illustrées font encore l'objet d'études cliniques. Tiré de Attard et coll. 2011.

Lorsque les tumeurs sont résistantes à la castration, elles ne sont pas nécessairement indépendantes des androgènes. En effet, plusieurs mécanismes moléculaires vont expliquer cette résistance à la castration et la plupart de ces mécanismes vont impliquer l'hyperactivation de l'AR (**Figure 13**). Cette activation peut être indépendante des androgènes (DHT), puisque certaines mutations rendent l'AR constitutivement actif ou activable par de nouveaux ligands telle la progestérone (Tan et al. 1997; Thin et al. 2003). D'autres mécanismes sont mêmes ligands-indépendants puisque certains variants d'épissage de l'AR sont constitutivement actifs (comme le variant AR-V7/AR3) (Watson et al. 2010). Enfin, l'amplification du gène *AR* est retrouvée dans 20-30% des CRPC, ce qui permet d'augmenter l'expression de l'AR de 6 fois comparativement aux tumeurs non traitées à la TPA ou aux tissus provenant d'hyperplasie bénigne de la prostate (Koivisto et al. 1997; Linja et al. 2001; Edwards et al. 2003). Toutefois, l'hyperactivation de l'AR peut aussi se faire par une augmentation de la synthèse de DHT. Ainsi, différents mécanismes de résistance à la castration impliquent la synthèse *de novo* de DHT intra-tumorale. En effet, l'expression de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse permettant la synthèse de la DHT à partir des précurseurs surrénaliens est modifiée dans les CRPC en comparaison des tumeurs primaires (Stanbrough et al. 2006; Montgomery et al. 2008; Cai, Chen, et al. 2011). Mentionnons entre autres une augmentation des 3 β -HSD de types 1 et 2 (2-9 fois), de CYP17A1 (17 fois), de la 17 β -HSD de type 5 (5-8 fois) et de la 5 α -réductase de type 1 (2-3 fois) (Stanbrough et al. 2006; Montgomery et al. 2008), mais aussi une augmentation des enzymes de la voie alternative de synthèse de la DHT (Mohler, Titus, Bai, et al. 2011; Mohler, Titus and Wilson 2011). Cela permet donc aux tumeurs, chez les hommes médicalement castrés, de maintenir des niveaux d'androgènes suffisamment élevés pour activer l'AR et continuer la progression tumorale. Plusieurs facteurs contribuent à ces changements d'expression, comme l'insuline, fréquemment élevée chez les patients sous TPA, qui peut induire l'expression des enzymes CYP11A1, CYP17A1, la 3 β -HSD de type 2, la 5 α -réductase de type 1 et la 11-cis rétinol déshydrogénase (RDH5), impliquées dans la synthèse de la DHT (Lubik et al. 2011). Ainsi, même lorsqu'elles sont résistantes à la castration, les cellules tumorales ne sont pas nécessairement indépendantes des androgènes. Au contraire, l'expression de la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse *de novo* de DHT intra-tumorale est augmentée dans les CRPC.

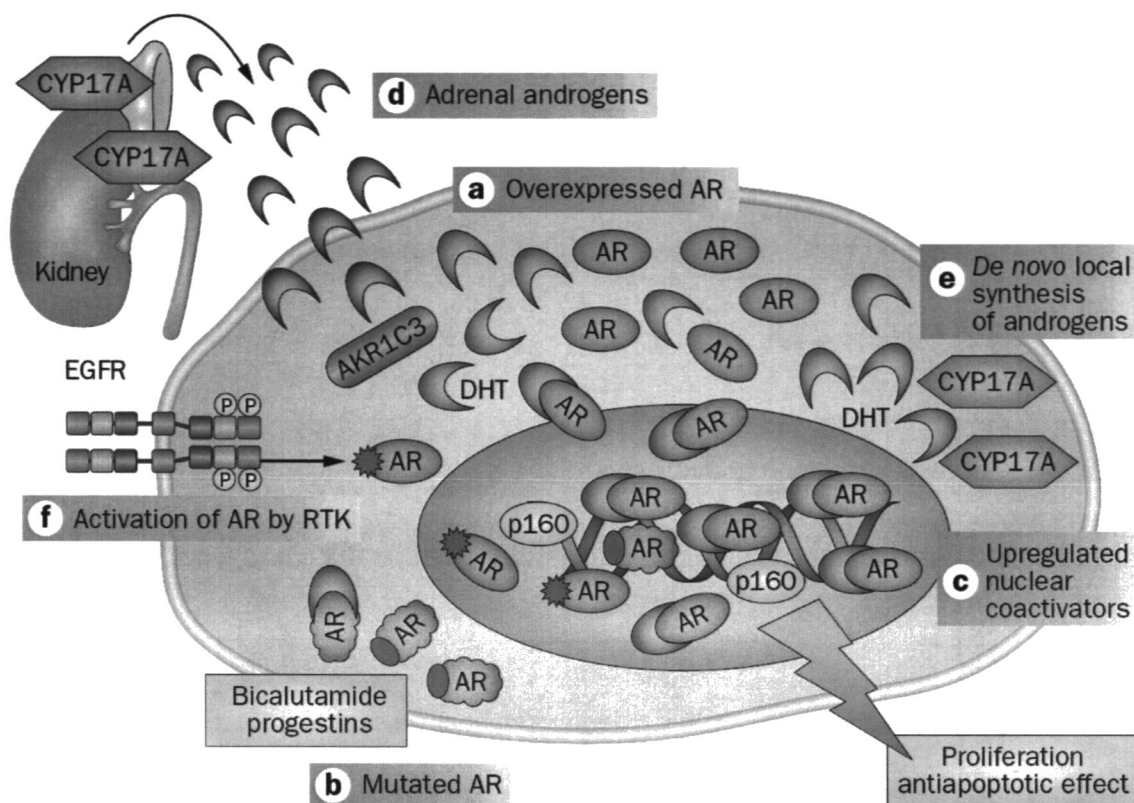


Figure 13. Mécanismes d'hyperactivation de l'AR dans les CRPC. L'AR peut être surexprimé par différents mécanismes, comme l'hypométhylation de son promoteur ou la duplication génique, ce qui entraîne une augmentation de son activité même dans un environnement pauvre en DHT (a). Certaines mutations de l'AR permettent son activation constitutive ou bien son activation après liaison à d'autres molécules telle la progestérone (b). L'activité transcriptionnelle de l'AR est, entre autres, fonction de la présence de ses coactivateurs. Dans les cancers CRPC, certains de ces coactivateurs sont surexprimés, notamment des membres de la famille p160 (c). Les cellules tumorales utilisent également les précurseurs surrénaliens (d) pour stimuler la synthèse *de novo* de DHT (e). Enfin, il peut y avoir l'activation de l'AR indépendamment des androgènes suite à des modifications post-traductionnelles par des récepteurs tyrosines kinases (RTK) (f). Pour les CRPC, plusieurs mécanismes moléculaires interviennent afin de maintenir ou d'augmenter l'activation de l'AR. Figure tirée de Seruga et coll. 2011.

Cette dépendance continue aux androgènes, même après l'évolution vers une tumeur CRPC, est illustrée par l'efficacité de l'acétate d'abiratérone en clinique. L'abiratérone est un inhibiteur sélectif de l'enzyme CYP17A1 qui bloque la synthèse des précurseurs des androgènes et des œstrogènes et qui permet d'améliorer la survie des patients atteints d'un CRPC (de Bono et al. 2011). Le traitement à l'acétate d'abiratérone de tumeurs résistantes à la castration dans les modèles murins entraîne une augmentation de l'expression de CYP17 dans les cellules tumorales qui deviennent résistante à ce traitement (Cai, Chen, et al. 2011). Ceci implique que même au stade CRPC, certaines tumeurs de la prostate demeurent androgéno-dépendantes.

En conclusion, la démonstration de cette dépendance aux androgènes est établie par les nombreux mécanismes conduisant à l'hyperactivation de l'AR, notamment par l'augmentation de la synthèse de DHT *de novo* dans les cellules tumorales et par l'efficacité des traitements ciblant la production et l'action des androgènes pour combattre ce type de cancer.

4.4 Rôle des œstrogènes

Les œstrogènes, tout comme les androgènes, auraient également un rôle à jouer dans le développement du cancer de la prostate. En effet, l'expression en ARNm de l'aromatase est augmentée de 30 fois dans les tumeurs CRPC comparativement aux tumeurs primaires (Montgomery et al. 2008). L'augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène est expliquée par l'activation, dans les tumeurs de prostate, de promoteurs alternatifs normalement inactifs dans la prostate saine, comme les promoteurs I.3 et I.4 (Ellem et al. 2004). Avec une augmentation de la transcription, on peut s'attendre à une augmentation de la production intra-tissulaire d'E₂. En lien avec cette hypothèse, des niveaux d'œstrogènes élevés (↑10-20%) ont été associés au risque de développer un cancer de la prostate agressif, des niveaux d'E₂ ≥50pg/ml augmentant de 4 fois ce risque (Giton et al. 2008; Salonia et al. 2011).

Plusieurs expériences chez les rongeurs appuient l'hypothèse que les œstrogènes favorisent le développement du cancer de la prostate. Chez les rats, l'incidence du cancer de la prostate suite à un traitement à la testostérone se situe entre 5 et 40%, mais augmente

jusqu'à près de 100% lorsque de l'E₂ est donné en co-traitement (Bosland et al. 1995; Bosland et al. 2011). L'inactivation ciblée du gène codant pour l'aromatase (AromKO) entraîne une absence d'œstrogènes, mais une augmentation de 2 fois des niveaux circulants de DHT et de 9 fois des niveaux circulants de testostérone chez ces souris comparativement aux souris contrôles (McPherson et al. 2001). Cette exposition excessive aux androgènes conduit à l'hyperplasie de la prostate, sans toutefois pouvoir induire la formation de tumeur (McPherson et al. 2001). Dans ces modèles animaux, les œstrogènes semblent donc essentiels à la transformation maligne.

Pour que les œstrogènes puissent exercer leur action au niveau de la prostate, les récepteurs ER α et ER β y sont exprimés. L'ER α , présent dans les cellules basales de la prostate saine, semble bénéfique pour la tumeur et son expression est augmentée au cours de la progression du cancer pour être à son maximum dans les tumeurs métastatiques et les CRPC (Bonkhoff et al. 2001; Bonkhoff et al. 2009). Au contraire, l'ER β est exprimé à la fois dans les cellules épithéliales (luminales > basales) et stromales de la prostate et est diminué dans les tumeurs, puisqu'il entraîne l'apoptose des cellules de prostate provenant d'hyperplasie bénigne ou dérivées de tumeurs de la prostate (Bonkhoff et al. 2009; McPherson et al. 2010). Ainsi, le mode d'action des récepteurs aux œstrogènes est similaire à ce que l'on retrouve dans le contexte du cancer de l'endomètre : l'ER α favorise la croissance tumorale alors qu'au contraire l'ER β protège contre celle-ci (Bonkhoff et al. 2009).

De plus, l'équilibre entre les métabolites cancérigènes et protecteurs des œstrogènes, tel que défini à la section 3.2.2, pourrait aussi jouer un rôle dans l'effet cancérigène des œstrogènes (Bosland et al. 2011; Cavalieri et al. 2011). En effet, les hommes atteints d'un cancer de la prostate ont des niveaux urinaires d'adduits œstrogènes-ADN significativement plus élevés que les hommes sains, bien que les études publiées sur ce sujet sont de petite taille ($n < 20$ cas) (Markushin et al. 2006; Yang et al. 2009). Par conséquent, le métabolisme des œstrogènes et la production de dérivés cancérigènes semblent pouvoir influencer l'initiation tumorale et le développement du cancer de la prostate, bien que des études avec plus de patients sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

4.5 Susceptibilité génétique

Le risque de développer un cancer de la prostate est expliqué à plus de 40% par la composante héréditaire de l'individu (Lichtenstein et al. 2000). L'impact des facteurs génétiques dans cette maladie, i.e. la susceptibilité génétique au cancer de la prostate, est donc loin d'être négligeable. Selon l'impact de ces polymorphismes, on fera la distinction entre deux groupes de cancers: les cancers dit héréditaires (ou familiaux) et les cancers dit sporadiques (Cancel-Tassin et al. 2005; Alberti 2010).

Les premiers sont associés à une forte incidence familiale et à une apparition précoce du cancer, et la contribution de la génétique est considérée comme majeure (faible fréquence, forte pénétrance) (Cancel-Tassin et al. 2005; Alberti 2010). Par définition, pour être considéré comme un cancer de la prostate héréditaire, le patient doit avoir 3 membres de sa famille au 1^{er} degré affectés par le cancer de la prostate, un cancer de la prostate doit avoir été diagnostiqué dans sa famille 3 générations d'affilées, ou encore deux membres du 1^{er} degré doivent avoir été atteints avant l'âge de 55 ans (Carter et al. 1993; Alberti 2010; Cremers et al. 2011; Castro et al. 2012). Jusqu'à présent, les 3 principaux gènes de cancer de la prostate héréditaire (ou *hereditary prostate cancer*, HPC) sont *RNASEL*, *ELAC2* et *MSR1* (Smith et al. 1996; Tavigian et al. 2001; Carpten et al. 2002; Casey et al. 2002; Xu et al. 2002; Cancel-Tassin et al. 2005; Robbins et al. 2008; Beuten et al. 2010; Meyer et al. 2010; Xu et al. 2010), bien que d'autres loci soient aussi associés à une forte pénétrance (*BRCA2*, *HOX1B13*, *HPC on chromosome X* [HPCX], etc.) (Cancel-Tassin et al. 2005; Ewing et al. 2012). En ce qui a trait à leur pathologie, mise à part une apparition précoce du cancer (avant 55 ans), les cancers de la prostate héréditaires/familiaux sont similaires à ceux dits sporadiques (Cancel-Tassin et al. 2005; Alberti 2010). Les cancers héréditaires seront donc causés principalement par une seule mutation, généralement délétaire (codon stop prématurée ou mutation non-synonyme), qui aura une forte pénétrance dans les rares familles l'ayant dans leur bagage génétique.

Dans le cadre de mes travaux de doctorat, mes recherches ont porté sur les cancers de la prostate sporadiques. Ces cas de cancer ne sont pas associés à des antécédents familiaux majeurs, mais une composante génétique n'est pas à écarter. En effet, plusieurs

polymorphismes génétiques de susceptibilité ont été identifiés, avec en général des risques relatifs (RR ou *odds ratios*) entre 1,1 et 1,5 et des fréquences qui peuvent être aussi élevées que 45% (Kraft et al. 2009; Pomerantz et al. 2010). Plusieurs dizaines de ces variations génétiques sont connues dans le contexte du cancer de la prostate et la plupart de ces associations ont été répliquées chez des cohortes indépendantes (**Tableau 5**). Parmi celles-ci figurent les polymorphismes des régions intergéniques 8q24, 17q12 et 17q24, qui sont parmi les SNP les plus fréquemment associés au risque de susceptibilité au cancer de la prostate (Amundadottir et al. 2006; Gudmundsson, Sulem, Manolescu, et al. 2007; Gudmundsson, Sulem, Steinthorsdottir, et al. 2007; Haiman et al. 2007; Yeager et al. 2007; Zheng et al. 2008; Yeager et al. 2009). Par conséquent, plusieurs variations génétiques influencent de façon modeste, mais significative, la susceptibilité au cancer de la prostate dans la population en général.

Tableau 5. Polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate

Polymorphisme	Locus	Gène associé	Fréquence (%)	RR
rs1465618	2p21	<i>THADA</i>	18–21	1,16–1,20
rs12621278	2q31	<i>ITGA6</i>	94	1,32–1,47
rs2660753	3p12	<i>VGLL3</i>	12–13	1,11–1,48
rs10934853	3q21	<i>EEFSEC</i>	29–33	1,12
rs12500426	4q22	<i>PDLIM5</i>	56	1,14–1,17
rs17021918	4q22	<i>PDLIM5</i>	63–65	1,12–1,25
rs7679673	4q24	<i>TET2</i>	61–62	1,15–1,37
rs9364554	6q25	<i>SLC22A3</i>	32–33	1,17–1,26
rs10486567	7p15	<i>JAZF1</i>	77	1,12–1,35
rs2928679	8p21	<i>SLC25A37</i>	45–46	1,16–1,26
rs1512268	8p21	<i>NKX3-1</i>	40–42	1,13–1,28
rs10086908	8q24	aucun	72–74	1,14–1,25
rs7841060	8q24	aucun	25	1,19
rs16901979	8q24	aucun	3–7	1,66–1,74
rs16902094	8q24	aucun	13–25	1,21
rs445114	8q24	aucun	61–71	1,14
rs620861	8q24	aucun	61–66	1,11–1,28
rs6983267	8q24	aucun	53–58	1,13–1,42
rs7000448	8q24	aucun	40	1,14–1,40
rs1447295	8q24	aucun	7–17	1,29–1,72
rs10993994	10q11	<i>MSMB</i>	46	1,15–1,42
rs4962416	10q26	<i>CTBP2</i>	27	1,17–1,20
rs7127900	11p15	<i>TH</i>	18	1,29–1,40
rs11228565	11q13	<i>MYEOV</i>	21–29	1,23
rs7931342	11q13	<i>MYEOV</i>	56	1,19–1,25
rs4430796	17q12	<i>HNF1B</i>	47–58	1,16–1,38
rs1859962	17q24	aucun	49–52	1,16–1,20
rs8102476	19q13	<i>PPP1R14A</i>	47–64	1,12
rs2735839	19q13	<i>KLK3</i>	87	1,15–1,72
rs5759167	22q13	<i>BIK</i>	50–53	1,14–1,20
rs5945619	Xp11	<i>NUDT11</i>	40–44	1,19–1,46

Tableau adapté de Pomerantz et Freedman (2010) et basé sur (Amundadottir et al. 2006; Gudmundsson, Sulem, Manolescu, et al. 2007; Gudmundsson, Sulem, Steinthorsdottir, et al. 2007; Haiman et al. 2007; Yeager et al. 2007; Eeles et al. 2008; Gudmundsson et al. 2008; Sun et al. 2008; Thomas et al. 2008; Al Olama et al. 2009; Eeles et al. 2009; Gudmundsson et al. 2009; Yeager et al. 2009). Les RR sont toujours donnés pour l'allèle qui augmente le risque de cancer de la prostate, que ce soit l'allèle majeur ou mineur. Parmi ces polymorphismes, 24 sont significatifs en méta-analyses (Liu et al. 2011). Quatre des SNP décrits par Pomerantz et Freedman (2010) ne sont pas significatifs en méta-analyses et ont été retirés du (rs11649743, rs13254738, rs6465657, rs721048) (Pomerantz et al. 2010; Liu et al. 2011). Les autres SNP n'ont pas été testés par plus d'une *genome-wide association study* (GWAS) (Liu et al. 2011).

Malgré l'importance des androgènes dans le développement du cancer de la prostate, les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse n'ont pas été associés de façon reproductible avec le risque de développer ce type de cancer. En fait, aucun polymorphisme des gènes de la stéroïdogénèse n'a été associé dans les GWAS à la susceptibilité au cancer de la prostate (**Tableau 5**). De plus, les méta-analyses des petites études utilisant une approche de gène candidat n'ont révélé que peu de marqueurs de susceptibilité reproductibles dans les gènes de la stéroïdogénèse (**Tableau 6**). Le microsatellite dans l'intron 4 du gène *CYP19A1* illustre bien ce manque de reproductibilité entre les études (**Tableau 6**). En fait, Chu et coll. décrivent bien la situation : « ... *population studies do not convincingly show that polymorphisms in androgen metabolism genes are associated with prostate cancer risk.* » (Chu et al. 2008). Ainsi, les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse ne semblent pas affecter de façon notable la susceptibilité au cancer de la prostate, ce qui va de pair avec l'absence d'association entre les niveaux circulants d'androgènes et le risque de développer cette maladie.

Plusieurs centaines d'études portent sur les marqueurs de susceptibilité au cancer de la prostate, mais beaucoup moins d'études se sont attardées aux marqueurs pronostiques de cette maladie. C'est-à-dire des marqueurs génétiques du patient associés à l'évolution de la maladie, par exemple qui influenceraient la récurrence biochimique après une prostatectomie radicale. Plusieurs des marqueurs de susceptibilité identifiés dans les GWAS (**Tableau 5**), comme les variations dans la région 8q24, ont été étudiés dans le contexte de la progression du cancer de la prostate. Toutefois, bien que certaines associations significatives aient été détectées, aucune d'entre elles n'a pu être validée par les autres études (**Tableau 7**) (Huang et al. 2009; Wiklund et al. 2009; Cheng et al. 2010; Gallagher et al. 2010; Whitman et al. 2010; Ahn et al. 2011; Lin et al. 2011; Pomerantz et al. 2011; Sun et al. 2011; Szulkin et al. 2012). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence de validation, entre autres les différentes définitions de « progression » (récurrence biochimique, résistance à la castration, etc.), l'origine ethnique ou bien tout simplement l'absence de rôle majeur de ces variations dans la progression du cancer de la prostate. Ainsi, les polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate seraient associés à l'initiation tumorale, mais ne seraient pas nécessairement associés à son évolution, bien que des études dans un contexte homogène doivent être effectuées pour vérifier cette hypothèse.

Tableau 6. Comparaison des différentes études d'association entre les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse et la susceptibilité au cancer de la prostate

Gène	Polymorphisme	Nombre d'études ¹ (nombre d'individus)	RR (IC95%) ²	Référence	
Association vérifiée en méta-analyse					
<i>AR</i>	Répétition CAG ³ (exon 1)	27 (21510)	≥20 - 0,79 (0,61-1,02)	(Gu et al. 2012)	
			≥22 - 0,95 (0,81-1,11)		
			≥23 - 0,95 (0,76-1,20)		
<i>SRD5A2</i>	rs523349 (V89L)	22 (20200)	0,99 (0,94-1,05)	(Li, Coates, et al. 2010)	
			9 (5907)	1,02 (0,94-1,11)	(Ntais et al. 2003b)
			rs9282858 (A49T)	15 (10449)	1,10 (0,86-1,40)
		7 (3731)	1,56 (0,93-2,62)	(Ntais et al. 2003b)	
<i>GSTM1</i>	Délétion du gène	29 (10028)	1,33 (1,15-1,55)	(Mo et al. 2009)	
<i>GSTT1</i>	Délétion du gène	22 (8389)	1,05 (0,86-1,27)	(Mo et al. 2009)	
<i>GSTP1</i>	L105V	24 (10922)	1,06 (0,91-1,24)	(Mo et al. 2009)	
<i>CYP17A1</i>	rs743572 (-34T>C)	10 (5159)	1,08 (0,95-1,22)	(Ntais et al. 2003a)	
		1 ⁴ (17171)	0,97 (0,88-1,06)	(Setiawan et al. 2007) ⁴	
		20 (19856)	0,97 (0,88-1,08)	(Cai, Huang, et al. 2011)	
<i>UGT2B17</i>	Délétion du gène	7 (7230)	1,33 (1,00-1,77)	(Cai, Huang, et al. 2011)	
Associations dans des études individuelles					
<i>UGT2B17</i>	Délétion du gène	356 cas/363 témoins	1,70 (1,03-2,90)	(Park et al. 2007)	
		293 cas/367 témoins	1,90 (1,20-1,30)	(Park et al. 2006)	
		176 cas/161 témoins	2,07 (1,32-3,25)	(Karypidis et al. 2008)	
		2779 cas/1722 témoins	1,01 (0,83-1,23)	(Olsson et al. 2008)	
		411 cas/397 témoins	0,89 (0,55-1,45)	(Gallagher et al. 2007)	
		221 cas/205 témoins	0,88 (0,45-1,73)	(Setlur et al. 2010)	
<i>CYP19A1</i>	Microsatellite (TTTTA)n dans l'intron 4	1101 cas/882 témoins	1,26 (1,08-1,47)	(Cussenot, Azzouzi, Nicolaiew, Fromont, et al. 2007)	
		226 cas/156 patients	1,41 (1,01-1,98)	(Latil et al. 2001)	
		99 cas/116 témoins	0,56 (0,32-0,96)	(Suzuki, Nakazato, et al. 2003)	
		439 cas/479 témoins	0,76 (0,30-1,94)	(Li, Cicek, et al. 2004)	
		937 cas/493 témoins	Pas d'association ⁵	(Cunningham et al. 2007)	

¹ Les résultats présentés dans la partie supérieure de ce tableau sont tirés de méta-analyses. Le nombre d'études indique le nombre d'études génétiques incluses dans la détermination de l'effet des polymorphismes. À noter que plusieurs des puces à ADN utilisées dans les GWAS ne comprennent pas les SNPs rs523349 (V89L) et rs9282858 (A49T) du gène *SRD5A2* (Li, Coates, et al. 2010).

² Le risque relatif (RR ou *odds ratios*) est donné pour l'allèle mineur comparativement à l'allèle majeur pour les méta-analyses. Pour les analyses individuelles, les RR sont donnés pour les homozygotes allèles mineurs, en modèle dominant ou en modèle récessif tel que décrit par les auteurs.

³ Différents seuils de répétitions ont été utilisés pour étudier ce polymorphisme, dont les plus fréquents sont ceux étudiés dans la méta-analyse : ≥20, 22 ou 23.

⁴ L'étude de Setiawan a été incluse puisqu'elle compte à elle seule plus de patients que dans la méta-analyse de Ntais et coll. en ce qui a trait à l'étude de la variation rs743572 de *CYP17A1* (Ntais et al. 2003a; Setiawan et al. 2007). Toutefois, les conclusions sont les mêmes. Le risque relatif est celui des homozygotes CC, puisque le RR par allèle n'est pas donné dans l'article de Setiawan et coll. (2007).

⁵ Dans l'étude de Cunningham et coll., les RR ne sont pas indiqués, seulement les valeurs de *p* qui sont supérieures à 0,05.

Les associations significatives ($p \leq 0,05$) sont en caractère gras. IC95% : intervalle de confiance à 95%.

Tableau 7. Les polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate dans le contexte de la progression de cette maladie

SNP (Gène ou locus)	Étude	Définition de progression	Ethnie	Étude n'ayant pas vu d'association significative	Étude ayant observé une association significative
rs1447295 (8q24)	Huang 2009	Récidive biochimique	Asiatique	Wiklund 2009; Gallagher 2010; Whitman 2010; Szulkin 2012	Gallagher 2010 Ahn 2011
rs7920517 (MSMB)				Wiklund 2009; Gallagher 2010; Pomerantz 2011; Szulkin 2012	Pomerantz 2011
rs10993994 (MSMB)				Huang 2009; Wiklund 2009; Cheng 2010; Szulkin 2012	
rs2735839 (KLRK3)		Récidive biochimique,	Juif	Huang 2009; Wiklund 2009; Cheng 2010; Pomerantz 2011; Szulkin 2012	
rs10486567 (JAZF1)	Gallagher 2010	métastases, mort causée par le cancer de la prostate	Ashkenaze	Huang 2009; Pomerantz 2011 Wiklund 2009; Ahn 2011; Szulkin 2012	Cheng 2010 Huang 2009
rs7931342 (MYEO1)					
rs10896449 (11q13)					
rs7920517 (MSMB)					
rs10993994 (MSMB)					
rs6983267 (8q24)	Ahn 2011	Métastases et récidive biochimique	Caucasien, Indien, Afro- Américain	Wiklund 2009; Gallagher 2010; Pomerantz 2011; Szulkin 2012 Huang 2009; Wiklund 2009; Gallagher 2010; Whitman 2010; Pomerantz 2011; Szulkin 2012	Huang 2009
rs4242382 (8q24)				Huang et al. 2009; Gallagher 2010	
rs12621278 (ITGA6)				Pomerantz et al. 2011	
rs629242 (KIAA1211)				Szulkin et al. 2012	
rs10896449 (11q13)				Wiklund et al. 2009; Ahn et al. 2011; Szulkin et al. 2012	Gallagher 2010
rs9364554 (SLC22A3)	Cheng 2010	Récidive biochimique, ≥ 2 ng/ml de l'APS au dessus du nadir, initiation de la TPA, métastases	Caucasien et Afro- Américain	Huang et al. 2009; Wiklund et al. 2009; Gallagher et al. 2010; Pomerantz et al. 2010; Pomerantz et al. 2011; Szulkin et al. 2012	
rs4430796 (HNF1B)				Huang et al. 2009; Wiklund et al. 2009; Gallagher et al. 2010; Ahn et al. 2011; Pomerantz et al. 2011; Szulkin et al. 2012	
rs5945572 (NUDT10/11)				Huang et al. 2009; Gallagher et al. 2010	
rs2735839 (KLRK3)	Pomerantz 2011	Mort causée par le cancer de la prostate	Caucasien	Huang et al. 2009; Wiklund et al. 2009; Cheng et al. 2010; Szulkin et al. 2012	Gallagher 2010
rs7679673 (TET2)				Cheng et al. 2010	
rs627839 (RNASEL)	Lin 2011	Mort causée par le cancer de la prostate	Caucasien		

Whitman et coll. (2010) ont étudié 6 SNP de susceptibilité chez les Afro-Américains, mais aucun n'a été associé à la progression. Szulkin et coll. (2012) ont étudié 23 SNP de susceptibilité et la progression du cancer chez une cohorte de Suédois, mais aucun polymorphisme n'a été associé à la progression. Wiklund et coll. (2009) ont étudié 16 SNP en association à la mort causée par le cancer de la prostate chez une cohorte de Suédois, mais aucun polymorphisme n'a été associé. Mises à part les études de Whitman et coll. (2010), d'Ahn et coll. (2011) et de Huang et coll. (2009), dans lesquelles les patients ont tous été traités par prostatectomie radicale, toutes les autres études incluent des patients traités par au moins deux thérapies différentes: prostatectomie radicale et/ou radiothérapie et/ou *watchful waiting* et/ou radiothérapie combinée avec une TPA et/ou chimiothérapie. Le rs790517 est à environ 20 kb en amont de MSMB.

Contrairement aux variants génétiques associés à la susceptibilité au cancer de la prostate, les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse semblent influencer la progression du cancer de la prostate. La variation V89L du gène *SRD5A2* (rs523349), décrite comme diminuant de 40% l'activité enzymatique (Makridakis et al. 1997; Makridakis et al. 2000), a été associée à une augmentation du risque de développer un cancer agressif, mais aussi avec une augmentation de 4 à 6 fois du risque de récurrence biochimique (Shibata et al. 2002; Cussenot, Azzouzi, Nicolaiew, Mangin, et al. 2007). Lindström et coll. ont quant à eux associé, dans le cadre d'une étude comprenant plus de 2700 patients, l'allèle A du rs17302090 situé 10kb en amont de l'AR, à un risque augmenté de 50% de mourir du cancer comparativement aux porteurs de l'allèle majeur C (Lindstrom et al. 2007). Les allèles « longs » d'un microsatellite de l'AR, faisant varier la répétition du codon « CAG » dans la partie codante du gène, ont quant à eux été associés à une diminution de 2 à 8 fois du risque de progression (Nam et al. 2000; Strom et al. 2004), bien que d'autres études observent l'effet inverse ou aucun effet (Edwards et al. 1999; Cude et al. 2002). L'allèle A du rs10883783 du gène *CYP17A1* a été associé à une diminution de la mortalité de 56% chez une cohorte de 598 patients atteints d'un cancer de la prostate cliniquement localisé ou localement avancé (Wright et al. 2010). Des polymorphismes des transporteurs androgéniques *SLCO2B1* et *SLCO1B3* sont associés à une diminution $\approx 50\%$ du temps avant résistance à la castration et une augmentation de 76 à 99% de la mortalité associée au cancer de la prostate (Wright et al. 2011; Yang et al. 2011). Tout comme ces transporteurs, des polymorphismes de la voie des œstrogènes semblent influencer la progression du cancer de la prostate. Par exemple, un SNP et un microsatellite dans le gène de l'aromatase (*CYP19A1*) sont associés à une diminution de 47% du temps avant résistance à la castration ainsi qu'à une diminution de 44% de la survie au cancer de la prostate, respectivement (Tsuchiya et al. 2006; Ross et al. 2008). Jusqu'à présent, la plupart des recherches dans le contexte de la progression étudient des polymorphismes spécifiques, généralement dans la région codante des gènes. En effet, aucune étude n'a évalué de façon systématique les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse, le tout chez des cohortes d'origines ethniques homogènes, en lien avec une seule variable clinique dans le contexte de la progression du cancer de la prostate.

5. Hypothèses, objectifs, méthodologies et résultats

L'hypothèse sous-jacente à mes travaux de doctorat est que l'altération de la synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes sexuelles influence le risque de développer un cancer ainsi que son évolution. Dans le cadre de mon doctorat, j'avais comme objectif de mieux définir la relation entre les hormones stéroïdiennes sexuelles, les gènes de la stéroïdogénèse et deux cancers hormonodépendants, soit ceux de l'endomètre et de la prostate. Dans cette optique, trois approches furent utilisées : 1) la quantification des hormones stéroïdiennes circulantes par des méthodes basées sur la spectrométrie de masse; 2) la quantification de l'expression en ARNm de certaines enzymes de la stéroïdogénèse dans le tissu; et 3) l'étude de polymorphismes génétiques constitutifs de gènes candidats de la stéroïdogénèse. Les résultats de ces travaux sont décrits dans le cadre du cancer de l'endomètre (Chapitres II à IV) et de la prostate (Chapitres V à VIII).

5.1 Association des œstrogènes en circulation à l'expression des gènes de synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre

Jusqu'à présent, toutes les études portant sur le cancer de l'endomètre avaient quantifié les œstrogènes en circulation avec des méthodes analytiques présentant certaines lacunes, particulièrement chez la femme postménopausée, où les niveaux de ces hormones sont plus faibles (Stanczyk et al. 1980; Chen et al. 1996; Leung et al. 1997; Ziegler et al. 1997; Falk et al. 1999; Sinicco et al. 2000; Rinaldi et al. 2001; Lee et al. 2006; Labrie et al. 2007; Stanczyk et al. 2007; Faupel-Badger et al. 2010). Il est donc possible que les différences entre les femmes saines et celles atteintes d'un cancer de l'endomètre soient en réalité plus grandes que ce qui avait été décrit dans la littérature au moyen de RIA. Par conséquent, notre premier objectif était de quantifier les principaux œstrogènes (E_1 , E_2 et E_1 -S) dans une étude-pilote de type cas-témoin en utilisant des méthodes analytiques plus sensibles et hautement spécifiques. Nous disposions de sérums provenant de 110 femmes postménopausées saines et de sérums provenant de 126 femmes postménopausées atteintes d'un cancer de l'endomètre, recrutées par les chercheurs de l'étude dans deux hôpitaux, soient le Centre Hospitalier St-Sacrement et l'Hôtel-Dieu de Québec, respectivement. Les méthodes analytiques utilisées étaient basées sur la spectrométrie de masse et avaient déjà

été établies et validées (Labrie et al. 2007). Des analyses de covariance (ANCOVA) sur les données en \log_{10} ont été effectuées afin de comparer les niveaux hormonaux dans la circulation de femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre à ceux de femmes saines, en ajustant pour l'âge et l'IMC.

Notre deuxième objectif était d'établir le profil d'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse dans les tissus endométriaux sain, péri-tumoral et tumoral. Nous voulions déterminer si l'expression des gènes de synthèse et du métabolisme des œstrogènes est altérée dans le tissu tumoral de l'endomètre et si cette altération est en faveur d'une formation accrue ou non d'œstrogènes actifs. Afin d'étudier l'expression génique, des échantillons d'endomètre sain ($n=7$) provenant de femmes sans le cancer de l'endomètre et des échantillons d'endomètre péri-tumoral ($n=36$) et tumoral ($n=49$) provenant de femmes avec le cancer de l'endomètre ont été sélectionnés et prélevés par un pathologiste. L'ARN a été purifié au moyen de Tri-Reagent® et l'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé pour l'analyse par PCR quantitatif en temps réel à partir de méthodes validées. Afin de comparer l'expression de l'ARNm dans les tumeurs et les tissus péri-tumoraux, des tests *t* de Student ou des tests de Wilcoxon ont été utilisés, selon que la distribution des données étaient paramétriques ou non-paramétriques, respectivement.

Les résultats, qui sont présentés au Chapitre II, indiquent que les différences entre les niveaux d'œstrogènes chez les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre sont plus importantes lorsque déterminées à l'aide de méthodes de spectrométrie de masse (i.e. augmentation de 110–150% vs. 30 à 80% par RIA) (Austin et al. 1991; Nyholm et al. 1993; Potischman et al. 1996; Sherman et al. 1997; Lukanova et al. 2004; Allen et al. 2008). Les données indiquent également que plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse sont exprimées dans l'endomètre péri-tumoral et que les niveaux d'expression de plusieurs de ces gènes sont altérés dans les tumeurs, en faveur d'une production potentiellement accrue d'œstradiol.

5.2 Profil des œstrogènes et de leurs métabolites glucuronidés dans la circulation sanguine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Puisque la synthèse et le métabolisme des œstrogènes sont altérés dans les tumeurs de l'endomètre (Chapitre II), il est possible que ces changements se reflètent dans la circulation. Afin d'étudier les principaux métabolites des œstrogènes produits par l'action des enzymes COMT et UGT (i.e. métabolites méthylés et dérivés glucuronidés), nous devions d'abord élaborer une approche analytique permettant la quantification de ces divers métabolites des œstrogènes (Chapitre III). L'approche qui fut privilégiée était basée sur la spectrométrie de masse, une expertise unique dans mon laboratoire d'accueil, et la méthode a été validée de façon similaire aux méthodes analytiques précédentes (Lépine et al. 2004; Labrie et al. 2006; Labrie et al. 2007).

La méthode analytique validée et décrite au Chapitre III permet la quantification de cinq métabolites des œstrogènes, soit l'E₁-3-glucuronide (E₁-3G), l'E₂ conjugué en position 3 ou 17 (E₂-3G ou E₂-17G) ainsi que les dérivés 2-méthoxyœstrone et 2-MeOE₂ conjugués en position 3 (2-MeOE₁-3G et 2-MeOE₂-3G). La méthode consiste en une première extraction sur phase solide et une seconde en phases liquide-liquide, qui précèdent la séparation et la quantification des composés par HPLC-MS/MS (*high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). La précision inter- et intra-jour de cette méthode est comprise entre 90 et 111%, et la méthode présente une excellente reproductibilité (coefficients de variations $\leq 15\%$). La limite inférieure de quantification de 5 pg/mL démontre la sensibilité de la méthode, soit une meilleure sensibilité que les méthodes de RIA. La méthode développée permet le dosage de certains des glucuronides d'œstrogènes dans la circulation sanguine de femmes préménopausées et postménopausées, des métabolites jusqu'alors pratiquement jamais étudiés. Les résultats de dosage indiquent que certains glucuronides d'œstrogènes (E₁-3G, E₂-3G et 2-MeE₁-3G) se retrouvent en quantité similaire à l'E₁ et l'E₂. L'approche analytique développée et validée sur des échantillons cliniques permet de détecter et de quantifier certains glucuronides d'œstrogènes.

5.3 Profil des œstrogènes endogènes, de leurs précurseurs et de leurs métabolites dans la circulation sanguine chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre : association au risque et aux caractéristiques clinico-pathologiques

Les données présentées dans les études pré-existantes dans la littérature ne dressent qu'un portrait partiel des niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes (DHEA-S, 4-dione, testostérone, E₁, E₁-S, E₂). Ainsi, à notre connaissance, certains stéroïdes n'avaient jamais été quantifiés dans le contexte du cancer de l'endomètre, notamment certains androgènes et métabolites des androgènes (DHT, 3 α -diol-3G, 3 α -diol-17G, ADT, ADT-G), des précurseurs surrénaliens (5-diol, DHEA), ainsi que des métabolites des œstrogènes (2-MeOE₁-3G, 2-MeOE₂-3G, E₁-3G, E₂-3G, E₂-17G). Avec les outils analytiques dont nous disposions, il devenait possible de documenter ces changements hormonaux chez la femme atteinte d'un cancer de l'endomètre et de les comparer à ceux retrouvés chez la femme saine. De plus, puisque les niveaux en ARNm de certains gènes de synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes sont affectés dans les tumeurs de l'endomètre (Chapitre II), il était possible que ces changements se reflètent dans la circulation. Si tel était le cas, les niveaux circulants de certains stéroïdes pourront être associés à certaines caractéristiques clinico-pathologiques de la maladie. L'objectif était donc de dresser le profil hormonal le plus complet en circulation et d'étudier la relation entre les niveaux d'hormones stéroïdiennes, la présence d'un cancer de l'endomètre, et les caractéristiques clinico-pathologiques.

Dans le cadre de l'étude-pilote décrite précédemment et portant sur 110 femmes saines et 126 cas de cancer de l'endomètre, les échantillons sanguins ont été recueillis afin d'effectuer le dosage des stéroïdes en circulation par des méthodes analytiques de type GC-MS (*gas chromatography-mass spectrometry*) et HPLC-MS/MS établies et validées par notre groupe de recherche (Chapitre III) (Lépine et al. 2004; Labrie et al. 2006; Labrie et al. 2007). Par la suite, des analyses statistiques comprenant des régressions logistiques, des corrélations de Spearman et des ANCOVA ont été effectuées afin d'étudier la relation entre les niveaux d'hormones circulantes, la présence d'un cancer de l'endomètre, et les caractéristiques clinico-pathologiques de la maladie.

Les résultats obtenus indiquent que le profil hormonal circulant chez les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre est différent de celui des femmes saines, et que les œstrogènes en circulation sont associés à certaines caractéristiques clinico-pathologiques, dont la récurrence du cancer.

5.4 Variations génétiques des gènes de la stéroïdogénèse et évolution du cancer de la prostate

Dans un contexte où les marqueurs de susceptibilité au cancer de la prostate ne sont pas (ou peu) associés avec la progression de la maladie (**Tableau 7**), il était nécessaire d'examiner de nouveaux polymorphismes. Nous nous sommes concentrés sur les gènes de la stéroïdogénèse, puisque les androgènes, et peut-être les œstrogènes, sont impliqués dans la progression tumorale. L'hypothèse sous-jacente implique que si un variant génétique peut affecter l'activité d'un gène de la stéroïdogénèse, celui-ci pourrait modifier l'exposition hormonale des cellules tumorales et, par conséquent, potentiellement influencer l'évolution du cancer. Notre objectif était donc de tester l'association entre les polymorphismes de gènes candidats de la stéroïdogénèse et l'évolution du cancer de la prostate après prostatectomie radicale ou TPA.

Nous avons procédé à une étude systématique de la diversité génétique des polymorphismes des gènes d'intérêt dans notre population de découverte composée de 526 Caucasiens. Tous les patients étaient atteints d'un cancer de la prostate cliniquement localisé, avaient été traités par prostatectomie radicale, et avaient été recrutés par les uro-oncologues de l'Hôtel-Dieu de Québec. La variable à l'étude était la récurrence biochimique, basée sur les niveaux circulants d'APS (Amling et al. 2001; Nielsen et al. 2007). Trois critères de sélection ont été utilisés pour le choix des polymorphismes à génotyper : 1) que le polymorphisme soit décrit dans la littérature scientifique comme pouvant affecter l'activité du gène; 2) que le polymorphisme ait déjà été associé au cancer de la prostate; et 3) que le polymorphisme permette d'expliquer la majeure partie de la diversité haplotypique chez les Caucasiens. Cette dernière étape a été effectuée à l'aide de la base de données du consortium international HapMap et du logiciel Haploview (Stephens et al. 2001; The International HapMap Project 2003; Thorisson et al. 2005). Ces données nous ont permis de sélectionner tous les polymorphismes avec une fréquence $\geq 5\%$ et de faire

une sélection dite de *haplotype-tagging* SNP (htSNP). Cette méthode se base sur le fait que le génotypage d'un seul polymorphisme permet de déterminer, par inférence, le génotype des variations qui lui sont génétiquement liées. L'ADNg des patients a été purifié sur colonnes QIAGEN et le séquençage a été effectué principalement par spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*; MALDI_TOF) de Sequenom Inc. La relation entre les polymorphismes génotypés et la récurrence biochimique a été étudiée par des analyses de survie (Kaplan-Meier, test du log-rank et régression de Cox). La relation avec d'autres caractéristiques clinico-pathologiques a été explorée par des tests de χ^2 de Pearson et de régression logistique.

Si une association avec la récurrence biochimique était significative ($p \leq 0.05$) chez la population de découverte, ou s'il semblait y avoir une tendance ($p \leq 0.15$), le polymorphisme d'intérêt était génotypé chez l'une des 3 autres populations disponibles. La première population était composée de 320 Asiatiques atteints d'un cancer cliniquement localisé et tous traités par prostatectomie radicale. Cette cohorte avait été développée par nos collaborateurs de Taïwan et permettait d'étudier la relation entre un polymorphisme et la récurrence biochimique dans une cohorte de cas de cancer à un stade similaire à ceux de la cohorte de découverte, mais avec un bagage génétique potentiellement différent (Caucasiens vs Asiatiques). La deuxième cohorte était constituée de 213 Caucaasiens atteints d'un cancer de la prostate localement avancé, tous traités par prostatectomie radicale. Cette population permettait d'étudier la relation entre un SNP et la progression de la maladie dans un contexte de cancer avancé (métastases ganglionnaires). Cette cohorte a été recrutée par les uro-oncologues de l'Hôtel-Dieu de Québec. La dernière cohorte était composée de 601 Asiatiques atteints d'un cancer avancé et sous TPA, tous recrutés par nos collaborateurs de Taïwan. Cette cohorte permettait notamment d'étudier l'association entre les variations génétiques et la survie au cancer de la prostate.

Les premiers gènes ciblés dans le cadre de cette thèse sont ceux codant pour les 5 α -réductases de types 1 et 2, *SRD5A1* et *SRD5A2*, puisque ces enzymes sont nécessaires à la synthèse de la DHT (Chapitre V). Plusieurs SNP *SRD5A* sont associés à une récurrence

biochimique chez la population de 526 Caucasiens et chez celle de 320 Asiatiques, donc dans un contexte de cancer cliniquement localisé.

La deuxième voie étudiée est celle de la glucuronidation effectuée par les enzymes UGT, notamment par le biais de délétions des gènes *UGT2B17* et *UGT2B28* (Chapitre VI), deux enzymes qui participent à l'inactivation et à l'élimination des androgènes dans différents tissus, incluant la prostate. Nous avons montré que la présence de ces délétions est associée à une augmentation du risque de récurrence chez la cohorte de découverte ainsi que chez la cohorte de 320 Asiatiques, donc dans un contexte de cancer cliniquement localisé.

Par la suite, 6 gènes-candidats de la famille HSD17B (*HSD17B1*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *HSD17B4*, *AKR1C3* [*HSD17B5*], *HSD17B12*), impliqués dans l'interconversion des hormones stéroïdiennes, ont été criblés (Chapitre VII). Parmi les 88 variations génétiques testées, douze SNP se sont avérés être associés à un risque altéré de récurrence biochimique chez la population de 526 Caucasiens. De plus, 4 polymorphismes de *HSD17B2* se sont avérés être associés à une modification du risque de progression de la maladie avancée et de la survie chez la population de 213 Caucasiens.

Enfin, 43 polymorphismes de 12 gènes-candidats, également impliqués dans la stéroïdogénèse, ont été génotypés chez la cohorte de 601 Asiatiques traités par TPA (Chapitre VIII). Nous avons pu montrer que cinq de ces SNP sont associés à la survie au cancer de la prostate et sont localisés au sein de *CYP19A1*, *CYP17A1*, *ESR1*, *HSD17B2* et *HSD17B3*.

Les résultats présentés aux Chapitres V à VIII indiquent que le profil génétique du patient influence l'évolution du cancer de la prostate après une prostatectomie radicale ou une TPA.

CHAPITRE II. Association des œstrogènes en circulation à l'expression des gènes de synthèse et de métabolisme des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre

Résumé

Association des œstrogènes en circulation à l'expression des gènes de synthèse et de métabolisme des hormones stéroïdiennes dans le cancer de l'endomètre

Johanie Lépine*, Étienne Audet-Walsh*, Jean Grégoire, Bernard Têtu, Marie Plante, Vincent Ménard, Pierre Ayotte, Jacques Brisson, Patrick Caron, Lyne Villeneuve, Alain Bélanger et Chantal Guillemette.

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente.

Contexte. Le cancer de l'endomètre est le néoplasme gynécologique le plus fréquent, et son développement est associé à une surexposition aux œstrogènes. Cette maladie apparaît principalement après la ménopause, lorsque les ovaires ont cessé de produire des quantités appréciables d'œstrogènes. À ce stade, c'est par la conversion des précurseurs surrenaliens en hormones actives que les tissus périphériques s'approvisionnent en œstradiol (E_2), en œstrone (E_1) et en sulfate d' E_1 (E_1 -S).

Matériel et Méthodes. Nous avons mesuré les œstrogènes en circulation par des méthodes analytiques de détection par spectrométrie de masse pour vérifier si les niveaux différaient chez des femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre ($n=126$) comparativement à des femmes saines ($n=110$). Au moyen du PCR quantitatif en temps réel, nous avons ensuite évalué si le profil d'expression de 19 gènes de la stéroïdogénèse était modifié dans l'endomètre tumoral ($n=49$) en comparaison avec l'endomètre péri-tumoral ($n=36$).

Résultats. Les niveaux d' E_2 , d' E_1 et d' E_1 -S sont significativement plus élevés dans les cas de cancer de l'endomètre que chez les femmes saines. En accord avec les niveaux sériques, les mesures d'expression favorisent l'hypothèse qu'il y a une augmentation de la biosynthèse de l' E_2 dans les tumeurs. En effet, les enzymes associées à la synthèse de l' E_2 [E_1 -S (sulfatase) $\rightarrow E_1$ (17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase) $\rightarrow E_2$] sont surexprimées chez les tumeurs. De plus, l'une des voies du métabolisme des œstrogènes, la voie des enzymes UDP-glucuronosyltransférases, est aussi augmentée significativement dans le tissu tumoral par rapport au tissu péri-tumoral.

Conclusion. Des niveaux élevés d'œstrogènes circulants chez les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre sont associés à un déséquilibre des enzymes de la synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdiennes dans les tumeurs endométriales.

J Clin Endocrinol Metab 95 : 2689-2698, 2010

Facteur d'impact 2010 : 6.495

Circulating estrogens in endometrial cancer cases and their relationship with tissular expression of key estrogen biosynthesis and metabolic pathways.

Johanie Lépine^{1*}, Etienne Audet-Walsh^{1*}, Jean Grégoire², Bernard Têtu³, Marie Plante², Vincent Ménard¹, Pierre Ayotte⁴, Jacques Brisson⁴, Patrick Caron¹, Lyne Villeneuve¹, Alain Bélanger⁵ and Chantal Guillemette^{1,6}

*These authors contributed equally

¹Centre hospitalier universitaire de Québec (CHUQ) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada. ²Gynecologic Oncology Service, CHUQ, and Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ³Department of Pathology, CHUQ and Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ⁴Department of Social and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ⁵CHUQ Research Center and Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ⁶Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Short title: Profiling of estrogens in endometrial cancer

Author to whom correspondence should be sent: Chantal Guillemette, Ph.D., Canada Research Chair in Pharmacogenomics, Laboratory of Pharmacogenomics, CHUQ Research Center, T3-67, 2705 Boulevard Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2, Tel. (418) 654-2296, Fax. (418) 654-2761. E-mail: Chantal.Guillemette@crchul.ulaval.ca

Higher levels of circulating estrogens in women with endometrial cancer are likely associated to an imbalance of multiple biotransformation pathways in endometrial tumor tissues.

Key words: Endometrial cancer, estrogens, estradiol synthesis and metabolism, tissue expression

Footnotes: This work was supported by the Canada Research Chair in Pharmacogenomics (C.G.) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-68964). J.L. and E.A.W. are recipients of the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award from CIHR. V.M. was supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

The abbreviations used are:

17 β -HSD; 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 2/4-MeO; 2/4-methoxy, 2/4-OH; 2/4-hydroxy, AR; androgen receptor, CE; catecholestrogen, COMT; catechol-O-methyltransferase, CYP; cytochromes P450, CYP19; aromatase, DHT; dihydrotestosterone, E₁; estrone, E₂; estradiol, ER; estrogen receptor, -G; glucuronides, qPCR; quantitative real-time PCR, -S; sulfate, SULT; sulfotransferase, UGT; uridine-diphospho-glucuronosyltransferase.

Abstract

Background: Endometrial cancer is the most common gynaecological malignancy. Estrogen exposure is strongly associated to endometrial cancer. While this cancer occurs predominantly in postmenopausal women lacking estrogen production by ovaries, the conversion of adrenal androgen-estrogen precursors to estradiol (E_2), estrone (E_1) and its sulfate (E_1 -S) has been well documented in peripheral tissues.

Experimental Design: We initially explored whether circulating levels of estrogens, measured by validated mass spectrometry assays, differ in women with endometrial cancer (n=126) compared to healthy women (n=110). We then evaluated by quantitative real-time PCR from purified RNA whether the expression profile of 19 estrogen-related synthesis and metabolic genes is modified in peritumoral normal endometrium (n=36) compared to tumoral (n=49) tissues.

Results: In endometrial cancer cases, circulating levels of E_1 , E_2 and E_1 -S were significantly higher compared to unaffected controls. In agreement with plasma levels, findings support an enhanced biosynthesis of E_2 in tumors. The expression of E_2 biosynthesis pathways (E_1 -S (sulfatase) \rightarrow E_1 (17β -hydroxysteroid dehydrogenase) \rightarrow E_2) was shown to predominate in peritumoral normal endometrium and was significantly increased in tumors. In addition, the inactivation pathways mediated by several UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) were also enhanced in endometrial tumors compared to peritumoral normal endometrium.

Conclusion: We concluded that the higher levels of circulating estrogens in women with endometrial cancer are likely associated to an imbalance of multiple biotransformation pathways in endometrial tumor tissues.

Introduction

Estrogens, namely estradiol (E_2) and its precursor estrone (E_1), exert mitotic action in uterine cells. Chronic exposure to high levels of both exogenous and endogenous estrogens is a potent risk factor for development of human endometrial cancer (Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). For example, Lukanova *et al.* demonstrated that postmenopausal women in the highest quartiles of plasmatic E_2 and E_1 levels have an increased risk of endometrial cancer by 4.1-fold and 3.7-fold, respectively (Lukanova, Lundin et al. 2004). Zeleniuch-Jacquotte *et al.* reported similar results by showing 2.4- and 3.9-fold increased risk in the E_2 and E_1 highest tertiles, respectively (Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001).

Differences in epidemiology and prognosis indicate that two types of endometrial cancer exist: those related to and those unrelated to estrogen stimulation (Bokhman 1983). Type I endometrioid carcinoma is estrogen-related (80% of cases), associated with atypical endometrial hyperplasia, usually low grade, and has a good prognosis. By opposition, type II non-endometrioid cancer appears unrelated to estrogen stimulation (20% of cases), characterized by papillary serous or clear cell tumors, usually high grade, and has a poor prognosis (Bokhman 1983). Furthermore, it is also documented that women with endometrial cancer present higher estrogen levels in circulation compared to healthy postmenopausal women (Potischman, Hoover et al. 1996; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). Nyholm *et al.* shown that levels of E_2 and E_1 are significantly higher in women with uterine cancer (1.4- and 1.5-fold, respectively) (Nyholm, Nielsen et al. 1993).

Endometrial cancer predominantly occurs in postmenopausal women thus indicating that, in absence of ovarian estrogen synthesis, the contribution of several extra-ovarian tissues to circulating estrogens pool become of major importance. The conversion of androgen-estrogen adrenal precursors, namely dehydroepiandrosterone and androstenedione, to E_2 , E_1 and E_1 -S has been well documented in peripheral tissues, and relies on the interaction of a complex network of enzymes. *In vitro* and *in vivo* data also suggest that androgens may have, through the binding to androgen receptor (AR), a neutral or inhibitory effect on endometrial cell proliferation (Tuckerman, Okon et al. 2000; Zang, Sahlin et al. 2007). In addition to the production of estrogen from adrenal steroids, estrogen can also be formed from conjugate estrogens such as E_1 -S. The sulfatase enzyme, which produces E_1 from high circulating E_1 -S metabolite, also contributes significantly to estrogen synthesis in malignant endometrium (Utsunomiya, Ito et al. 2004). Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase members (17β -HSDs), which convert E_2 to E_1 and vice-versa, was also demonstrated in endometrial tissues (Husen, Psonka et al. 2000; Utsunomiya, Suzuki et al. 2001; Luu-The, Tremblay et al. 2006). Concurrently, several enzymes are implicated in endometrial estrogen metabolism and several independent studies investigated their expression levels between normal and cancerous endometrial tissues. Parent estrogens, E_2 and E_1 , can be hydroxylated by cytochrome P450 members (CYPs). In endometrium, CYP1B1 specifically converts E_2 to 4-hydroxy-catecholestrogens (4-OHCEs) while CYP1A1 forms 2-hydroxy-catecholestrogens (2-OHCEs) (Vadlamuri, Glover et al. 1998; Lee, Cai et al. 2003; Sasaki, Kaneuchi et al. 2003). The metabolic conversion of estrogens by CYP enzymes confers additional biological functions to

estrogen metabolites. Depurinating adducts formed from carcinogenic 4-OHCEs generate mutations that might be implicated in cancer initiation (Liehr, Ricci et al. 1995; Cavalieri, Stack et al. 1997). In contrast, 2-OHCEs lack carcinogenic potency (Cavalieri, Stack et al. 1997). Parent estrogens and their hydroxylated metabolites can be further methylated by catechol-*O*-methyltransferase (COMT) or sulphated by sulfotransferases (SULTs) (Falany, Azziz et al. 1998; Smuc, Ruprecht et al. 2006; Bai, Shim et al. 2007). The metabolic *O*-methylation of 2-OHCEs *in vivo* leads to the anti-proliferative, anti-angiogenic and pro-apoptotic 2-methoxy-E₂ (2-MeOE₂) (D'Amato, Lin et al. 1994; Lakhani, Sarkar et al. 2003). By contrast, glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), confers no activity to sex-steroids but rather adds a polar group to help their elimination. This pathway thus represents an important class of enzymes that inactivate and thus facilitate the elimination of parent estrogens, as well as their hydroxylated and methylated metabolites (Guillemette 2003; Guillemette, Belanger et al. 2004; Lepine, Bernard et al. 2004). An exhaustive functional analysis concerning all UGT1A and UGT2B members demonstrated that UGT1A1, UGT1A3, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10 and UGT2B7 are the major enzymes in glucuronidation of parent estrogens and their derivatives (Lepine, Bernard et al. 2004). Moreover, the expression of UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7 and UGT2B15 in endometrium of healthy postmenopausal women was previously demonstrated (Levesque, Beaulieu et al. 1997; Duguay, McGrath et al. 2004; Lepine, Bernard et al. 2004; Thibaudeau, Lepine et al. 2006). Besides UGT2B7, that also glucuronidates androgens, other UGT2Bs are involved in the conjugation of estrogens and their androgenic precursors (Turgeon, Carrier et al. 2001). UGT2B15 may conjugate

estrogens but metabolizes mainly androgens, while UGT2B17 conjugates especially androgens (Green, Oturu et al. 1994; Turgeon, Carrier et al. 2001).

As aforementioned, several studies support the major role of enzymes in estrogen synthesis and metabolism in the etiology of endometrial cancer. It is further supported by the distinctive roles of E₂ and its metabolites (Liehr, Ricci et al. 1995; Cavalieri, Stack et al. 1997; Liehr 2000; Lakhani, Sarkar et al. 2003). However, the quantitative expression level of each of these pathways in the same endometrial samples, together with the comparison of expression levels between non-malignant and adjacent tumor tissues, has not been documented yet. This is of crucial importance to firstly establish predominant enzymes in normal tissue and examine whether those are altered, or whether they affect hormone profile in malignant tissues. Intratumoral changes in steroid hormones synthesis and metabolism could well contribute, directly or indirectly, to variations observed in circulating hormones but has still to be established. This could greatly improve our capacity to discover a potential biomarker of endometrial cancer as well as to help better understand the underlying tumorigenesis changes in the endometrium.

We firstly aimed to perform a comparative study between healthy and postmenopausal women diagnosed for endometrial cancer, and without hormone replacement therapy, for their estrogen plasma levels. Thereafter, we sought to compare the *in situ* expression of 19 enzymes involved in estrogen biosynthesis and metabolism between normal endometrium tissues, from healthy and cancer-suffering women (peritumoral normal tissues), and endometrial tumor tissues by quantitative real-time PCR (qPCR). Data support that levels

of circulating sex-steroids in women with endometrial cancer are likely to be associated to an imbalance of multiple biotransformation pathways in endometrial tumor tissues.

Experimental procedures

Serum collection and measure of estrogens- Serum samples were obtained from n=110 healthy women as previously described (Sandanger, Sinotte et al. 2007). For women with endometrial cancer (n=126), blood was collected the morning of hysterectomy. All women have postmenopausal status and they did not receive any hormone replacement therapy for at least three weeks and they had no menstrual bleeding for at least one year. Also, they have no history of ovarian or breast cancers. All subjects provided written consent for use of their specimens and the present study was reviewed and approved by Institutional Review Boards (Hôtel-Dieu de Québec, Hôpital Saint-Sacrement, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ) and Laval University). Demographic and anthropometric data as well as information on tissues' availability, clinical and histological characteristics of the tumor were collected. Blood collections were done in BD vacutainer SST gel & clot activator sampling tubes (BD, Franklin Lakes, NJ), deposited on ice and centrifuged at 2800 g for 10 minutes within 24 hours. Aliquots were next prepared and transferred to a freezer at -80°C until dosage. The serum steroid levels were measured by established and validated methods as previously described (Labrie, Belanger et al. 2007), namely gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) for E₁ and E₂ and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for E₁-S. Lowest limits of quantification for E₁, E₂ and E₁-S were of 8 pg/ml, 2 pg/ml and 75 pg/ml, respectively. Coefficients of variation for intra- and interassays for these methods were ≤ 10.0% and accuracies for E₁, E₂ and E₁-S were 93.5%, 91.2% and 102.7%, respectively.

Tissue collection- Uterine tissues were obtained from healthy post-menopausal women who had a hysterectomy surgery for benign indications (n=7) and from women with

endometrial cancer. For endometrial cancer cases, peritumoral normal tissues (n=36) and tumoral tissues (n=49) were collected for analysis and for 31 cases both peritumoral and tumoral tissues were available (31 paired peritumoral-tumoral tissues). Tissues were collected by pathologists and deposited in liquid nitrogen within 30 minutes of hysterectomy surgery prior freezing at -80°C until further analyses.

RNA extraction, DNase treatment and cDNA synthesis- Approximately 100 mg of frozen tissues were homogenised in 1 ml of Tri-Reagent® followed by RNA extraction as specified by the supplier (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Total RNA was resuspended in RNAssecure resuspension solution (Ambion, Austin, TX) and heated to 60°C for 10 minutes. RNA samples were subjected to Turbo DNase treatment (Ambion) and, to certify the quality and the integrity (RNA integrity number [RIN]) of RNA, samples were analyzed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Mississauga, ON, Canada). 3µg of total RNA were further subjected to cDNA synthesis reaction using RNA certified DNA-free and 200 units of SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

qPCR for estrogen synthesis and metabolic pathways- Specific exon-exon primer strategies were designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Primer sequences are provided in Supplemental data). Expression levels were normalized for r18S content. All cDNAs were run in triplicate and amplified in a 15µL reaction containing 7.5µL of 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10nM of Z-tailed forward primer, 100nM of reverse primer, 250nM of Amplifluor Uniprimer probe (Chemicon, Temecula, California) and 1µL of cDNA target (50ng). The mixture was incubated at 50°C for 2 min, at 95°C for 4 min, and then cycled 55 times at 95°C for 15 sec and at 55°C for

30 sec using the Applied Biosystems Prism 7900 Sequence Detector. Amplicons were detected using the Amplifluor UniPrimer system where forward primers used contained a 5' Z-sequence: ACT-GAA-CCT-GAC-CGT-ACA. All data were processed using the Delta Rn method which permits to compare the expression level of distinct genes. Briefly, the delta Ct (ΔCt), meaning the Ct of the studied gene minus the Ct of its corresponding housekeeping gene (r18S), was first calculated. Next, the delta-delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) was determined, which represents the difference between the ΔCt of the sample minus the ΔCt of the lowest expressing sample for the same gene. Finally, the relative expression level was assessed with this formula: $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$.

For the quantification of highly homologous UGT gene products, specific exon-exon primer strategies were designed for each UGT, using multiple UGT alignments, and expression levels were also normalized for r18S content (Primer sequences are provided in Supplemental data). Amplification efficiencies were validated prior to analyses and amplicons were sequenced to confirm specificity. We selected strategies with amplification efficiencies ranging from 90% to 100% in human endometrial tissues as determined using serial dilutions of cDNA (1:1 to 1:1000, v/v). For every qPCR reactions, which were done in triplicate, 50ng of cDNA was mixed in a 20 μL reaction solution, containing 125 to 300nM of each set of primers and 1X SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). The absolute quantification of samples was determined using the ABI Prism 7000 SDS v1.1 technology (Applied Biosystems). Comparison between expression levels of UGT gene products and other pathways was not done due to the use of distinct methods. PCR cycles were as follow: 10 minutes at 95°C and 42 repeats of 15 seconds at 95°C and 1 minute at the annealing temperature. Dissociation protocol (20 minutes from 60

to 95°C) was also included to assess the possibility of primers dimerization or multiple genes amplification. A threshold of 0.2 (Delta Rn) was chosen for all UGTs in order to compare their expression levels. All data were processed using the Delta Rn method described above.

Statistical analyses- Comparisons for demographic characteristics and hormonal levels were performed using SAS software (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC). Demographic characteristics (age and BMI) were compared between cases and controls using two-sample t test (unpaired). These variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Hormonal variables were logarithmically transformed (base-10) to achieve normal distributions, but only untransformed data are shown. Analysis of covariance (ANCOVA) was performed to compare means of each \log_{10} -transformed hormonal variable between 2 groups adjusting for age and BMI. All P values are two-sided and a $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

For qPCR data and hormonal correlations, statistical analyses were done using JMP 4.0.2 academic version program (SAS Institute Inc). The distribution of each set of data was first determined using the Shapiro-Wilk W Test and data were considered normally distributed with a P value ($\text{Prob} < W$) ≥ 0.05 . As untransformed data were not normally distributed, they were sequentially converted to \log_{10} and, if still not normally distributed, subjected to Box-Cox Y transformation. Once normal distribution was achieved, parametric analyses were applied. When data did not reach normal distribution following these transformations, nonparametric analyses were done on untransformed data. For parametric analyses, a two-tailed Student's t test was done with significant P value ($\text{Prob} > |t|$) ≤ 0.05 . For nonparametric analyses, a Wilcoxon/Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums) was done with

significant P value ($\text{Prob}>|Z| \leq 0.05$). For correlation analysis, a nonparametric Spearman's Correlation Test was done with significant P value ($\text{Prob}>|\text{Rho}| \leq 0.05$).

Results

Levels of estrogens in circulation of postmenopausal women with endometrial cancer and healthy women- Characteristics of postmenopausal women who had a hysterectomy for endometrial cancer (cases=126) and healthy women (controls=110) are presented in **Table 1**. Age and BMI distributions were significantly different between groups (Age: Cases, 66 yr; Controls, 58 yr; $P<0.0001$ and BMI: Cases, 30 kg/m^2 ; Controls, 27 kg/m^2 ; $P=0.003$, **Table 1**). Further statistical analyses of circulating levels were systematically corrected for age and BMI.

Circulating estrogens were significantly higher in cases compare to healthy postmenopausal women for E_2 : $13.75 \pm 27.90 \text{ pg/ml}$ compare to $5.86 \pm 10.50 \text{ pg/ml}$, for E_1 : $44.73 \pm 31.94 \text{ pg/ml}$ compare to $21.14 \pm 12.55 \text{ pg/ml}$, and for $E_1\text{-S}$: $0.63 \pm 0.70 \text{ ng/ml}$ compare to $0.25 \pm 0.30 \text{ ng/ml}$ (Adjusted $P<0.0001$; **Table 2**). In addition, endometrial cancer cases had higher median E_2 , E_1 and $E_1\text{-S}$ levels than controls (7.03 vs 3.35 pg/ml , 33.66 vs 18.36 pg/ml and 0.42 vs 0.17 ng/ml , respectively) (data not shown).

The correlations between E_2 , E_1 and $E_1\text{-S}$ with BMI were 0.39, 0.26 and 0.17, respectively, for control women ($P<0.0001$, $P=0.007$ and 0.07, respectively) and these correlations were higher for cases at 0.67, 0.56 and 0.42, respectively ($P<0.0001$ for all) (data not shown).

Expression profile of key estrogen biosynthesis and metabolism pathways in healthy endometrium.- The relative expression levels were first studied in normal ($n=7$) and peritumoral normal ($n=36$) tissues by qPCR to establish similar pattern of expression. No significant difference ($P>0.05$) in the relative gene expression levels in normal endometrium tissues (from controls) compared to peritumoral normal endometrium tissues

(from cases) was observed. Then, expression levels were compared between tumor (n=49) and peritumoral normal endometrium (n=36) tissues for 19 gene products.

Estrogen synthesis: Expression levels of biosynthesis pathways converting E_1 to E_2 (17 β -HSDs types 1, 7 and 12), E_2 to E_1 (17 β -HSD type 2), androgens into estrogens (CYP19 or aromatase), E_1 -S to E_1 (sulfatase) and E_1/E_2 to E_1/E_2 -S (SULT1A1 and SULT1E1) were assessed and varied largely between normal samples. In peritumoral normal tissues (**Fig.1 and 2; Table 3**), 17 β -HSD type 12 was the most abundant followed by 17 β -HSD type 7 and sulfatase whereas SULT1A1, 17 β -HSD type 2, 17 β -HSD type 1, CYP19 and SULT1E1 were considerably less expressed. Data indicate that pathways leading to E_2 formation from E_1 -S and E_1 are predominant in peritumoral normal tissues while the conversion of androgens to estrogens by CYP19 would be relatively limited (**Fig. 1a**).

Estrogen metabolic pathways – The pathways investigated included CYP1A1 and COMT, leading to formation of protective metabolites (E_1/E_2 to 2-OHE $_1/E_2$ to 2-MeOE), and CYP1B1, leading to formation of carcinogenic metabolites (E_1/E_2 to 4-OHE $_1/E_2$). Of those, CYP1B1 and COMT were the most abundant mRNAs in peritumoral normal tissues while CYP1A1 was considerably less expressed (**Table 3**). Data support the preferential formation of 4-OHCEs over 2-OHCEs in peritumoral normal tissues (**Fig. 1b**).

UGT inactivating pathways - Androgens inactivating UGTs (UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17), E_1/E_2 inactivating UGTs (UGT1A1, UGT1A3 and UGT1A10) as well as UGTs inactivating protective (UGT1A1) and carcinogenic (UGT2B7, UGT1A8 and UGT1A9) metabolites were measured in peritumoral normal tissues. Of all UGTs involved in androgens and estrogens metabolism, UGT2B7 was by far the most abundant compared to other UGTs also present, namely UGT2B17, UGT1A1, UGT1A3 and UGT2B15

whereas UGT1A8, UGT1A9 and UGT1A10 were barely detectable (≤ 10 relative units). Data indicate that inactivation of androgens, by UGT2B7 and UGT2B17, and 4-OHCEs, by UGT2B7, prevail in peritumoral normal tissues. Glucuronidation of E_2 and its protective metabolites is also present (**Fig. 1**).

Imbalance of key estrogen biosynthesis and metabolism pathways in endometrial tumors.

Estrogen synthesis - Although 17β -HSD type 12 converting E_1 to E_2 was already highly expressed in healthy tissues, its expression was further increased in tumor compared to peritumoral normal tissues by 1.6-fold ($P=0.002$; **Table 3** and **Fig. 2a**). This pathway was also highly expressed in tumors of type I (1.8-fold; $P\leq 0.0001$; **Table 3**), compared to corresponding peritumoral normal tissues. Data suggest that *in situ* biosynthesis of E_2 is increased in tumors compared to peritumoral normal endometrium tissues (**Fig. 1a**).

Several other biosynthesis pathways were differentially expressed in tumors. While 17β -HSD type 1 (E_1 to E_2) was significantly reduced, sulfatase (E_1 -S to E_1 ; **Fig. 2b**) as well as 17β -HSD type 2 (E_2 to E_1) and SULT1A1 (E_1 to E_1 -S) were higher in tumors compared to peritumoral normal tissues ($P\leq 0.05$). The observed changes were more important in endometriod type I tumors for sulfatase and type II tumors for 17β -HSD types 1 and 2 (**Fig. 1a** and **Table 3**). When statistical analyses were restricted to women for whom both peritumoral normal and the corresponding tumoral tissue were available ($n=31$), results were similar and this is valid for all pathways described herein and below.

Estrogen metabolic pathways - The expression levels of COMT (1.6-fold, $P\leq 0.001$, **Fig. 2d**) and the barely detectable CYP1A1 (6.4-fold, $P\leq 0.05$) were higher in tumors compared to peritumoral normal tissues (**Fig. 1b** and **Table 3**). As for CYP1B1 (E_1/E_2 to 4-OH E_1/E_2), which is highly abundant in peritumoral normal tissues, its expression was significantly

decreased in tumors (3.0-fold, $P \leq 0.0001$; **Fig. 2c**) and this reduction was more remarkable in type II tumors (6.9-fold; $P \leq 0.0001$; **Table 3**). Data suggest a reduced synthesis of 4-OHE₁/E₂ metabolites in tumors compared to peritumoral normal tissues (**Fig. 1b**).

UGT inactivating pathways - Overexpression of UGT2B7 in tumors (3.2-fold, $P=0.003$; **Fig. 2e**), UGT1A1 (1.3-fold, $P=0.007$), UGT1A3 (6.4-fold, $P=0.002$), and more considerably the expression of UGT2B15 (15.6-fold, $P \leq 0.0001$, **Fig. 2f**) was observed in both type carcinomas compared to peritumoral normal tissues (**Fig. 1b** and **Table 3**). Data suggest an enhance inactivation of steroid hormones by UGTs in tumors compare to peritumoral normal tissues (**Fig. 1**).

Discussion

It is well accepted that estrogens, together with progesterone, control uterine endometrial cell proliferation. Indeed, results from previous clinical and epidemiological studies indicated that prolonged and/or excessive exposure to estrogen-only therapy increase risk of endometrial carcinoma (Blake 2006). On the other hand, the majority of such carcinomas occur during the postmenopausal period, when the ovaries cease to produce active sexual steroids. This illustrates a complex but fundamental role for *in situ* estrogen biosynthesis and metabolism in the development of estrogen-dependent cancers, and it remains highly relevant to investigate intra- and peritumoral enzymes involved in such pathways.

According to our results, endometrial cancer patients demonstrated higher E₁, E₂ and E₁-S plasma levels. Considering that excess weight in postmenopausal women has also been associated with increased levels of E₁ and E₂ (Nyholm, Nielsen et al. 1993; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008), we corrected for difference in BMI without loss of significance. Additional data reported in a study of 75 healthy postmenopausal Caucasian women, recruited in the same geographical region and not receiving hormone replacement therapy (as those studied herein), confirm the observed hormone concentrations in the cohort of 110 healthy women (baseline E₂, 3.5 pg/ml; E₁, 17.6 pg/ml and E₁-S, 0.23 ng/ml) (Labrie, Belanger et al. 2007). Other studies also confirmed the increase of estrogens in postmenopausal women with endometrial cancer (Nyholm, Nielsen et al. 1993; Potischman, Hoover et al. 1996; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen,

Key et al. 2008), suggesting that elevated estrogen in circulation would arise, at least in part, from the tumor site. Expression profiles of 19 estrogen-related synthesis and metabolic genes in endometrial peritumoral normal and tumoral tissues support that an imbalance in their expression levels might be responsible for higher plasma levels of estrogens in cancer patients.

In peritumoral normal endometrium samples, the expression of E_2 biosynthesis enzymes predominates. Indeed, peritumoral normal tissues express high levels of 17 β -HSD types 12 and 7 mRNA (E_1 to E_2 conversion). Recently, it was suggested that the 17 β -HSD type 12 might be the major estrogenic 17 β -HSD responsible for the conversion of E_1 to E_2 in women because it is more abundantly expressed than types 7 and 1 in the mammary gland, ovaries and uterus (Luu-The, Tremblay et al. 2006). Our results also suggest that the contribution of 17 β -HSD type 1 (E_1 to E_2) and 17 β -HSD type 2 (E_2 to E_1) would be of minor importance because of their very low expression levels. In addition, the sulfatase enzyme (E_1 -S to E_1) is also highly expressed compared to SULT1A1 and SULT1E1 (E_1 to E_1 -S) in peritumoral normal tissues, favoring the transformation of E_1 -S in E_1 and then to potent E_2 .

Our findings suggest that additional E_2 is synthesized locally in tumors with highest expression of 17 β -HSD type 12 (E_1 to E_2) compared to peritumoral normal tissues. Song *et al.* observed higher number of positive tissues expressing 17 β -HSD type 12 in breast cancer cases (83%) compared to normal cases (37%) following immunocytochemical studies (Song, Liu et al. 2006). Our results show that 17 β -HSD type 2, which catalyzes the

opposite reaction (E_2 to E_1), is also more expressed in tumors. However, the relative expression level of 17 β -HSD type 12 is more than 85-fold higher than 17 β -HSD type 2. This largely counteracts the fact that the affinity of 17 β -HSD type 2 for E_2 (0.21 μ M) is better than 17 β -HSD type 12 for E_1 (3.5 μ M) (Wu, Einstein et al. 1993; Luu-The, Tremblay et al. 2006). The sulfatase enzyme, which hydrolyzes biologically inactive circulating E_1 -S to E_1 , is also overexpressed in tumors whereas the SULT1A1 and SULT1E1 enzymes, converting E_1 to E_1 -S, are weakly expressed in endometrial samples. This is in line with the results of Utsunomiya *et al.* who demonstrated by immunohistochemistry that the proportion of sulfatase-positive tissues (86%) is higher than the sulfotransferase-positive tissues (29%) in tumors (Utsunomiya, Ito et al. 2004). Finally, another group established that *in situ* concentration of E_2 is increased in uterine tumor tissues (Berstein, Tchernobrovkina et al. 2003). Consequently, increased 17 β -HSD 12 and sulfatase gene expression in tumoral site would likely conduct to elevated E_1 and E_2 levels *in situ*.

We detected relatively limited expression of CYP19 in peritumoral normal and cancerous endometrium. CYP19 is a key enzyme in the estrogen biosynthesis that converts 4-dione and testosterone androgens into estrogens. It is preferentially expressed in gonads, but also in skin, fat, muscle and liver. Our data agree with previous studies demonstrating that endometrial tissues from disease-free women were negative for aromatase expression and activity (Bulun, Imir et al. 2005; Velasco, Rueda et al. 2006). However, increased amount of aromatase was reported in pathological tissues, such as breast and endometrial cancer (Watanabe, Sasano et al. 1995; Sasano and Harada 1998). With the high expression of

estrogen sulfatase, the contribution of circulating E₁-S seems to become very important in estrogen availability in the tissue.

Besides to estrogen biosynthesis enzymes, conjugating enzymes such as UGTs also contribute to modulation of estrogen availability *in situ* and elimination of biologically active E₂ derivatives, such as 4-OHCEs and 2-MeOE₂. All UGTs tested were differentially transcribed in peritumoral normal endometrium. Estrogens metabolizing UGT1A1 and UGT1A3 were also expressed (Williams, Ring et al. 2002; Lepine, Bernard et al. 2004; Caillier, Lepine et al. 2007). UGT2B7, that conjugates androgens but also estrogens, had the highest expression level followed by UGT2B17 and UGT2B15 that are specific to androgens (Green, Oturu et al. 1994; Turgeon, Carrier et al. 2001; Lepine, Bernard et al. 2004; Thibaudeau, Lepine et al. 2006). UGT2B7 is the enzyme that demonstrates the highest reactivity against genotoxic 4-OHCEs, and it is expected to be specifically responsible for the elimination of these derivatives in human endometrium (Lepine, Bernard et al. 2004; Thibaudeau, Lepine et al. 2006). Indeed, the 4-OHCE metabolites are associated with tumor initiation through the formation of unstable depurinating adducts to DNA and they can undergo redox-cycling (Liehr, Ricci et al. 1995; Cavalieri, Stack et al. 1997). CYP1B1 is responsible for the formation of 4-OH estrogens in human endometrium and UGT2B7 for its elimination. Our results demonstrated that CYP1B1 is decreased in tumors tissues. This reveals that the formation of 4-OHCEs in endometrial carcinomas may be lower, due to decreased expression of CYP1B1, and a more efficient elimination by overexpressed UGT2B7 in tumors. However, this does not exclude a role for the carcinogenic compounds 4-OHCEs in the early stages of endometrial cancer development.

In opposition to 4-OHCEs, 2-OHCEs, formed primarily by CYP1A1, lack carcinogenic potential while 2-MeOE₂ is proposed to acquire antiproliferative and antiangiogenic functions following *O*-methylation by COMT (D'Amato, Lin et al. 1994; Cavalieri, Stack et al. 1997; Lakhani, Sarkar et al. 2003; Lee, Cai et al. 2003). Our results showed that CYP1A1 and COMT pathways are more expressed in cancerous tissues. On the other hand, UGT1A1 and UGT1A3, that inactivate 2-OHCEs and 2-MeOE₂, are overexpressed in tumors and might prevent the accumulation of such protective metabolites (D'Amato, Lin et al. 1994; Lakhani, Sarkar et al. 2003; Lepine, Bernard et al. 2004). Expression data also support that UGT1A1 and UGT1A3 would be the major enzymes involved in E₁, E₂ and 2-MeOE₂ conjugation since UGT1A10 is practically not expressed (Williams, Ring et al. 2002; Duguay, McGrath et al. 2004; Lepine, Bernard et al. 2004; Caillier, Lepine et al. 2007). In summary, results suggest that in normal endometrium, UGT2B7 conjugates 4-OHCEs, UGT1A1 and UGT1A3 conjugate E₂, E₁, 2-OHCEs and 2-MeOE₂ while UGT2Bs conjugate androgens.

Androgens may be glucuronidated by conjugating enzymes UGT2B7, UGT2B17 and UGT2B15 (Green, Oturu et al. 1994; Turgeon, Carrier et al. 2001), which are expressed in endometrium samples as established here. The expression of AR and 5 α -reductases, which catalyze the conversion of testosterone to the bioactive and potent androgen, DHT, was demonstrated previously in normal cycling endometria and endometrioid endometrial adenocarcinomas. *In vitro* and *in vivo* studies suggest that androgens may directly have a neutral or inhibitory effect on endometrial cell proliferation (Tuckerman, Okon et al. 2000; Zang, Sahlin et al. 2007). The androgen-metabolizing UGTs expressed in endometrium

may thus prevent *in situ* androgen accumulation. We also observed that UGT2B15 is overexpressed by 15-fold in tumors compared to normal tissues. Previous findings by Harrington *et al.*, support the induction of UGT2B15 expression upon E₂ treatment in the mammary cancer cell line MCF-7 (Harrington, Sengupta et al. 2006). Since plasmatic levels of E₂ are increased in women with endometrial cancer, higher concentrations of E₂ in tumors may suggest that the expression of UGT2B15 in tumor cells depends on higher exposure to E₂ stimulation. The differential expression of androgen and estrogen synthesis and metabolic pathways in neoplasia process may be of crucial significance on the *in situ* exposure to E₁ and E₂, their protective and carcinogenic metabolites and to their androgenic precursors. In addition, while the accumulation of E₁ and E₂ are related to pathological tissues, our results suggest that the levels of hydroxylated and methoxylated metabolites of estrogens and of their androgenic precursors would also be modified in the presence of cancer. For instance, the formation of inactive estrogen-glucuronides end products is predicted to be increased in tumors since most UGT enzymes are overexpressed in cancer. It remains however to be determined whether circulating levels of estrogen-glucuronides would be higher in women with endometrial cancer and whether those stable components might act as novel biomarkers.

Altogether, these data establish for the first time a differential expression signature of estrogens and androgens biosynthesis and metabolizing pathways in human uterine adenocarcinomas. A limitation is the fact that mRNA levels were assessed while the analysis of protein expression and preferably the enzyme activity would be needed to confirm our main findings. Nevertheless, for several of these pathways, our data are

consistent with previous reports of protein content or enzyme activity (Utsunomiya, Ito et al. 2004; Bulun, Imir et al. 2005; Song, Liu et al. 2006; Velasco, Rueda et al. 2006). Furthermore, results demonstrate the importance of studying such a panel of genes implicated in estrogen synthesis and metabolism in the same samples to provide an indication of the predominant pathways. We conclude that higher levels of circulating sex-steroids in women with endometrial cancer may be associated to an imbalance of multiple biotransformation pathways in endometrial carcinogenesis. Additional studies designed to provide a comprehensive profile of circulating hormones and their metabolites, based on expression data reported here, are clearly needed.

Acknowledgements

We would like to thank Karine Greffard for her technical assistance and all participants to the study. We acknowledge the contribution of the Gene Quantification core laboratory directed by Jacques Corbeil for some qPCR analysis. We thank Mario Harvey for critical reading of the manuscript.

References

- Allen, N. E., T. J. Key, et al. (2008). "Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." Endocr Relat Cancer **15**(2): 485-497.
- Bai, H. W., J. Y. Shim, et al. (2007). "Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases." Chem Res Toxicol **20**(10): 1409-1425.
- Berstein, L. M., A. E. Tchernobrovkina, et al. (2003). "Tumor estrogen content and clinicomorphological and endocrine features of endometrial cancer." J Cancer Res Clin Oncol **129**(4): 245-249.
- Blake, J. (2006). "Menopause: evidence-based practice." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **20**(6): 799-839.
- Bokhman, J. V. (1983). "Two pathogenetic types of endometrial carcinoma." Gynecol Oncol **15**(1): 10-17.
- Bulun, S. E., G. Imir, et al. (2005). "Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata." J Steroid Biochem Mol Biol **95**(1-5): 57-62.
- Caillier, B., J. Lepine, et al. (2007). "A pharmacogenomics study of the human estrogen glucuronosyltransferase UGT1A3." Pharmacogenet Genomics **17**(7): 481-495.
- Cavaliere, E. L., D. E. Stack, et al. (1997). "Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10937-10942.
- D'Amato, R. J., C. M. Lin, et al. (1994). "2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3964-3968.
- Duguay, Y., M. McGrath, et al. (2004). "The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk." Cancer Res **64**(3): 1202-1207.
- Falany, J. L., R. Azziz, et al. (1998). "Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium." Chem Biol Interact **109**(1-3): 329-339.
- Green, M. D., E. M. Oturu, et al. (1994). "Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates." Drug Metab Dispos **22**(5): 799-805.
- Guillemette, C. (2003). "Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes." Pharmacogenomics J **3**(3): 136-158.
- Guillemette, C., A. Belanger, et al. (2004). "Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview." Breast Cancer Res **6**(6): 246-254.
- Harrington, W. R., S. Sengupta, et al. (2006). "Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells." Endocrinology **147**(8): 3843-3850.
- Husen, B., N. Psonka, et al. (2000). "Differential expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases types 2 and 4 in human endometrial epithelial cell lines." J Mol Endocrinol **24**(1): 135-144.

- Labrie, F., A. Belanger, et al. (2007). "Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration." J Steroid Biochem Mol Biol **103**(2): 178-188.
- Lakhani, N. J., M. A. Sarkar, et al. (2003). "2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent." Pharmacotherapy **23**(2): 165-172.
- Lee, A. J., M. X. Cai, et al. (2003). "Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms." Endocrinology **144**(8): 3382-3398.
- Lepine, J., O. Bernard, et al. (2004). "Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholesterogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5222-5232.
- Levesque, E., M. Beaulieu, et al. (1997). "Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene." Pharmacogenetics **7**(4): 317-325.
- Liehr, J. G. (2000). "Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?" Endocr Rev **21**(1): 40-54.
- Liehr, J. G., M. J. Ricci, et al. (1995). "4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9220-9224.
- Lukanova, A., E. Lundin, et al. (2004). "Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women." Int J Cancer **108**(3): 425-432.
- Luu-The, V., P. Tremblay, et al. (2006). "Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women." Mol Endocrinol **20**(2): 437-443.
- Nyholm, H. C., A. L. Nielsen, et al. (1993). "Plasma oestrogens in postmenopausal women with endometrial cancer." Br J Obstet Gynaecol **100**(12): 1115-1119.
- Potischman, N., R. N. Hoover, et al. (1996). "Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer." J Natl Cancer Inst **88**(16): 1127-1135.
- Sandanger, T. M., M. Sinotte, et al. (2007). "Plasma concentrations of selected organobromine compounds and polychlorinated biphenyls in postmenopausal women of Quebec, Canada." Environ Health Perspect **115**(10): 1429-1434.
- Sasaki, M., M. Kaneuchi, et al. (2003). "CYP1B1 gene in endometrial cancer." Mol Cell Endocrinol **202**(1-2): 171-176.
- Sasano, H. and N. Harada (1998). "Intratamoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies." Endocr Rev **19**(5): 593-607.
- Smuc, T., R. Ruprecht, et al. (2006). "Expression analysis of estrogen-metabolizing enzymes in human endometrial cancer." Mol Cell Endocrinol **248**(1-2): 114-117.
- Song, D., G. Liu, et al. (2006). "Expression of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study." J Steroid Biochem Mol Biol **101**(2-3): 136-144.
- Thibaudeau, J., J. Lepine, et al. (2006). "Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone." Cancer Res **66**(1): 125-133.

- Tuckerman, E. M., M. A. Okon, et al. (2000). "Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study." Fertil Steril **74**(4): 771-779.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, et al. (2001). "Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members." Endocrinology **142**(2): 778-787.
- Utsunomiya, H., K. Ito, et al. (2004). "Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma." Clin Cancer Res **10**(17): 5850-5856.
- Utsunomiya, H., T. Suzuki, et al. (2001). "The analyses of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human endometrial hyperplasia and carcinoma." J Clin Endocrinol Metab **86**(7): 3436-3443.
- Vadlamuri, S. V., D. D. Glover, et al. (1998). "Regiospecific expression of cytochrome P4501A1 and 1B1 in human uterine tissue." Cancer Lett **122**(1-2): 143-150.
- Velasco, I., J. Rueda, et al. (2006). "Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis." Mol Hum Reprod **12**(6): 377-381.
- Watanabe, K., H. Sasano, et al. (1995). "Aromatase in human endometrial carcinoma and hyperplasia. Immunohistochemical, in situ hybridization, and biochemical studies." Am J Pathol **146**(2): 491-500.
- Williams, J. A., B. J. Ring, et al. (2002). "Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes." Drug Metab Dispos **30**(11): 1266-1273.
- Wu, L., M. Einstein, et al. (1993). "Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity." J Biol Chem **268**(17): 12964-12969.
- Zang, H., L. Sahlin, et al. (2007). "Effects of testosterone treatment on endometrial proliferation in postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **92**(6): 2169-2175.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., A. Akhmedkhanov, et al. (2001). "Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study." Br J Cancer **84**(7): 975-981.

Table 1. Demography and anthropometry characteristics and information on tissues' availability

<i>Characteristics</i>	Healthy (n = 110)			Cases (n = 126)		
	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
Age (years)***	58.3 ±	5.6	48-76	64.8 ±	9.1	47-86
Weight (kg)**	68.8 ±	14.0	44.8-133.0	74.0 ±	18.9	33.2-133.0
Height (cm)	159.6 ±	5.2	146-172	158.2 ±	6.4	134-173
Body-mass index (kg/m ²)**	27.0 ±	5.4	17.2-51.3	29.6 ±	7.4	14.8-53.6
<i>Tissues availability</i>			Tissues samples		Serum samples	
			n	%	n	%
Normal (from healthy women)			7			
Peritumoral Normal (from cases) ³			36			
Tumors (from cases) ³			49			
<i>Histology</i>						
Endometrioid carcinoma (Type I)			36	73.5	96	82.8
Serous adenocarcinoma ¹ (Type II)			6	12.3	9	7.8
Clear cells adenocarcinoma (Type II)			4	8.2	7	6.0
Others ² (Type II)			3	6.0	4	3.4

¹Also referred to as papillary serous

²Others =Undifferentiated carcinoma, malignant mixed tumors and malignant mixed mullerian tumors.

³For 31 cases, both peritumoral and tumoral tissues were available. Type I endometrial cancers are endometrioid carcinomas while type II refers to all other tumor histology types. Significantly different between cases and controls, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$.

Range: minimum and maximum. SD: standard deviation. n: number.

Table 2. Mean (SD) levels of circulating estrogens in postmenopausal women

<i>Circulating Hormones</i>	Healthy women		Endometrial cancers		Fold ¹	Adj. <i>P</i> ²
	Mean	SD	Mean	SD		
E ₁ (pg/ml)	21.14	12.55	44.73	31.94	2.12	<0.0001
E ₂ (pg/ml)	5.86	10.50	13.75	27.90	2.35	<0.0001
E ₁ -S (pg/ml)	250	300	630	700	2.52	<0.0001

¹Fold increase in endometrial cancer cases compared to healthy postmenopausal women.

²*P* values were adjusted for age and BMI.

P, *P* value; Adj., Adjusted; SD, standard deviation.

Table 3. Expression profiling of key estrogens biosynthesis and metabolic pathways in endometrial tissues

Genes	Relative expression [†] Peritumoral normal tissues	All tissues T vs N	Tumors	
			Type I T vs N	Type II T vs N
Genes with the highest expression levels				
<i>Synthesis</i>				
17 β -HSD 12	430,000	+1.6**	+1.8***	
17 β -HSD 7	96,000	NS		
Sulfatase	49,000	+2.2**	+2.4**	
<i>Metabolism</i>				
CYP1B1	2,500,000	-3.0***	-2.5***	-6.9***
COMT	111,000	+1.6**	+1.8**	
UGT2B7	225,000	+3.2**	+2.8*	+4.8*
UGT2B17	55,000	NS		
Genes with the lowest expression levels				
<i>Synthesis</i>				
17 β -HSD 2	4,900	+4.0***	+3.7**	+5.8**
17 β -HSD 1	475	-2.4***	-2.2**	-6.0***
CYP19	65	NS		
<i>Metabolism</i>				
SULT1A1	6,300	+1.6*		
UGT1A1	2,000	+1.3**	+1.6*	+2.9**
UGT1A3	170	+6.4**	+2.2*	+5.2*
UGT2B15	100	+15.6***	+13.7**	+17.9**
CYP1A1	69	+6.4*		
SULT1E1	30	+4.2 [#]		

[†]Arbitrary units. T; tumors, N; peritumoral normal tissues, +; higher expression and -; lower expression. [#] $P=0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$.

Type I endometrial cancers are endometrioid carcinomas while type II refers to all other tumor histology types.

NS: not significant

Figures legends

Figure 1. Schematic representation of the key estrogen synthesis and metabolic pathways expressed in disease-free endometrium and those modified in tumors. A) Estrogens and androgens metabolism. B) Metabolism of estrogens. Differential expressed genes in tumors compared to peritumoral normal tissues are highlighted with encircle arrows. Quantitative contribution of each pathway is represented by distinctive arrow size. Enzymes not studied are in parenthesis.

Figure 2. Expression profiles of estrogen synthesis and metabolic pathways in peritumoral normal and tumor tissues of human endometrium. Expression levels from frozen samples of peritumoral normal (N, n=36) and tumoral (T, n=49) tissues were studied by quantitative real-time PCR using specific and validated strategies. Numbers indicate fold change. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$.

Figure 1

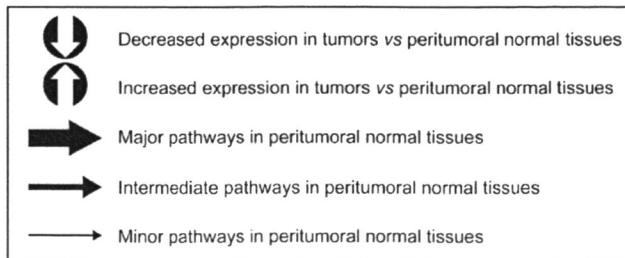
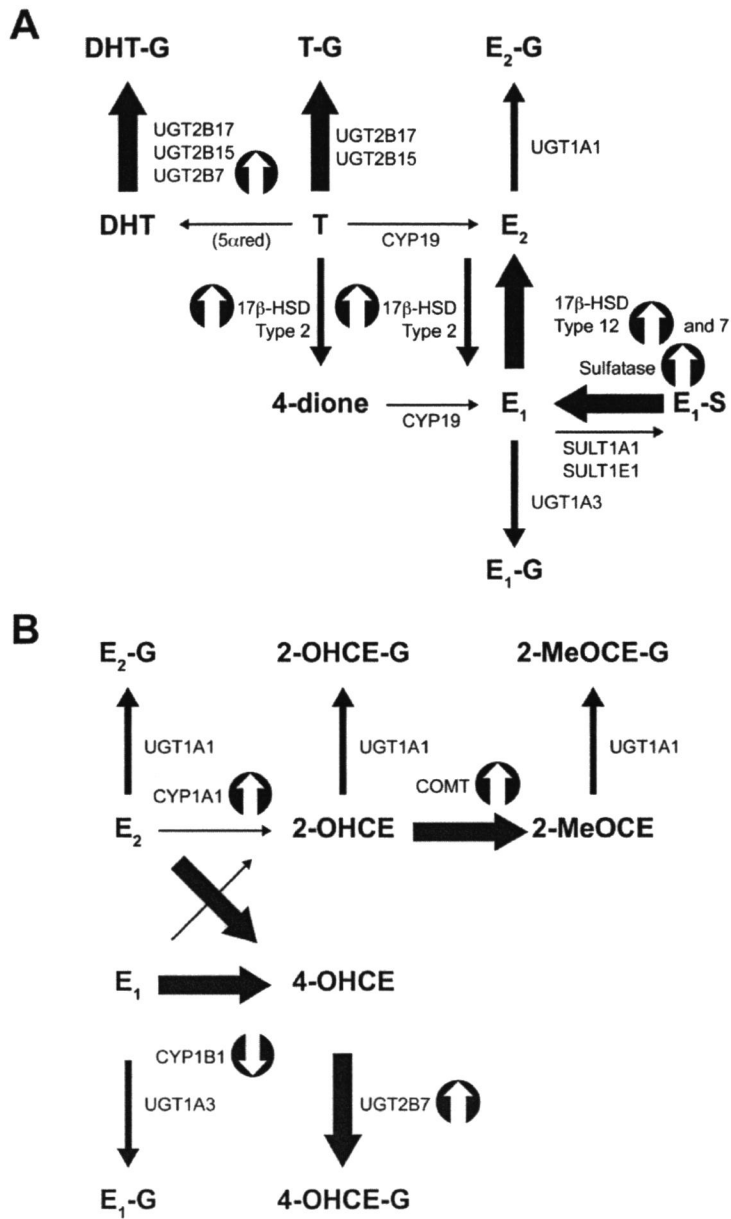
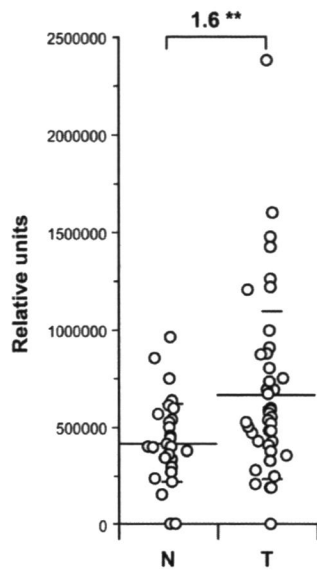
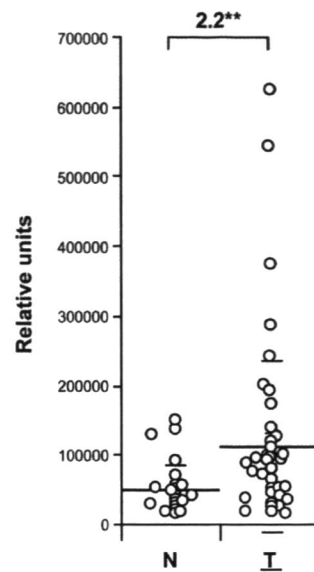
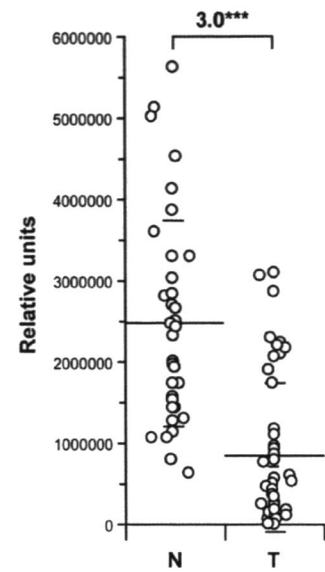
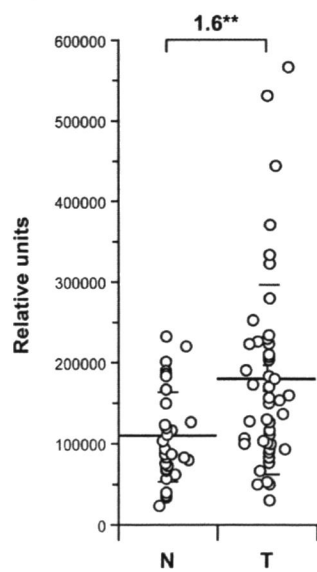
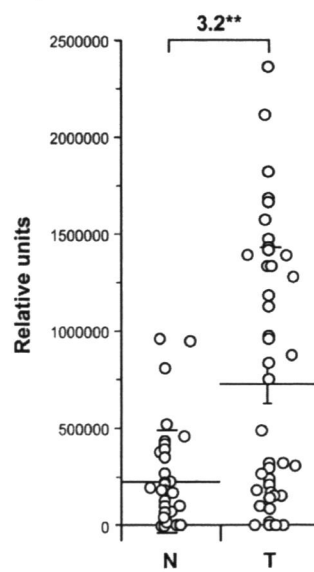
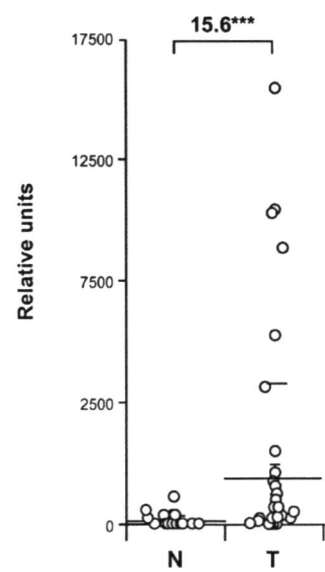


Figure 2**A) 17 β -12 type 12****B) Sulfatase****C) CYP1B1****D) COMT****E) UGT2B7****F) UGT2B15**

SUPPLEMENTAL DATA

Oligonucleotides used for quantitative real-time PCR analyses.

mRNA	Primers	Amplicons	Sequences 5'→3'
UGT1A1	242-F 243-R	Exons 1-2	GAG-AGA-GGT-GAC-TGT-CCA-GGA-C CAA-ATT-CCT-GGG-ATA-GTG-GAT-TTT
UGT1A3	19-F 22-R	Exons 1-2	CCA-ATT-CAG-ACC-ACA-TGA-CAT-TCA CAA-ATT-CCT-GAG-ATA-GTG-GCT-TCC-T
UGT1A8	1684-F 1683-R	Exons 1-2	AAT-TCT-CCA-AAC-ACC-TGT-CAC-A TCA-AAT-TCC-ATA-GGC-AAT
UGT1A9	389-F 348-R	Exons 1-2	AAT-TCT-CCA-AAC-ACC-TGT-TAC-GGA-G ATG-TAG-GCT-TCA-AAT-TCC-ATA-GGC-AAC
UGT1A10	349-F 350-R	Exons 1-2	CTC-TTT-CCT-ATG-TCC-CCA-ATG-A GGC-TTC-AAA-TTC-CAT-AGG-CAA-T
UGT2B7	1694-F 1695-R	Exons 2-3	CGA-AAC-TCC-TGG-AAT-TTT-CAG TCT-CCA-GAG-CTC-TGT-ACA-AAG
UGT2B15	223-F 224-R	Exon 1	GTG-TTG-GGA-ATA-TTA-TGA-CTA-CAG-TAA-C GGG-TAT-GTT-AAA-TAG-TTC-AGC-CAG-T
UGT2B17	1686-F 1687-R	Exons 1-3	TGA-CTT-TTG-GTT-TCA-AGC TTC-CAT-TTC-CTT-AGG-CAA
r18S	1670-F 1671-R		CTT-AGA-GGG-ACA-AGT-GGC-G ACG-CTG-AGC-CAG-TCA-GTG-TA
17β-HSD-1	F R	Exons 1-2	Z*-GAG-CTT-CAA-AGT-GTA-TGC-CAC-GT GAA-AAC-ACA-GGG-CCG-GCT
17β-HSD-2	F R	Exons 1-2	Z*-GAA-TTG-TTA-CCT-GTG-GAT-CAG-AAG-G CTG-GTG-ACA-GGT-GGT-GAT-TGC
17β-HSD-7	F R	Exons 7-8	Z*-ATG-GAA-CAG-AAG-CTC-TGG-TAT-GG CAC-CAA-AAG-CCT-GAA-TCT-CTC-A
17β-HSD-12	F R	Exons 4-5	Z*-AAC-AGG-CTT-GGC-TGG-TCT-TG CAT-CTT-AGT-GAA-CAA-CGT-GGG-AAT
CYP1B1	F R	Exons 1-2	Z*-TTC-ACC-AGG-TAT-CCT-GAT-GTG-C CTG-ATC-CAA-TTC-TGC-CTG-CA
CYP1A1	F R	Exons 1-2	Z*-TGC-AGA-AGA-TGG-TCA-AGG-AGC GGA-TGT-GGC-CCT-TCT-CAA-AG
COMT	F R	Exons 1-2	Z*-GGG-CGA-CAA-GAA-AGG-CAA-G GGC-TGG-TGC-TCC-TGA-ATC-AC
SULT1A1	F R	Exons 4-5	Z*-GCC-AAG-GTG-CAC-CCT-GAG GAT-CCG-TAG-GAC-ACT-TCT-CCG-AC
SULT1E1	F R	Exons 4-5	Z*-GGA-TTG-TAA-GAT-AAT-CTA-TCT-TTG-CCG GAA-ACA-GCC-ACA-TCC-TTT-GCA
Sulfatase	F R	Exons 3-4	Z*-CCT-TCA-TGA-CTG-GCC-GGT-AC AGG-AAT-GGC-ATC-TTG-GTC-CC
CYP19	F R	Exons 1-2	Z*-TGG-TGT-GGA-ATT-ATG-AGG-GCA ACC-AGG-TCC-TGG-CTA-CTG-CA

F: Forward, R: Reverse

* Z-sequence: ACT-GAA-CCT-GAC-CGT-ACA

CHAPITRE III. Profil des œstrogènes et de leurs métabolites glucuronides dans le sérum par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Résumé

Profil des œstrogènes et de leurs métabolites glucuronides dans le sérum par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Patrick Caron, Étienne Audet-Walsh, Johanie Lépine, Alain Bélanger et Chantal Guillemette.

Contexte. La conversion métabolique des œstrogènes, notamment de l'œstradiol (E_2), en dérivés glucuronides (G) est un mécanisme de contrôle de l'exposition hormonale intratissulaire. Ce processus d'inactivation a été observé au niveau hépatique, mais aussi dans plusieurs tissus périphériques. Les dérivés glucuronides ainsi formés, qui sont plus polaires, peuvent être détectés en circulation. Nous avons développé et validé une méthode sensible et spécifique utilisant la spectrométrie de masse, afin de quantifier cinq glucuronides d'œstrogènes dans le sérum.

Matériel et Méthodes. La méthode développée utilise des standards deutérés et n'implique pas d'hydrolyse enzymatique, ce qui représente une amélioration substantielle par rapport aux méthodes existantes. L'œstrone (E_1), le sulfate d' E_1 (E_1 -S), l' E_2 , les dérivés 3-G de l' E_1 , de l' E_2 , du 2-méthoxy- E_1 et du 2-méthoxy- E_2 , ainsi que le dérivé 17-G de l' E_2 , ont été mesurés dans le sérum de 19 femmes préménopausées et de 10 femmes postménopausées. Afin d'isoler les œstrogènes, une extraction en phase solide et une extraction liquide-liquide ont été effectuées, et la quantification a été ensuite faite par spectrométrie de masse en mode négatif d'« analyse de réactions multiples » (*multiple reaction monitoring*, MRM) à l'aide d'un spectromètre API3200 équipé d'une source TurboIonSpray®.

Résultats. La sensibilité de cette méthode est de ≥ 5 pg/ml. Sa spécificité se situe entre 90 et 111% et les coefficients de variation varient entre 1,4 et 13,3%, ce qui indique une bonne reproductibilité. La méthode développée permet de quantifier les dérivés glucuronides d'œstrogènes à des niveaux situés entre 5 et 1000 pg/ml. Dans la phase folliculaire, on observe que le métabolite majeur est l' E_1 -3G, tandis que l' E_2 -3G et le 2-MeOE $_1$ -3G se retrouvent en quantités moindres (54, 10,4 et 7,8 pg/ml, respectivement). Les concentrations circulantes de ces métabolites sont 2,6 à 3,0 fois plus élevées dans la phase lutéale du cycle hormonal. L' E_2 -17G et le 2-MeOE $_2$ -3G étaient, de façon générale, sous la limite de quantification. C'est l' E_1 -3G qui est le métabolite le plus abondant (30,9 pg/ml) chez les femmes postménopausées.

Conclusion. Notre méthode permet d'établir le profil des glucuronides d'œstrogènes circulants et fournit un nouvel outil pour l'identification de biomarqueurs dans le contexte des maladies hormonodépendantes.

Anal. Chem. 81 : 10143-10148, 2009

Facteur d'impact 2010 : 5.874

Profiling Endogenous Serum Estrogen and Estrogen-Glucuronides by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

*Patrick Caron^{†,‡}, Etienne Audet-Walsh^{†,‡}, Johanie Lépine^{†,‡}, Alain Bélanger^{†,§}
and Chantal Guillemette^{†,‡,Δ,*}*

[†]Oncology, Molecular Endocrinology and Genomics Research Center and Laval University Research Center, [‡]Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec, Canada. [§]Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada. ^ΔCanada Research Chair in Pharmacogenomics.

***Corresponding author:**

Chantal Guillemette, Ph.D.
Pharmacogenomics Laboratory
Laval University Research Center
2705 Boulevard Laurier, T3-48
Québec, Canada, G1V 4G2
Tel. (418) 654-2296, Fax. (418) 654-2761
E-mail: chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca

Short title: Direct quantitation of endogenous serum estrogens

Keywords: mass spectrometry, estradiol, glucuronide, catechol-estrogen, methoxy-estradiol.

Reproduced with permission from [Caron, P., E. Audet-Walsh, J. Lepine, A. Belanger and C. Guillemette (2009). "Profiling endogenous serum estrogen and estrogen-glucuronides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Anal Chem* **81**(24): 10143-10148.] Copyright 2009 American Chemical Society.

The abbreviations used are:

2-MeOE₁-3G: 2-methoxyestrone-3-glucuronide; 2-MeOE₂-3G: 2-methoxyestradiol-3-glucuronide; E₁: estrone; E₁-S: estrone-sulfate; E₁-3G: estrone-3-glucuronide; E₂: 17β-estradiol; E₂-3G: estradiol-3-glucuronide; E₂-17G: estradiol-17-glucuronide; G: glucuronide; HPLC-MS/MS: high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; LOQ: limit of quantification; LLOQ : lower limit of quantification; MS: mass spectrometry; PBS: phosphate buffered saline; UGT: UDP-glucuronosyltransferase.

ABSTRACT

Estrogens, namely 17 β -estradiol (E₂), are conjugated to glucuronides (G) and this metabolic conversion is part of their tissular-concentration control-mechanism. This inactivation process has been observed, in addition to the liver, in several estrogen-dependent tissues and the resulting polar metabolites are detected in circulation. We developed and validated a highly sensitive and specific mass spectrometry-based method to directly measure estrogen-G serum levels. The method uses deuterated standards but does not involve enzymatic hydrolysis, a major improvement over previous techniques. Estrone (E₁), E₁-sulfate, E₂, the 3-G of E₁, E₂, 2-methoxy-E₁ (2-MeOE₁) and 2-methoxy-E₂ (2-MeOE₂), and the 17-G of E₂ were measured in serum of 19 premenopausal and 10 postmenopausal healthy women. Two extractions, solid-phase and liquid-liquid, were performed to isolate the estrogens. Estrogens were then quantified by mass spectrometry in the negative MRM ion mode using an API3200 spectrometer with a turbo ionspray source. The method selectively measured estrogen glucuronides with sensitivity ≥ 5 pg/mL, accuracy 90-111%, and reproducibility (C.V.=1.4-13.3%). The method is applicable between 5 and 1000 pg/mL. For the ovarian follicular phase, the major metabolite found was E₁-3G, with E₂-3G and 2-MeOE₁-3G found in lesser amounts (54, 10.4, and 7.8 pg/mL, respectively). These concentrations are 2.6- to 3-fold greater than found for luteal-phase estrogens. The concentrations of E₂-17G and 2-MeOE₂-3G were usually less than the limit of quantification. In serum of postmenopausal women, E₁-3G was the most abundant estrogen found (30.9 pg/mL). Our method profiles estrogens and estrogen glucuronides, and may represent a new tool to identify biomarkers in hormone-dependant diseases.

INTRODUCTION

The risks associated with hormone-related diseases, such as osteoporosis (Riggs, Khosla et al. 2002; Tok, Ertunc et al. 2004), cardiovascular diseases (Muller, van der Schouw et al. 2003; Tivesten, Hulthe et al. 2006; Chakrabarti, Lekontseva et al. 2008; Ling, Komesaroff et al. 2009), and cancers of the prostate, ovary, breast, and endometrium (Potischman, Hoover et al. 1996; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Key, Appleby et al. 2002; Leowattana 2004; Lukanova and Kaaks 2005; Eliassen, Missmer et al. 2006; Rinaldi, Dossus et al. 2007; Weiss, Huang et al. 2008; Danforth, Eliassen et al. 2009), correlate with the levels of sex hormones circulating in the blood. For epidemiological studies, serum 17β -estradiol (E_2) has usually been measured, although in some cases the serum levels of estrone (E_1), E_1 -sulfate (E_1 -S), testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA), and dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) have also been reported. Serum hormone levels have been used to identify patients who may benefit the most from therapy. For instance, the reduction in the risk that the breast cancer would recur was shown to be greatest for women, with the highest levels of E_2 , who were treated raloxifene; by contrast, postmenopausal women, who have undetectable E_2 levels, had a similar risk whether or not they were treated with raloxifene (Cummings, Duong et al. 2002). Several analytical approaches have been employed to estimate estrogen levels in urine and serum (Stanczyk, Lee et al. 2007), including radioimmunoassay (Berg and Kuss 1991; Potischman, Hoover et al. 1996; Falk, Gail et al. 1999; Geisler, Ekse et al. 2008), direct immunoassays (Stanczyk, Miyakawa et al. 1980; Rinaldi, Dechaud et al. 2001; Goderie-Plomp, van der Klift et al. 2004), gas chromatography–mass spectrometry (Adlercreutz, Kiuru et al. 2004; Labrie, Belanger et al. 2007), and liquid chromatography–

tandem spectrometry (Lepine, Bernard et al. 2004; Xu, Keefer et al. 2004; Xu, Veenstra et al. 2005; Xu, Keefer et al. 2007; Xu, Roman et al. 2007; Soldin and Soldin 2009). To achieve the sensitivity, specificity, and reproducibility needed for epidemiologic studies, however, a “gold-standard” method, such as one incorporating mass spectrometry (MS), is required (Labrie, Belanger et al. 2007; Stanczyk, Lee et al. 2007).

Conjugated steroids, including E₁-S, DHEA-S, and glucuronide (G) derivatives—the last of which are formed by UDP-glucuronosyltransferase enzymes (UGTs)—are present in considerably greater concentrations than are unconjugated steroids in the blood. Because E₂ serum levels are extremely low in postmenopausal women, an assay that could directly measure estrogen-G levels may be useful. However, the current assay used to quantify serum conjugated estrogens necessitate the hydrolysis of the sulfate or glucuronide group off the molecule using enzymatic or acidic conditions and then measure the unconjugated moiety (Xu, Roman et al. 2007). Therefore, only the total amounts of unconjugated and conjugated estrogen compounds have been measured. Thus, among many limitations the assay lacks specificity since it cannot discriminate the relative levels of isomers such as E₂-3G and E₂-17G.

Estrone and estradiol are not only directly conjugated to glucuronic acid by UGTs but are also modified at various skeletal ring positions by cytochrome P450 (CYP450) and catechol-O-methyl-transferase (COMT) (Zhu and Conney 1998; Lee, Cai et al. 2003; Guillemette, Belanger et al. 2004; Tsuchiya, Nakajima et al. 2005; Bai, Shim et al. 2007). Of the main estrogen metabolites, the 4-hydroxy metabolites has been shown to be

carcinogenic, whereas the 2-MeO metabolites appear to protect against cancer (Lakhani, Sarkar et al. 2003; Tsuchiya, Nakajima et al. 2005; Cavalieri, Chakravarti et al. 2006). The resulting hydroxyl and methoxy metabolites are further conjugated to glucuronate by UGTs in hormone-dependant tissues (Guillemette, Belanger et al. 2004; Lepine, Bernard et al. 2004; Starlard-Davenport, Lyn-Cook et al. 2008). However, the roles that these estrogen metabolites may play in the development, progression or inhibition of hormone-related cancers and/or other diseases remain to be definitively determined. Furthermore, that some E₂ metabolites display biological properties distinct from those of their parent compounds reinforces the need to carefully determine their levels in serum. A recent study by Xu and coworkers, which used hydrolysis to quantify estrogen conjugates, clearly supports the presence in significant amounts of estrogen conjugates in serum of pre- and postmenopausal women (Xu, Roman et al. 2007). Directly profiling these conjugated estrogens would thus be of great interest in epidemiological studies.

An HPLC-MS/MS assay was then developed and validated for sensitivity, specificity, precision, and accuracy in human serum samples using internal standards to directly identify and quantitate estrogen-G metabolites. The method does not include an enzymatic or acid hydrolysis step. The specific conjugates measured were E₁-3G, E₂-3G, E₂-17G, 2-MeOE₁-3G, and 2-MeOE₂-3G. The clinical relevance of the method was evaluated by measuring the levels of these conjugates and those of E₁, E₂, and E₁-S in serum samples obtained from healthy, pre- and postmenopausal women. The glucuronide levels were compared with those typically reported in epidemiological studies, namely, E₂, E₁, and E₁-S.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and materials. The glucuronides, E₁-3G, E₂-3G, and E₂-17G, were obtained from Steraloids, Inc. (Newport, RI). The glucuronides of 2-MeOE₁ and 2-MeOE₂ were synthesized and then structurally characterized using nuclear magnetic resonance, as described (Lepine, Bernard et al. 2004). Deuterated unconjugated standards were purchased from C/D/N Isotopes, Inc. (Pointe-Claire, Quebec, Canada). All chemicals and solvents were HPLC grade. Methanol, 1-chlorobutane, and isoamyl alcohol were obtained from VWR Canlab (Montreal, Quebec, Canada). Ammonium hydroxide and acetic acid were purchased from Fisher Scientific (Nepean, Canada). Sodium phosphate dibasic anhydrous reagent grade, sodium phosphate monobasic, monohydrate ACS reagent grade, sodium chloride, and potassium chloride were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO).

Serum sample collection. Serum samples were obtained, during the follicular and luteal phases of the estrous cycle, from 19 healthy premenopausal women who were not taking oral contraceptives and from 10 postmenopausal women who were not undergoing hormone replacement therapy. Subjects provided written consent, and the study was reviewed and approved by institutional review boards. Blood samples were collected in Vacutainer SST gel & clot activator sampling tubes (BD, Franklin Lakes, NJ), deposited on ice, and centrifuged at 2800 × *g* for 10 minutes within a few hours of collection. Samples were divided into aliquots and frozen at –80°C until needed.

Production and purification of deuterium-labeled estrogen-glucuronide standards.

The deuterium-labeled estrogens, E₂-2,4,16,16-d₄ (d₄-E₂), and E₁-2,4,16,16-d₄ (d₄-E₁) were purchased from C/D/N Isotopes, Inc. (Pointe-Claire, Quebec, Canada). The glucuronides d₄E₂-3G, d₄E₂-17G, and d₄E₁-3G standards were synthesized in our laboratory using pooled liver microsomal fractions as follows. Reaction samples, (100 µL) containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 µg/mL phosphatidylcholine, 8.5 mM saccharolactone, 5 µg/mL of pepstatine, 0.5 µg/mL of leupeptine, 2 mM UDP-glucuronic acid, 40 µg microsomal extracts, and 200 µM of a deuterium-labeled estrogen substrate, were incubated overnight at 37°C. The reactions were terminated by adding 100 µL of methanol, and the samples were centrifuged at 16,060 × g for 10 min. For purification, the supernatant from each enzymatic assay was diluted [1:9] with phosphate buffered saline (PBS) and loaded into a Strata X cartridge (60 mg; Phenomenex, Torrance, CA) that had been preconditioned with methanol and then PBS. The cartridges were then washed with ultrapure water and ethyl acetate to remove unreacted deuterium-labeled estrogens. The glucuronides were eluted with a mixture of methanol:water (80:20, v/v), 1% v ammonium hydroxide, evaporated under nitrogen, and finally dissolved in methanol. The identities and purities of the compounds were confirmed by HPLC-MS/MS.

Preparation of stock solutions, calibration standards, and quality control samples.

Stock solutions of the estrogen-Gs were prepared at concentrations of 100 µg/mL methanol, stored at -20°C, and used within 12 months. A mixture of charcoal-adsorbed serum/water (1:1, v/v), that had no detectable trace of estrogen compounds served as the solvent for the calibration standards and the quality control samples (Labrie, Belanger et al.

2007). Seven standard solutions of the estrogen-Gs, with concentrations between 5 and 1000 pg/mL, were prepared. Quality control samples of the estrogen-Gs were also prepared at three concentrations (15, 500, and 800 pg/mL).

Sample preparation. The procedure used to prepare and measure E₁-S, E₁, and E₂ in serum samples have been reported (Labrie, Belanger et al. 2007). For the glucuronides, 2 mL of serum was mixed with 1 mL PBS and 30 µL of one of the standard solutions. Two extractions, solid-phase and liquid-liquid, were performed to isolate the estrogens since a substantial volume of serum (a complex matrix) 2mL was used. The liquid-liquid extraction allows the elimination of additional impurities from the column elute. Samples were applied to Strata X 200 mg solid-phase extraction cartridges that had been preconditioned with methanol and PBS. The Strata X reversed phase sorbent was chosen since it retains analytes by hydrophobic interaction and has H- and π - π bonding capabilities for enhanced retention of polar and aromatic analytes; these two mechanisms appeared best for the analytes of interest. The loaded cartridges were sequentially washed with water and methanol:water (40:60, v/v), 1% (v) acetic acid. The washed cartridges were dried under vacuum. The samples were eluted with methanol:water (80:20, v/v), 1% (v) ammonium hydroxide, and the solvents were evaporated under a stream of nitrogen (45°C). The residues were dissolved in water, 1% formic acid. A 3 mL mixture of 1-chlorobutane:isoamyl alcohol (85:15, v:v) was added to each sample and mixed. After centrifugation, the organic extracts were collected, and an additional 3 mL of 1-chlorobutane:isoamyl alcohol (85:15, v:v) was added and mixed. After centrifugation, the two organic extracts were pooled and evaporated under nitrogen. The dried residues were

reconstituted in 100 μ L solutions of methanol:water (15:85, v/v) prior to LC-MS/MS analysis.

Analysis of estrogen-Gs and E₁S by LC-MS/MS. The HPLC with tandem MS system consisted of an HPLC pump, an autosampler (1200 Series, Agilent Technologies, Ville St-Laurent, Canada), and a 75 \times 4.6 mm column of Luna-Phenyl-Hexyl 3 μ m (Phenomenex) for estrogen-Gs, and a 100 \times 4.6 mm, 35 μ m particle size Phenomenex Luna C18 column for E₁S (Labrie, Belanger et al. 2007). The column was coupled to a mass spectrometer (model API3200, Applied Biosystems, Concord, Canada) equipped with a turbo ion-spray source operating in the negative ion mode. The flow rate for the HPLC chromatograms was 0.9 mL/min. The eluents were 0.005% (v) ammonium hydroxide in methanol (solvent A) and 0.005% (v) ammonium hydroxide in water (solvent B). After loading a sample, the column was washed with 10% A, sample was washed with a linear gradient of 10% A to 30% A in 5 min. The column was then washed for an additional 5 min with 30% A, flushed with 95% A for 2 min, and finally equilibrated with 10% A for 4 min. The MS settings were as follows: spray voltage, -4200 V; desolvation temperature, 650°C; declustering potential, -50V; and collision energy, -50V. The spectra were acquired in the multiple reaction monitoring mode. Negative-product multiple reaction monitoring mode ion pairs were monitored between m/z 447.0 \rightarrow 271.1 for E₂-3G, 447.0 \rightarrow 75.0 for E₂-17G, 445.0 \rightarrow 269.1 for E₁-3G, 475.1 \rightarrow 284.1 for 2-MeOE₁-3G, 477.1 \rightarrow 286.1 for 2-MeOE₂-3G, 451.0 \rightarrow 275.1 for d₄E₂-3G, 451.0 \rightarrow 75.0 for d₄E₂-17G, and 449.0 \rightarrow 273.1 for d₄E₁-3G.

Quantitation of estrogen-Gs. Quantitation of the estrogen-Gs was carried out using Analyst™ Software 1.4.1 (Applied Biosystems). A calibration curve for each estrogen-Gs was constructed by plotting the ratios of the peak areas (estrogen-G standard / deuterated estrogen-G standard) versus the concentration of the estrogen-Gs standard. The data for each calibration curve were fitted using a linear regression function, with $1/x^2$ weighting. The quality of each linear regression was determined using the standard error of the estimate and the relative standard error of the estimate as described.

Method validation.

Sample stability. Stability of the analytes in serum was investigated at QC low and high concentrations by analyzing samples stored at 20°C for 4 h and at -80°C.

Accuracy and precision. Intra-assay precision and accuracy were determined using four replicates of the three quality control samples that were prepared, extracted, and measured on the same day. For inter-assay precision and accuracy, four replicates of the three quality control samples were prepared, extracted, and measured on three different days.

Statistical analyses. Statistical analyses were done using the JMP 4.02 (academic) program (SAS Institute Inc., Cary, NC). The distributions were analyzed using the Shapiro-Wilk goodness-of-fit test, and the distributions were considered to be normal if the probability (D) was ≥ 0.05 . For the parametric analysis, a two-tailed Student's *t*-test was performed, and data for different samples were considered to be significantly different if $p < 0.05$. For the non-parametric analysis, Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests were performed, and a *P*-value (Prob > |Z|) of < 0.05 was considered to indicate that the differences were

significant. For the correlation analysis, Spearman's correlation tests were considered statistically significant with a P value < 0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

A highly sensitive and specific MS-based method was developed and validated to directly measure the concentrations of estrogens in human serum. The method uses deuterium-labeled estrogen-Gs, and, unlike assays available presently, does not require enzymatic hydrolysis. The clinical relevance of the method was evaluated by measuring the serum concentrations of the estrogen-Gs obtained from healthy, pre- and postmenopausal women.

To test for intra- and inter-assay reproducibilities, accuracies, and precision, we used three quality control standards at three concentrations (**Table 1**). **Table 2** presents stability data. The accuracy for the intraday assays was between 89.9% and 110.7%, and for the interday assays between 89.8% and 106.5%. For the intraday assays, the precision was between 1.4% and 13.3%, and for the interday assays between 3.2% and 12.3%. These precision values are similar to those found previously for estrogen metabolites in human serum (Xu, Roman et al. 2007) and urine (Qin, Zhao et al. 2008). The results show that our HPLC-MS/MS method is accurate and precise.

To determine the recovery of the estrogen-Gs from serum, a set of three replicate charcoal-adsorbed serum/water samples was used to which 50 μ L of an estrogen-G standard was added to each replicate at a concentration of 15 pg/mL (low concentration) or 800 pg/mL (high concentration). After extraction of estrogen-Gs, these procedures were repeated, except that the estrogen-G standards were added after the extraction step. The recovery of each estrogen-G was calculated by dividing the mean of the MS peak area found for the samples extracted before the estrogen-G was added by the peak area found

for the samples extracted before the estrogen-G was added. The recoveries ranged from 76.7 to 92.3%.

The lower limit of quantification (LLOQ), i.e., the smallest amount of an estrogen-G that could be reproducibly quantified, was calculated using the signal-to-noise data obtained from each estrogen-G-spiked serum sample. The LLOQ for each estrogen-G was found to be 5 pg/mL (**Figure 1**). This result demonstrates that the technique is highly sensitive in comparison with existing methods.

Levels of estrogens in serum of healthy premenopausal and postmenopausal women.

To determine if our method is of clinical relevance, the levels of the parental estrogens and the corresponding estrogen-Gs were measured in the serum of 19 pre- and 10 postmenopausal healthy women who were not using contraceptive hormones or receiving hormone replacement therapy, respectively. As expected, the levels observed in premenopausal women were often higher than those in postmenopausal women. The main estrogen-G found in premenopausal women (**Table 3**), during both the follicular and luteal phases was E₁-3G; E₂-3G and 2-MeOE₁-3G were found in lesser amounts. Conversely, E₂-17G could not be detected in the serum of any of the pre- and postmenopausal women tested. Additionally, 2-MeOE₂-3G could not be detected in the serum of most of the women.

For premenopausal women, the levels of E₂, E₁, and E₁-S changed significantly between the follicular and luteal phases, being at their maximum levels during the luteal phase

(Table 3). We also found that the concentrations of E₂-3G and E₁-3G were significantly greater (2.6- to 3.3-fold) during the luteal phase and these increases were similar to the elevations in E₂, E₁, and E₁-S. Therefore, throughout the hormonal cycle, with the exception of 2-MeOE₁-3G, a significant correlation exists between the levels of unconjugated estrogens and their corresponding 3-glucuronide metabolites **(Table 4)**. These observations suggest a link between circulating unconjugated and glucuronide derivatives of estrogens in premenopausal women.

In serum from postmenopausal women **(Table 5)**, E₁-3G was the only glucuronide metabolite measurable above the LLOQ; interestingly, however, its averaged concentration (30.9 ± 29.1 pg/mL) was almost less than 2-fold lower than that observed for premenopausal women during the follicular phase (54.2 ± 24.7 pg/mL). This observation suggests that there is only a modest decline in E₁-3G production when the ovaries cease functioning. This observation strongly suggest that significant metabolism of E₂ and/or E₁ are still present in several numbers of tissues in postmenopausal women. Notably, 2-MeOE₂-3G, which was above the limit of quantification in the serum of only 4 of the 19 premenopausal women, was detected in 70% of the postmenopausal women. The levels of these metabolites should be measured in a larger cohort.

CONCLUSION

A method for profiling the endogenous serum estrogen-Gs has been developed and used to measure their levels in serum samples of pre- and postmenopausal healthy women. This approach could be used effectively in clinical investigations and may successfully identify new biomarkers for hormone-related diseases such as some metabolites of E₂ that display distinct protective or carcinogenic properties. It could also be used to elucidate the alteration in estrogen metabolism and thus influence estrogen-tissue concentrations in such diseases. The work reported herein is the first time that estrogen-Gs have been measured in serum, and the results demonstrate that this MS-based quantitative method efficiently establishes a serum profile for estrogen conjugates and, as such, can be used for clinical investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-68964). E.A.-W. and J.L. are both recipients of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award from CIHR. C.G. holds a Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

Table 1. Accuracy and precision for the levels of estrogen-Gs extracted from serum

Estrogen-G*	Recovery	15 pg/mL		500 pg/mL		800 pg/mL	
		Accuracy [†]	Precision [‡]	Accuracy	Precision	Accuracy	Precision
Inter-day assays							
E ₂ -3G	75.85	94.38	10.34	91.23	3.88	99.81	4.03
E ₂ -17G	92.35	90.09	12.11	89.81	4.76	101.53	6.39
E ₁ -3G	88.55	106.45	11.18	97.35	6.72	92.92	3.19
2-MeOE ₁ -3G	88.15	103.37	12.27	105.50	6.46	96.75	4.09
2-MeOE ₂ -3G	78.50	93.32	11.93	97.22	4.76	102.77	4.06
Intra-day assays							
E ₂ -3G	75.85	92.33	11.56	92.07	3.38	103.46	4.40
E ₂ -17G	92.35	91.70	13.35	92.61	3.79	106.48	6.10
E ₁ -3G	88.55	95.39	11.28	93.98	2.58	92.65	3.34
2-MeOE ₁ -3G	88.15	96.71	10.74	110.67	8.27	98.79	1.37
2-MeOE ₂ -3G	78.50	89.91	6.33	95.06	4.66	105.04	4.43

*All data are reported as percentages (%).

[†]Accuracy: $[(\text{Calculated concentration} - \text{Nominal concentration}) / (\text{Nominal concentration})] \times 100$.

[‡]Precision (%) = $(\text{Standard deviation} / \text{Mean}) \times 100$.

Table 2. Stability of analytes in serum samples

	E ₁ -3G		E ₂ 3G		E ₂ -17G		2-MeOE ₁ -3G		2-MeOE ₂ -3G	
	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
Short-term Accuracy [†]	100.35	92.96	98.23	99.38	84.84	104.87	107.93	95.85	93.82	99.29
Precision [‡]	8.30	2.12	13.98	4.10	1.75	4.42	14.81	5.32	13.82	4.27
Long-term Accuracy [†]	98.79	95.71	109.60	111.20	108.19	111.12	106.16	104.69	99.52	87.14
Precision [‡]	9.30	12.47	1.88	2.41	5.97	1.96	9.48	12.59	10.86	1.48

Short-term stability was assessed 4h at 20°C and the long-term after 831 days at -80°C.

[†]Accuracy: [(Calculated concentration - Nominal concentration) / (Nominal concentration)] × 100.

[‡]Precision (%) = (Standard deviation / Mean) × 100

Table 3. Estrogen levels in the serum of 19 healthy, premenopausal women who were not taking oral contraceptives^a

	Cycling phase (n = 19)						Fold difference (L/F)	% Positive serum (n = 38)
	Follicular (Day 7 ± 1)			Luteal (Day 21 ± 1)				
	Mean ± SD	Total		Mean ± SD	Total			
Estrogens (pg/ml)								
E ₂	38.40 ±	20.40	77	103.66 ±	73.27	180	2.7*	100
E ₁	38.50 ±	11.86		75.84 ±	31.62		2.0*	100
Sulfates (pg/ml)								
E ₁ -S	640 ±	370	640	1920 ±	1090	1920	3.0*	100
Glucuronides^{b,c} (pg/ml)								
E ₂ -3G	10.37 ±	11.70	75	33.28 ±	20.18	199	3.2*	74
E ₁ -3G	54.19 ±	24.71		141.12 ±	75.40		2.6*	100
2-MeOE ₂ -3G	2.98 ±	1.58		3.34 ±	2.02		-	13
2-MeOE ₁ -3G	7.84 ±	7.26		21.56 ±	13.38		2.8*	71

F = follicular phase; L = luteal phase.

^a Mean age: 32.1 ± 7.9 years.

^b Values below the lower limit of quantitation are reported as LLOQ/2. Those compounds whose chromatographic peaks were above the limit of detection (signal-to-noise >3) represents extrapolated values.

^c The levels of E₂-17G were below the LOQ for all of the 38 serums tested.

* p < 0.001

Table 4. Correlations between unconjugated and conjugated estrogens in the serum of healthy, premenopausal women who were not taking oral contraceptives

	Cycling phases	E₂	E₁	E₁-S
E₂-3G	F	0.29	0.56 *	0.76 ***
	L	0.27	0.45	0.56 *
E₁-3G	F	0.58 **	0.58 **	0.46 *
	L	0.50 *	0.66 **	0.71 ***
2-MeOE₁-3G	F	-0.00	0.26	0.22
	L	0.52 *	0.63**	0.59 **

F: follicular phase.

L: luteal phase.

*p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001.

Table 5. Estrogen levels in the serum of ten healthy postmenopausal women who were not undergoing hormone replacement therapy ^a

	Mean ± S.D.			Total	Positive serum %
Estrogens (pg/ml)					
E ₂	6.58	±	3.79	39	100
E ₁	32.33	±	15.07		100
Sulfates (pg/ml)					
E ₁ -S	440	±	250	440	100
Glucuronides^{b,c} (pg/ml)^c					
E ₂ -3G	8.36	±	10.38	53	40
E ₁ -3G	30.91	±	29.14		100
2-MeOE ₂ -3G	6.86	±	7.58		70
2-MeOE ₁ -3G	6.16	±	10.82		50

^a Mean age: 58.8 ± 7.0 years.

^b Values below the lower limit of quantitation are reported as LLOQ/2. Those compounds whose chromatographic peaks were above the limit of detection (signal-to-noise >3) represents extrapolated values.

^c E₂-17G was below the LOQ for all 10 serums tested.

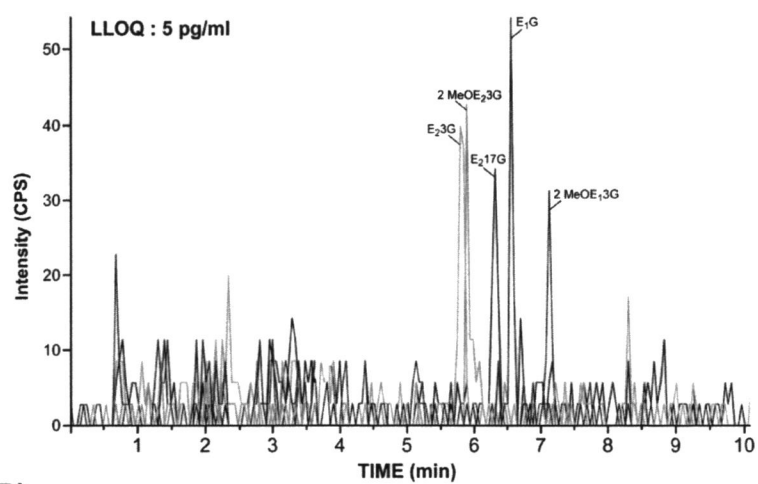
REFERENCES

- Adlercreutz, H., P. Kiuru, et al. (2004). "An isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous assay of estrogens and phytoestrogens in urine." *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**(5): 399-411.
- Bai, H. W., J. Y. Shim, et al. (2007). "Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases." *Chem Res Toxicol* **20**(10): 1409-1425.
- Berg, F. D. and E. Kuss (1991). "Urinary excretion of catecholestrogens, 2-methoxyestrogens and "classical estrogens" throughout the normal menstrual cycle." *Arch Gynecol Obstet* **249**(4): 201-207.
- Cavalieri, E., D. Chakravarti, et al. (2006). "Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention." *Biochim Biophys Acta* **1766**(1): 63-78.
- Chakrabarti, S., O. Lekontseva, et al. (2008). "Estrogen is a modulator of vascular inflammation." *IUBMB Life* **60**(6): 376-382.
- Cummings, S. R., T. Duong, et al. (2002). "Serum estradiol level and risk of breast cancer during treatment with raloxifene." *Jama* **287**(2): 216-220.
- Danforth, K. N., A. H. Eliassen, et al. (2009). "The association of plasma androgen levels with breast, ovarian, and endometrial cancer risk factors among postmenopausal women." *Int J Cancer*.
- Eliassen, A. H., S. A. Missmer, et al. (2006). "Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **98**(19): 1406-1415.
- Falk, R. T., M. H. Gail, et al. (1999). "Reproducibility and validity of radioimmunoassays for urinary hormones and metabolites in pre- and postmenopausal women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(6): 567-577.
- Geisler, J., D. Ekse, et al. (2008). "An optimised, highly sensitive radioimmunoassay for the simultaneous measurement of estrone, estradiol and estrone sulfate in the ultra-low range in human plasma samples." *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**(1-2): 90-95.
- Goderie-Plomp, H. W., M. van der Klift, et al. (2004). "Endogenous sex hormones, sex hormone-binding globulin, and the risk of incident vertebral fractures in elderly men and women: the Rotterdam Study." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(7): 3261-3269.
- Guillemette, C., A. Belanger, et al. (2004). "Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview." *Breast Cancer Res* **6**(6): 246-254.
- Key, T., P. Appleby, et al. (2002). "Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies." *J Natl Cancer Inst* **94**(8): 606-616.
- Labrie, F., A. Belanger, et al. (2007). "Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration." *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**(2): 178-188.
- Lakhani, N. J., M. A. Sarkar, et al. (2003). "2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent." *Pharmacotherapy* **23**(2): 165-172.

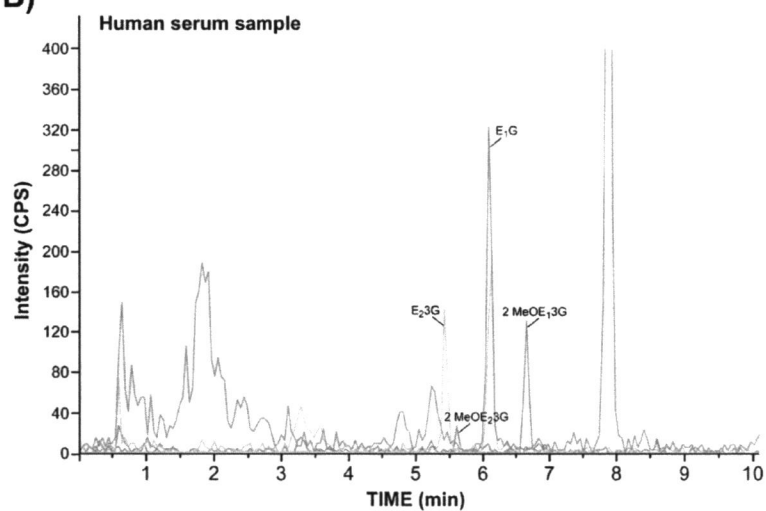
- Lee, A. J., M. X. Cai, et al. (2003). "Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms." Endocrinology **144**(8): 3382-3398.
- Leowattana, W. (2004). "DHEAS as a new diagnostic tool." Clin Chim Acta **341**(1-2): 1-15.
- Lepine, J., O. Bernard, et al. (2004). "Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5222-5232.
- Ling, S., P. A. Komesaroff, et al. (2009). "Cardiovascular physiology of androgens and androgen testosterone therapy in postmenopausal women." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **9**(1): 29-37.
- Lukanova, A. and R. Kaaks (2005). "Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(1): 98-107.
- Muller, M., Y. T. van der Schouw, et al. (2003). "Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5076-5086.
- Potischman, N., R. N. Hoover, et al. (1996). "Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer." J Natl Cancer Inst **88**(16): 1127-1135.
- Qin, F., Y. Y. Zhao, et al. (2008). "Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of estrogen conjugates in human urine." Anal Chem **80**(9): 3404-3411.
- Riggs, B. L., S. Khosla, et al. (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." Endocr Rev **23**(3): 279-302.
- Rinaldi, S., H. Dechaud, et al. (2001). "Reliability and validity of commercially available, direct radioimmunoassays for measurement of blood androgens and estrogens in postmenopausal women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(7): 757-765.
- Rinaldi, S., L. Dossus, et al. (2007). "Endogenous androgens and risk of epithelial ovarian cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(1): 23-29.
- Soldin, S. J. and O. P. Soldin (2009). "Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry." Clin Chem **55**(6): 1061-1066.
- Stanczyk, F. Z., J. S. Lee, et al. (2007). "Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1713-1719.
- Stanczyk, F. Z., I. Miyakawa, et al. (1980). "Direct radioimmunoassay of urinary estrogen and pregnanediol glucuronides during the menstrual cycle." Am J Obstet Gynecol **137**(4): 443-450.
- Starlard-Davenport, A., B. Lyn-Cook, et al. (2008). "Identification of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 in non-malignant and malignant human breast tissues." Steroids **73**(6): 611-620.
- Tivesten, A., J. Hulthe, et al. (2006). "Circulating estradiol is an independent predictor of progression of carotid artery intima-media thickness in middle-aged men." J Clin Endocrinol Metab **91**(11): 4433-4437.
- Tok, E. C., D. Ertunc, et al. (2004). "The effect of circulating androgens on bone mineral density in postmenopausal women." Maturitas **48**(3): 235-242.

- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, et al. (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." Cancer Lett **227**(2): 115-124.
- Weiss, J. M., W. Y. Huang, et al. (2008). "Endogenous sex hormones and the risk of prostate cancer: a prospective study." Int J Cancer **122**(10): 2345-2350.
- Xu, X., L. K. Keefer, et al. (2004). "Measuring seven endogenous ketolic estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry." Anal Chem **76**(19): 5829-5836.
- Xu, X., L. K. Keefer, et al. (2007). "A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitative analysis of urinary endogenous estrogen metabolites." Nat Protoc **2**(6): 1350-1355.
- Xu, X., J. M. Roman, et al. (2007). "Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Anal Chem **79**(20): 7813-7821.
- Xu, X., T. D. Veenstra, et al. (2005). "Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry." Anal Chem **77**(20): 6646-6654.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., A. Akhmedkhanov, et al. (2001). "Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study." Br J Cancer **84**(7): 975-981.
- Zhu, B. T. and A. H. Conney (1998). "Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives." Carcinogenesis **19**(1): 1-27.

Figure 1. Chromatographic separation of serum estrogen-Gs using LC-MS/MS
A)



B)



CHAPITRE IV. Profil des œstrogènes, de leurs précurseurs et de leurs métabolites endogènes chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre : association au risque et aux caractéristiques clinico-pathologiques

Résumé

Profil des œstrogènes, de leurs précurseurs et de leurs métabolites endogènes chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre : association au risque et aux caractéristiques clinico-pathologiques

Étienne Audet-Walsh, Johanie Lépine, Jean Grégoire, Marie Plante, Patrick Caron, Bernard Têtu, Pierre Ayotte, Jacques Brisson, Lyne Villeneuve, Alain Bélanger et Chantal Guillemette.

Contexte. Le cancer de l'endomètre survient principalement après la ménopause et son développement est associé aux hormones stéroïdiennes, particulièrement les œstrogènes. Toutefois, la relation entre ces hormones et les caractéristiques clinico-pathologiques n'a jamais été étudiée.

Matériel et Méthodes. À l'aide de méthodes analytiques de dosage par spectrométrie de masse, nous avons mesuré les niveaux circulants de 18 stéroïdes, incluant des précurseurs surrénaliens, des androgènes, des œstrogènes et des dérivés glucuronides. Notre premier objectif était de comparer les niveaux circulants chez des femmes postménopausées atteintes d'un cancer de l'endomètre ($n=126$) à ceux retrouvés chez des femmes postménopausées saines ($n=110$). Dans un deuxième temps, nous voulions étudier si ces niveaux circulants étaient associés à des caractéristiques clinico-pathologiques précises.

Résultats. Après avoir ajusté pour l'âge et l'indice de masse corporelle, la plupart des hormones sont significativement plus élevées dans les cas de cancer. Chez les femmes atteintes d'un cancer de type I, les niveaux d'œstrogènes sont jusqu'à 3 fois plus élevés que chez les femmes saines ($p < 0.05$). Cette augmentation est également associée à un accroissement du risque de cancer. En effet, on associe un risque plus élevé de cancer de l'endomètre à des niveaux élevés d'œstrogènes, mais aussi à des niveaux élevés de leurs précurseurs, soit la testostérone et l'androstènedione (risques relatifs de 4,4 à 13,3; $p \leq 0.0003$). Des niveaux élevés d'œstrogènes et de leurs dérivés glucuronidés sont associés aux cas de cancer de type I, des tumeurs de bas grade et non-invasives, ce qui suggère une association entre ces hormones et l'activité estrogénique tumorale. De plus, l'E₁-S est 2 fois plus élevé chez les patientes ayant eu une récurrence de la maladie que chez les patientes sans récurrence ($p < 0.05$), et est 4,5 fois plus élevé que chez les femmes saines ($p < 0.001$).

Conclusion. Les niveaux circulants des hormones stéroïdiennes sont associés à une augmentation du risque de cancer de l'endomètre. Les œstrogènes représentent de nouveaux biomarqueurs des caractéristiques clinico-pathologiques et, potentiellement, du risque de récurrence du cancer de l'endomètre.

J Clin Endocrinol Metab 96 : E330-E339, 2011

Facteurs d'impact 2010 : 6.495

Profiling of Endogenous Estrogens, their Precursors and Metabolites in Endometrial Cancer Patients: Association with Risk and Relationship to Clinical Characteristics

Étienne Audet-Walsh¹, Johanie Lépine¹, Jean Grégoire², Marie Plante², Patrick Caron¹, Bernard Têtu³, Pierre Ayotte⁴, Jacques Brisson⁴, Lyne Villeneuve¹, Alain Bélanger⁵ and Chantal Guillemette^{1,6†}

¹Centre hospitalier universitaire de Québec (CHUQ) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada. ²Gynecologic Oncology Service, CHUQ, and Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ³Department of Pathology, CHUQ and Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ⁴Department of Social and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ⁵CHUQ Research Center and Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ⁶Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

†Correspondence:

Chantal Guillemette, PhD

CHUQ Research Center, T3-48, 2705 Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel. (418) 654-2296 Fax. (418) 654-2761. E-mail: chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca

Precis: Endogenous steroids are associated with increased risk of endometrial cancer and, interestingly, are also predictive of type I endometrioid cancers, low-grade and non-invasive tumors, and risk of relapse.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Running Title: Sex steroid hormones and endometrial cancer

Key words: Endometrial cancer, Steroid hormones, Mass spectrometry, Estrogens, Relapse, 2-methoxyestradiol.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest: The authors declare no potential conflict of interest.

Abstract

Background: Endometrial cancer (EC) predominantly occurs after menopause and is strongly related to steroid hormones, particularly estrogens. However, the relationship between these hormones and clinical characteristics remains unaddressed.

Experimental design: We analyzed circulating levels of 18 steroids including adrenal precursors, androgens, estrogens and their glucuronide metabolites, using specific and validated methods based on tandem mass spectrometry. Our goals were to compare circulating levels in postmenopausal women with EC (n=126) with those of healthy postmenopausal women (n=110) and to investigate how these hormonal levels relate to clinical characteristics.

Results: After adjustment for potential confounders, most hormones were significantly elevated in EC patients compared to healthy controls. In women with type I cancer, estrogen levels were up to 3-fold those of healthy women ($P<0.05$). These higher levels were associated with an increased risk of cancer, particularly estrogens and their direct precursors, testosterone and androstenedione (odds ratios ranging from 4.4 to 13.3; $P\leq 0.0003$). Elevated circulating levels of estrogens and their metabolites were found in cancer cases with type I endometrioid cancer, low-grade and non-invasive tumor, suggesting an association between these hormones and the tumoral estrogenic activity. In addition, levels of E₁-S in EC patients with relapse were 2-fold over levels of EC patients without relapse ($P<0.05$), and 4.5-fold over those of healthy women ($P<0.001$).

Conclusions: Circulating levels of steroids were associated with increased risk of EC. Estrogens may represent novel biomarkers predictive of clinical characteristics, including evidence for an increased risk of relapse.

Introduction

Increased estrogen exposure has long been known to be an important risk factor for endometrial cancer (Henderson and Feigelson 2000; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Engelsen, Akslen et al. 2009). Several risk factors are associated with increased circulating levels or longer exposures to estrogens including early age at menarche, nulliparity, late age at menopause, and in particular, obesity (Austin, Austin et al. 1991; Henderson and Feigelson 2000; Kaaks, Lukanova et al. 2002; Lukanova, Lundin et al. 2004; Bjorge, Engeland et al. 2007; Allen, Key et al. 2008; Eliassen and Hankinson 2008; McCullough, Patel et al. 2008; Dossus, Allen et al. 2009; Grimbizis and Tarlatzis 2009). Consistent with this notion, high endogenous estrogen levels (estrone [E_1], its sulfate [E_1 -S], and potent estradiol [E_2]) have been associated with endometrial cancer risk (Austin, Austin et al. 1991; Nyholm, Nielsen et al. 1993; Potischman, Hoover et al. 1996; Sherman, Sturgeon et al. 1997; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). Increased circulating levels of their androgenic precursors, testosterone and androstenedione (4-dione), and their adrenal precursor dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) have also been associated with endometrial cancer in most studies (**Figure 1a**) (Austin, Austin et al. 1991; Nyholm, Nielsen et al. 1993; Potischman, Hoover et al. 1996; Sherman, Sturgeon et al. 1997; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). Given that the ovaries cease to produce estrogens at menopause, the contribution of adrenal precursors and androgens to the circulating pool of estrogens becomes much more important; this is particularly true for estrogens produced by adipose tissue, which displays strong aromatase (CYP19) activity (Simpson 2003; Labrie, Luu-The et al. 2005).

There is, however, very little known about the circulating levels of many steroid hormones in the pathway of synthesis and metabolism of estrogens in endometrial cancer. Of interest, some of the estrogens metabolites possess biological activities that differ from the potent estrogen E_2 . For example, 2-methoxyestradiol (2-MeOE₂) is a protective metabolite because it acts as a pro-apoptotic and anti-proliferative compound in tumor cells (**Figure 1b**) (Lakhani, Sarkar et al. 2003). In contrast, glucuronic acid conjugation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (UGT) inactivates estrogens and their metabolites and promotes their elimination (Guillemette, Belanger et al. 2004). The equilibrium between estradiol synthesis and its metabolism may thus play an important role in the development and progression of endometrial cancer, and estrogens quantification in circulation might be indicative of the tumoral activity.

In order to achieve quantification of such steroids, epidemiological studies in postmenopausal women require sensitivity, specificity and reproducibility – “gold-standard” methods incorporating mass spectrometry (MS) are therefore required, as immunological-based methods sometimes lack specificity and show high cross-reactivity (Labrie, Belanger et al. 2007; Stanczyk, Lee et al. 2007; Faupel-Badger, Fuhrman et al. 2010). Because all the previous investigations in the endometrial cancer field quantified steroids levels with immunological methods and because many steroid hormones have not been studied in this context, our initial objective was to establish the most complete hormonal profile using MS-based validated methods. For this purpose, adrenal precursors (DHEA, DHEA-S, 4-dione and androst-5-ene-3 β ,17 β -diol [5-diol]), androgens and their metabolites (testosterone, dihydrotestosterone [DHT], androsterone [ADT], ADT-glucuronide [ADT-G], androstane-3 α , 17 β -diol glucuronides (3 α -diol-3G and 3 α -diol-

17G), and estrogens (E_1 , E_2 , and E_1 -S) were quantified by gas chromatography–MS (GC-MS) or liquid chromatography–MS/MS (LC-MS/MS) in human serum. In addition, we quantified 5 estrogen-glucuronide metabolites: E_1 -3-glucuronide (E_1 -3G), E_2 glucuronidated in position 3 or 17 (E_2 -3G and E_2 -17G), 2-methoxy-estrone-3-glucuronide (2-MeOE $_1$ -3G), and 2-MeOE $_2$ -3-glucuronide (2-MeOE $_2$ -3G), using a recently described method (Caron, Audet-Walsh et al. 2009). Globally, circulating levels of 18 steroid hormones were investigated, and their associated risk with endometrial cancer was established by comparison with a group of healthy women.

It is known that type I endometrioid adenocarcinoma, the most common form (80% of all cancer cases), is associated with estrogens as it appears mostly in a setting of prolonged unopposed estrogen exposure (Bokhman 1983). On the contrary, type II cancers are not associated with signs of hyperestrogenism, but are associated with poorly differentiated cancer cells, decreased sensitivity to hormonal treatment, and poorer prognosis (Bokhman 1983). The observation by Sherman et al. (1997) that circulating E_1 and E_2 levels were higher in type I cases as compared with type II cases (Sherman, Sturgeon et al. 1997) also supports this model. However, a clear relationship between circulating hormones and clinical characteristics of endometrial cancer has yet to be established. Therefore, our second objective was to explore the potential links between circulating endogenous hormone levels and clinical characteristics such as cancer type, grade, myometrium invasion status and recurrence.

Materials and Methods

Study Populations and Specimen Collection

All participants provided written informed consent for use of their specimens, and the current study was reviewed and approved by Institutional Review Boards. Recruitment and blood collection of healthy postmenopausal women have been described (Sandanger, Sinotte et al. 2007). They were recruited at a mammography clinic in Québec City between July 2003 and March 2004. Women were eligible if they were: 1) of postmenopausal status, 2) had no history of healthy problems related to steroid hormone metabolism, 3) no history of hepatic, thyroid or adrenal diseases and 4) had not taken hormone replacement therapy (HRT) during the last 3 months. Blood samples were kept on ice, transported by medical courier, and processed within 2-3 hours. Tubes were centrifuged; aliquots of serum were prepared and stored at -80°C until analysis. In addition, each participant gave demographic and anthropometric information, such as previous oral contraceptive (OC) use and full-term pregnancies, through questionnaires filled by nurses. Endometrial cancer patients were all recruited at l'Hôtel-Dieu de Québec Hospital in Québec City, between 2002 and 2009. They were all of postmenopausal status (no menstrual bleeding for at least 1 year), were all undergoing hysterectomy and had not taken HRT for at least 3 weeks prior blood collection. Serum samples were collected the morning of the hysterectomy and transferred on ice by medical courier to the laboratory. Aliquots were prepared within 2-3 hours and transferred to a freezer at -80°C until analysis. Demographic and anthropometric data for endometrial cancer patients, as OC use or full-term pregnancies, were collected upon enrollment through questionnaires filled by nurses. All of the available biopsies and hysterectomy specimens were reviewed by pathologists to confirm the histopathological

characteristics (type, grade, etc.). A systematic review of patients' medical records and clinical database was done by the gynecologist (J.G.).

Reagents and Materials

Deuterated isotopes of testosterone, DHT, E₁, E₂, 4-dione, ADT-S, and E₁-S were from C/D/N Isotopes, Inc. (Pointe-Claire, QC, Canada). Deuterated isotopes of DHEA, 5-diol, and 3 α -diol-17G were synthesized by the Medicinal Chemistry group of our research center (CHUQ Research Center, Québec, Canada). For estrogen-glucuronide metabolites, deuterated internal standards were synthesized and purified as described (Lepine, Bernard et al. 2004; Caron, Audet-Walsh et al. 2009). All chemicals and solvents were of highest grade. Methanol, ethyl-acetate, hexane, isooctane, 1-chlorobutane, and isoamyl alcohol were obtained from VWR (Montréal, QC, Canada). Pyridine was purchased from Regis Technologies (Morton Grove, IL). Ammonium hydroxide, citric acid, and acetic acid were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Other reagents were purchased from Sigma Aldrich Co (Oakville, ON, Canada).

Quantification of Steroids and Sex Hormone-binding globulin (SHBG) in Human Serum.

All steroids were measured with validated assays and methods previously published by our group. Briefly, the serum levels of DHEA, ADT, 5-diol, 4-dione, testosterone, DHT, E₁, and E₂ were measured with GC/MS, whereas DHEA-S, E₁-S, ADT-G, 3 α -diol-3G, 3 α -diol-17G, E₁-3G, E₂-3G, E₂-17G, 2-MeOE₁-3G, and 2-MeOE₂-3G were measured with LC-MS/MS (Lepine, Bernard et al. 2004; Labrie, Belanger et al. 2006; Labrie, Belanger et al. 2007; Caron, Audet-Walsh et al. 2009). Details on the methods used for steroid quantification, intra and inter assays variations and the percentage of positive serums for

each steroid is provided in the Supplementary materials. For quality controls, serums with known steroid concentrations with deuterated isotopes were included on each run of analysis. SHBG was quantified by radioimmunoassay using the IRMA count SHBG kit (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Mississauga, ON, Canada). Interassay variation was similar to that described by the manufacturer (7.3% and 8%, respectively).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) or PASW statistics 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Age and body mass index (BMI) were compared between cases and controls using a two-sample *t*-test (unpaired). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare means of each log₁₀-transformed hormonal variable between two or more independent groups adjusted for age and BMI, but only untransformed data are shown to facilitate interpretation. ANCOVA was performed between cancer cases and controls with single or multiple adjustments for age, BMI, oral contraceptive use (OC), smoking (ever versus never), and HRT use. Only age and BMI affected significantly circulating hormone levels, and therefore only *P* values from models containing these two covariables are shown. For comparisons among three or more groups, any significant differences revealed by ANCOVA were further investigated using Tukey-Kramer post hoc pairwise comparisons.

Univariate and multiple (unconditional) binary logistic regression (LR) models were used to calculate odds ratios (OR) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) for the risk of endometrial cancer associated with the hormone levels, while controlling for age and BMI. To assess the increase in endometrial cancer risk associated with different levels of a particular hormone in LR, hormones were categorized into tertiles, or separated

only in two groups when levels were close to the lowest limit of quantification (Supplementary Table 2), and ORs were computed relative to the lowest group (reference; OR = 1.00). To test for linear trends (P for trend) in ORs in multivariate logistic regression models, the hormonal variables were modeled as continuous variables (\log_{10} -transformed) after controlling for age and BMI (Szklo and Nieto 2007). For E₁-3G, E₂-3G, 2-MeOE₁-3G, and 2-MeOE₂-3G, LRs were also performed considering two categories: analyte “undetected” (reference) or “detected”.

For correlation analysis, a nonparametric Spearman’s correlation test was performed with correlation coefficients considered significant with a $P \leq 0.05$. Significant differences between correlation coefficients were determined with their 95% CI.

Results

Characteristics of Study Populations

Selected characteristics of participants are presented in **Table 1**. Weight and BMI were significantly different for women with endometrial cancer as compared with healthy women. Cancer patients were older, with a mean age of 65 years as compared with 58 years for healthy postmenopausal women ($P < 0.001$). In contrast, patients were less likely to never having smoked and to have used OC or HRT with progesterone, data that are consistent with previous reports (Potischman, Hoover et al. 1996; Allen, Key et al. 2008). Women with endometrial cancer were well distributed by grades, but were mostly stage 1 and type I cancers (74% and 83%, respectively) with few women with endometrial cancer of stages 2 and 4 ($n = 8$ and 6 , respectively; **Table 1**). The mean follow-up time after recruitment was 2.3 years and 11 patients had cancer relapse.

Risk of Endometrial Cancer and Endogenous Hormone Levels

An increased risk of endometrial cancer was associated with higher circulating levels of almost all hormones examined (**Table 2**). Adjustments for age, BMI, smoking status, and OC or HRT use on hormonal levels were evaluated and, similar to other studies (Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008), only age and BMI significantly affected hormone levels (data not shown). Therefore, all subsequent analyses were adjusted for age and BMI. For example, cancer patients with DHEA and 4-dione in the highest tertile had adjusted ORs of 9.52 (95% CI: 3.92–23.15) and 10.75 (95% CI: 4.31–26.77), respectively ($P < 0.0001$). Similarly, women with the highest levels of testosterone had an increased risk of endometrial cancer with an adjusted OR of 11.83 (95% CI: 4.79–29.23;

$P < 0.0001$). SHBG was inversely associated with endometrial cancer risk (highest tertile, adjusted OR = 0.35; 95% CI: 0.16–0.77; $P = 0.009$).

Risks were higher for E_1 and E_2 , with adjusted ORs of 13.27 (95% CI: 4.86–36.23) and 11.25 (95% CI: 3.85–32.89), respectively ($P < 0.0001$), whereas E_1 -S was associated with an adjusted OR of 4.38 (95% CI: 1.97–9.76; $P = 0.0003$; **Table 2**). E_2 -3G, 2-MeOE $_1$ -3G, and 2-MeOE $_2$ -3G were detected more frequently in cases (75%, 58%, and 59%, respectively) than in controls (45%, 31%, and 25%, respectively), with likelihood ratio chi-squared values with $P < 0.0001$ (data not shown). Increased adjusted ORs associated with these levels were 2.27 (95% CI: 1.25–4.13; $P = 0.007$) for E_2 -3G, 1.12 (95% CI: 1.08–1.18; $P = 0.02$) for 2-MeOE $_1$ -3G, and 3.03 (95% CI: 1.59–5.77; $P = 0.0008$) for 2-MeOE $_2$ -3G (**Table 2**). E_2 -17G was undetected in all serum tested.

Endogenous Hormones Levels in Healthy Postmenopausal Women and Endometrial Cancer Cases

Steroid hormone profiles were then analyzed by types of endometrial cancer (I and II) and compared with those of healthy postmenopausal women (controls). Both types had significantly higher levels of DHEA, 5-diol, and 4-dione as compared with healthy women, with a 1.5-fold median increase. For androgens, both testosterone and ADT-G were significantly elevated in patients with cancer regardless of type, as compared with healthy women. Also, levels of DHT, 3 α -diol-3G, and 3 α -diol-17G were increased in type I cases compared to healthy women. Finally, estrogens and their metabolites were significantly increased, particularly in women with type I cancers by 1.5- to 3.0-fold, along with elevated levels of E_1 in women with type II. Comparisons between the two cancer types revealed few significant differences in adrenal precursors and androgen levels (type I

versus type II, **Table 3**), but significantly higher levels of estrogens were observed in type I endometrial cancer patients as compared with type II endometrial cancer patients.

Correlations between Steroid Hormones in Endometrial Type I Cancer Cases and Healthy Women

As estrogens were much higher in endometrial type I cancer cases, we performed correlation analyzes and compared Spearman's Rho (correlation coefficients) with healthy postmenopausal women. Association between E_1 and E_2 was very strong in both endometrial cancer patients and healthy women, with correlation coefficients of nearly 0.90 for both groups. Interestingly, compared to healthy women, correlation coefficients between estrogens and their metabolites were significantly stronger ($P \leq 0.05$) for endometrial type I cancer patients; for example, coefficients for E_1 with E_1 -S, E_1 -3G or E_2 -3G were of 0.72, 0.84 and 0.61 compared to 0.59, 0.54 and 0.24, respectively (**Figure 2**). Levels of E_1 and E_2 were significantly less correlated with those of DHEA in endometrial cancer cases compared to healthy women; (0.49 vs 0.23; E_1 -DHEA and 0.37 vs 0.14; E_2 -DHEA; $P \leq 0.05$).

Endogenous Hormones Levels and Relationship with Clinical Characteristics

Further analyses, based on tumor grade, revealed that estrogens were significantly elevated in low-grade tumors (1 and 2) as compared with grade 3 tumors (**Table 4**). In addition, E_2 and E_1 -S levels were higher in endometrial cancer patients with no myometrial invasion as compared with those with superficial (<50%) or deep ($\geq 50\%$) myometrial invasion (**Table 4**). Conversely, circulating levels of 2-MeOE₂-3G were significantly higher in endometrial cancer patients with deep myometrial invasion. While no significant difference was found between groups with or without metastatic nodes (data not shown),

E₁-S levels were significantly different between the two sub-groups with regards to the lymphovascular space involvement (presence or absence). Significantly lower levels were found in endometrial cancer patients with lymph vascular space invasion (0.27 ng/ml (0.06–1.20) versus 0.43 ng/ml (0.13–1.55) for endometrial cancer patients without invasion $P=0.046$; data not shown). In addition, elevated E₁-S was associated with endometrial cancer patients with recurrence (0.77 ng/ml versus 0.39 ng/ml; $P<0.05$ for relapse versus no relapse, respectively). Levels of E₁-S in relapsed cancer patients were much higher than levels in healthy women (0.77 ng/ml vs 0.17 ng/ml; **suppl. fig.1**).

Discussion

Our study is the first to establish a detailed profile of 18 steroid hormones in the circulation of postmenopausal women and in the context of endometrial cancer using highly specific and sensitive validated methods based on MS. Previous studies were mainly focused on the parental estrogens (E_2 , E_1 and E_1 -S) and their precursors (DHEA-S, 4-dione, and testosterone) (Austin, Austin et al. 1991; Nyholm, Nielsen et al. 1993; Potischman, Hoover et al. 1996; Sherman, Sturgeon et al. 1997; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). The strongest association with endometrial cancer risk was with E_2 and E_1 , and also for their immediate precursor's 4-dione and testosterone that were highly associated with risks of endometrial cancer. Additionally, this is the first report to demonstrate that estrogens and their metabolites are associated with clinical characteristics of the tumor. Thus, precursors are thought to be required mostly for estrogens production and, subsequently, tumoral activity may be better reflected by measuring circulating levels of estrogens and their metabolites, which are strongly correlated in endometrial cancer patients.

The enhanced circulating levels of steroids in endometrial cancer patients as compared with healthy women is in agreement with previous studies (Austin, Austin et al. 1991; Potischman, Hoover et al. 1996; Sherman, Sturgeon et al. 1997; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). Our observations are also consistent with an enhanced production and metabolic conversion of estrogens, specifically in cancer patients with type I and low-grade lesions (Bokhman 1983; Liu 2007). As compared with levels in healthy women, other endogenous hormones such as DHEA, 5-diol, 4-dione, and testosterone were, however, significantly

increased in both types of cancer, with no significant difference between types I and II lesions. These findings suggest that the synthesis of adrenal precursors and their conversion to androgens in peripheral tissues are modified in patients with type II carcinomas, with no increase in the production of estrogens; as opposed to the enhancement that occurs in type I tumors. This observation may also suggest a role for adrenal precursors and some androgens in women with type II cancers.

ER and PR expression has been reported to be associated with low-grade and early-stage endometrial tumors (Creasman 1993; Rose 1996; Kounelis, Kapranos et al. 2000; Sivridis and Giatromanolaki 2001; Jeon, Park et al. 2006). Consistent with this notion, the prominent elevation of circulating estrogens was associated with type I endometrioid cancer, low-grade tumors that have not invaded the myometrium or the lymph-vascular system. Studies further indicate that the loss of steroid hormone receptors in endometrial carcinomas is associated with a more aggressive phenotype and non-endometrioid carcinomas (Rose 1996; Kounelis, Kapranos et al. 2000; Sivridis and Giatromanolaki 2001). Thus, in women with poorly differentiated tumor cells that have invaded myometrium, lower circulating levels would be expected – which is consistent with what we observed. Higher levels of 2-MeOE₂-3G in relation to deep myometrial invasion are reported for the first time. The 2-methoxy metabolite of E₂ possesses endogenous anti-angiogenic activity (Lakhani, Sarkar et al. 2003), which can induce apoptosis in endometrial cells (Li, Heldin et al. 2004). One hypothesis is that the glucuronidation process that inactivates 2-MeOE₂ is enhanced in more-invasive tumors, allowing progression and preventing accumulation of protective metabolites. This idea is further sustained by the observed overexpression of specific enzymes that participate in 2-MeOE₂

conjugation in endometrial tumors as compared with peritumoral normal tissues (Lepine, Bernard et al. 2004; Lepine, Audet-Walsh et al. 2010). Altogether, results of our investigations suggest a link between clinical characteristics of the tumor and circulating estrogen levels, in which women with the highest levels of endogenous estrogens are likely to have low-grade and less invasive cancers, whereas those with the lowest levels of estrogens tend to have more aggressive cancers.

Finally, estrogens and their metabolites were much strongly correlated in endometrial cancer cases than in healthy postmenopausal women in support of the greater metabolic conversion of estrogens in endometrial cancer. These changes in circulating steroid hormone levels may partly reflect changes in the expression of biosynthesis and metabolic steroid enzymes in the presence of cancer. We and others have recently shown that the sulfatase enzyme, which catalyzes the conversion of E_1 -S to E_1 , and the 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12 enzyme (17β -HSD-12), which converts E_1 to the potent E_2 , are significantly increased in endometrial tumors as compared with levels in peritumoral tissues (Utsunomiya, Ito et al. 2004; Song, Liu et al. 2006; Lepine, Audet-Walsh et al. 2010). Increased correlations between circulating levels of E_1 -S and both E_1 and E_2 also support this observation and, in this context, the synthesis and metabolism of estrogens by tumor cells may be reflected not only *in situ* but also in the systemic circulations. The associations of these hormones with the risk of endometrial cancer and their relationship with tumor characteristics support this hypothesis.

Another key observation is the particularly strong differences in circulating levels of E_1 -S in relapsed cases, which are of 2-fold higher than other cases and 4.5-fold higher than levels of healthy postmenopausal women. E_1 -S is a major source of potent E_2 in

postmenopausal women, and elevation of this endogenous hormone may support proliferation of disseminated cancer cells and perhaps promotes metastasis processes in these women. Our observations, based on circulating levels (this study) and tissular expression (Lepine, Audet-Walsh et al. 2010), sustain a key role for circulating E₁-S and highlight the potential of sulfatase inhibitors in the prevention of endometrial cancer relapse in women with high levels of estrogens (Foster, Reed et al. 2008), although further validation of this approach in a larger population is required.

There are some limitations to our study, including the small size of our population. Therefore, the observed associations between hormonal steroids, estrogens, their metabolites and some clinical characteristics warrant their investigation in larger populations but are consistent with previous studies (Austin, Austin et al. 1991; Nyholm, Nielsen et al. 1993; Potischman, Hoover et al. 1996; Sherman, Sturgeon et al. 1997; Zeleniuch-Jacquotte, Akhmedkhanov et al. 2001; Lukanova, Lundin et al. 2004; Allen, Key et al. 2008). Estimation of risk was based on adjusted ORs since the group of healthy women and those of cancer patients were not matched by age and body mass index, which may have introduced a bias. Another concern is that the antibodies used in radioimmunoassays used in previous studies are likely to cross-react with some estrogen metabolites (Faupel-Badger, Fuhrman et al. 2010; Stanczyk, Jurow et al. 2010). Here, we used MS which is much more specific and leads to lower absolute values for endogenous hormones, and this may explain the variation in hormone levels reported previously.

In conclusion, our approaches based on mass spectrometry allowed the measurement of a more comprehensive profile of circulating steroid hormones and provided novel information related to endometrial cancer. Indeed, circulating levels of endogenous

steroids were associated with an increased risk of both types of endometrial cancers and estrogens were predictive of type I endometrioid cancers, low-grade and non-invasive tumors. Therefore, these hormones may represent new biomarkers of clinical characteristics of the tumor, including evidence for an increased risk of relapse in women with high endogenous E₁-S levels.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-68964). E.A.-W. and J.L. are both recipients of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award from CIHR. C.G. holds a Canada Research Chair in Pharmacogenomics. We thank Christine Flageole for helpful discussion and the Clinical Research Services of the CHUQ Research Center for advice on statistical analyses.

References

- Allen, N. E., T. J. Key, et al. (2008). "Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." Endocr Relat Cancer **15**(2): 485-497.
- Austin, H., J. M. Austin, Jr., et al. (1991). "Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution." Cancer Res **51**(2): 568-572.
- Bjorge, T., A. Engeland, et al. (2007). "Body size in relation to cancer of the uterine corpus in 1 million Norwegian women." Int J Cancer **120**(2): 378-383.
- Bokhman, J. V. (1983). "Two pathogenetic types of endometrial carcinoma." Gynecol Oncol **15**(1): 10-17.
- Caron, P., E. Audet-Walsh, et al. (2009). "Profiling Endogenous Serum Estrogen and Estrogen-Glucuronides by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." Anal Chem.
- Creasman, W. T. (1993). "Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer." Cancer **71**(4 Suppl): 1467-1470.
- Dossus, L., N. Allen, et al. (2009). "Reproductive risk factors and endometrial cancer: The European prospective investigation into cancer and nutrition." Int J Cancer.
- Eliassen, A. H. and S. E. Hankinson (2008). "Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies." Adv Exp Med Biol **630**: 148-165.
- Engelsen, I. B., L. A. Akslen, et al. (2009). "Biologic markers in endometrial cancer treatment." Apmis **117**(10): 693-707.
- Faupel-Badger, J. M., B. J. Fuhrman, et al. (2010). "Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 292-300.
- Foster, P. A., M. J. Reed, et al. (2008). "Recent developments of steroid sulfatase inhibitors as anti-cancer agents." Anticancer Agents Med Chem **8**(7): 732-738.
- Grimbizis, G. F. and B. C. Tarlatzis (2009). "The use of hormonal contraception and its protective role against endometrial and ovarian cancer." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.

- Guillemette, C., A. Belanger, et al. (2004). "Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview." Breast Cancer Res **6**(6): 246-254.
- Henderson, B. E. and H. S. Feigelson (2000). "Hormonal carcinogenesis." Carcinogenesis **21**(3): 427-433.
- Jeon, Y. T., I. A. Park, et al. (2006). "Steroid receptor expressions in endometrial cancer: clinical significance and epidemiological implication." Cancer Lett **239**(2): 198-204.
- Kaaks, R., A. Lukanova, et al. (2002). "Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(12): 1531-1543.
- Kounelis, S., N. Kapranos, et al. (2000). "Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature." Mod Pathol **13**(4): 379-388.
- Labrie, F., A. Belanger, et al. (2006). "Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women." J Steroid Biochem Mol Biol **99**(4-5): 182-188.
- Labrie, F., A. Belanger, et al. (2007). "Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration." J Steroid Biochem Mol Biol **103**(2): 178-188.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2005). "Is dehydroepiandrosterone a hormone?" J Endocrinol **187**(2): 169-196.
- Lakhani, N. J., M. A. Sarkar, et al. (2003). "2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent." Pharmacotherapy **23**(2): 165-172.
- Lepine, J., E. Audet-Walsh, et al. (2010). "Circulating Estrogens in Endometrial Cancer Cases and Their Relationship with Tissular Expression of Key Estrogen Biosynthesis and Metabolic Pathways." J Clin Endocrinol Metab.
- Lepine, J., O. Bernard, et al. (2004). "Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5222-5232.
- Li, L., N. E. Heldin, et al. (2004). "Induction of apoptosis or necrosis in human endometrial carcinoma cells by 2-methoxyestradiol." Anticancer Res **24**(6): 3983-3990.

- Liu, F. S. (2007). "Molecular carcinogenesis of endometrial cancer." Taiwan J Obstet Gynecol **46**(1): 26-32.
- Lukanova, A., E. Lundin, et al. (2004). "Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women." Int J Cancer **108**(3): 425-432.
- McCullough, M. L., A. V. Patel, et al. (2008). "Body mass and endometrial cancer risk by hormone replacement therapy and cancer subtype." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(1): 73-79.
- Nyholm, H. C., A. L. Nielsen, et al. (1993). "Plasma oestrogens in postmenopausal women with endometrial cancer." Br J Obstet Gynaecol **100**(12): 1115-1119.
- Potischman, N., R. N. Hoover, et al. (1996). "Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer." J Natl Cancer Inst **88**(16): 1127-1135.
- Rose, P. G. (1996). "Endometrial carcinoma." N Engl J Med **335**(9): 640-649.
- Sandanger, T. M., M. Sinotte, et al. (2007). "Plasma concentrations of selected organobromine compounds and polychlorinated biphenyls in postmenopausal women of Quebec, Canada." Environ Health Perspect **115**(10): 1429-1434.
- Sherman, M. E., S. Sturgeon, et al. (1997). "Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas." Mod Pathol **10**(10): 963-968.
- Simpson, E. R. (2003). "Sources of estrogen and their importance." J Steroid Biochem Mol Biol **86**(3-5): 225-230.
- Sivridis, E. and A. Giatromanolaki (2001). "Prognostic aspects on endometrial hyperplasia and neoplasia." Virchows Arch **439**(2): 118-126.
- Song, D., G. Liu, et al. (2006). "Expression of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study." J Steroid Biochem Mol Biol **101**(2-3): 136-144.
- Stanczyk, F. Z., J. Jurow, et al. (2010). "Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(4): 903-906.
- Stanczyk, F. Z., J. S. Lee, et al. (2007). "Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1713-1719.
- Szklo, M. and F. J. Nieto (2007). Epidemiology : beyond the basics. Boston Jones and Bartlett Publishers.

Utsunomiya, H., K. Ito, et al. (2004). "Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma." Clin Cancer Res **10**(17): 5850-5856.

Zeleniuch-Jacquotte, A., A. Akhmedkhanov, et al. (2001). "Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study." Br J Cancer **84**(7): 975-981.

Table 1. Demographic characteristics of endometrial cancer cases and healthy women

Characteristics	Cases (n=126)			Controls (n=110)			P value
	mean	±	SD	mean	±	SD	
Age (years)	64.8	±	9.1	58.3	±	5.6	<0.001
Weight (kg)	74.0	±	18.9	68.8	±	14.0	0.003
Height (cm)	158.2	±	6.4	159.6	±	5.2	n.s.
BMI (Kg/m ²)	29.6	±	7.4	27.0	±	5.4	<0.001
	n	%		n	%		
Full-term pregnancy ^a							
Never	37	31		27	25		0.22
Ever	79	63		83	75		
Missing	10	8		0	0		
OC use ^a							
Never	78	63		19	17		<0.001
Ever	40	33		91	83		
Missing	8	5		0	0		
Smoking ^a							
Never	71	57		48	44		0.013
Current	12	9		8	7		
Ex-smokers	35	28		54	49		
Missing	8	6		0	0		
HRT ^a							
Never	80	65		40	36		<0.001
Ever	38	30		70	64		
Missing	8	5		0	0		
Clinical Characteristics (cases only)						n	%
Type of cancer			Type I ^b	104	83		
			Type II ^b	22	17		
Grade			1	49	39		
			2	48	38		
			3	29	23		
Stage			1	93	74		
			2	8	6		
			3	19	15		
			4	6	5		
Invasion of myometrium			No invasion	17	13		
			< 50%	78	62		
			≥ 50%	31	25		
Lymph-vascular space invasion			Absence	97	77		
			Presence	27	21		
			Undetermined	2	2		
Presence of metastatic nodes			No	111	88		
			Yes	15	12		
Relapse of cancer ^c			No	115	91		
			Yes	11	9		

^aBased on unconditional logistic regression of never versus ever.

^bType I only comprises endometrioid carcinomas. Included in "type II" are: papillary serous carcinoma, mixed carcinoma, clear cells carcinoma, undifferentiated carcinoma and malignant mixed Müllerian tumor.

^cMean follow-up time: 2.3 years.

BMI: body mass index; HRT: hormonal replacement therapy; OC: oral contraceptive; ns, not significant; SD: standard deviation.

Table 2. Odds ratios and 95% confidence intervals (CIs) for endometrial cancer by serum levels of sex steroids and SHBG

Hormones	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	Adjusted ^a OR (95% CI)	P value	P trend ^b
Adrenal precursors						
DHEA (ng/ml)						
≤1.47	19 (16)	37 (34)	1.00	1.00		
>1.47–2.32	22 (19)	36 (33)	1.19 (0.55–2.56)	1.50 (0.61–3.69)	0.38	
>2.32	75 (65)	37 (34)	3.95 (2.00–7.78)	9.52 (3.92–23.15)	<0.0001	<0.0001
DHEA-S (µg/ml)						
≤0.45	33 (28)	37 (34)	1.00	1.00		
>0.45–0.81	38 (33)	36 (33)	1.18 (0.62–2.28)	1.36 (0.64–2.86)	0.42	
>0.81	45 (39)	37 (34)	1.36 (0.72–2.59)	2.43 (1.14–5.20)	0.02	0.012
5-diol (pg/ml)						
≤230	30 (26)	56 (51)	1.00	1.00		
>230	86 (74)	54 (49)	2.97 (1.70–5.20)	4.40 (2.22–8.72)	<0.0001	-
4-dione (ng/ml)						
≤0.37	14 (12)	40 (36)	1.00	1.00		
>0.37–0.51	25 (22)	33 (30)	2.17 (0.9–4.82)	2.71 (1.09–6.72)	0.03	
>0.51	77 (66)	37 (34)	5.95 (2.88–12.26)	10.75 (4.31–26.77)	<0.0001	<0.0001
Androgens						
Testosterone (ng/ml)						
≤0.11	10 (9)	43 (39)	1.00	1.00		
>0.11–0.16	20 (17)	30 (27)	2.87 (1.18–6.99)	3.98 (1.47–10.76)	0.007	
>0.16	86 (74)	37 (34)	9.99 (4.54–21.99)	11.83 (4.79–29.23)	<0.0001	<0.0001
DHT (pg/ml)						
≤20	17 (15)	42 (38)	1.00	1.00		
>20–40	44 (38)	35 (32)	3.11 (1.52–6.36)	4.15 (1.81–9.50)	0.0008	
>40	55 (47)	33 (30)	4.12 (2.03–8.37)	7.36 (3.15–17.21)	<0.0001	0.0005
ADT-G (ng/ml)						
≤9.80	20 (17)	37 (34)	1.00	1.00		
>9.80–17.05	24 (21)	36 (33)	1.23 (0.58–2.61)	1.38 (0.60–3.18)	0.45	
>17.05	72 (62)	37 (34)	3.60 (1.84–7.06)	4.72 (2.16–10.31)	0.0001	<0.0001
3α-diol-3G (ng/ml)						
≤0.57	53 (46)	55 (50)	1.00	1.00		
>0.57	63 (54)	55 (50)	1.19 (0.71–2.00)	1.36 (0.75–2.46)	0.31	-
3α-diol-17G (ng/ml)						
≤0.25	15 (13)	58 (53)	1.00	1.00		
>0.25	99 (87)	52 (47)	7.36 (3.81–14.24)	8.70 (4.01–18.87)	<0.0001	-
SHBG (nmol/L)						
≤61.90	64 (58)	37 (34)	1.00	1.00		
>61.90–101.40	28 (25)	36 (33)	0.45 (0.24–0.85)	0.45 (0.22–0.94)	0.03	
>101.40	19 (17)	37 (34)	0.30 (0.15–0.59)	0.35 (0.16–0.77)	0.009	0.031
Estrogens and their metabolites						
E ₁ (pg/ml)						
≤15.51	6 (5)	37 (34)	1.00	1.00		
>15.51–20.87	12 (10)	36 (33)	2.06 (0.70–6.07)	1.77 (0.57–5.53)	0.33	
>20.87	97 (84)	37 (34)	16.17 (6.30–41.47)	13.27 (4.86–36.23)	<0.0001	<0.0001
E ₂ (pg/ml)						
≤2.43	6 (6)	37 (34)	1.00	1.00		
>2.43–4.62	32 (28)	36 (33)	5.48 (2.05–14.68)	4.24 (1.51–11.96)	0.006	
>4.62	78 (67)	37 (34)	13.00 (5.04–33.52)	11.25 (3.85–32.89)	<0.0001	<0.0001
E ₁ -S (ng/ml)						
≤0.123	14 (12)	37 (34)	1.00	1.00		
>0.123–0.245	20 (17)	36 (33)	1.47 (0.65–3.34)	1.18 (0.49–2.87)	0.71	
>0.245	82 (71)	37 (34)	5.86 (2.83–12.12)	4.38 (1.97–9.76)	0.0003	<0.0001
E ₁ -3G (pg/ml)						
≤15.30	30 (26)	37 (34)	1.00	1.00		

>15.30–28.90	32 (28)	35 (32)	1.13	(0.57–2.23)	1.29	(0.61–2.72)	0.51	
>28.90	54 (47)	38 (35)	1.75	(0.93–3.31)	1.54	(0.73–3.23)	0.25	0.0062
E₂-3G (pg/ml)								
≤2.5	40 (34)	64 (58)	1.00		1.00			
>2.5	76 (66)	46 (42)	2.64	(1.54–4.53)	2.27	(1.25–4.13)	0.007	-
2-MeOE₁-3G (pg/ml)								
≤2.5	57 (49)	77 (70)	1.00		1.00			
>2.5	59 (51)	33 (30)	2.42	(1.40–4.17)	1.12	(1.08–1.18)	0.02	-
2-MeOE₂-3G (pg/ml)								
≤2.5	58 (50)	87 (79)	1.00		1.00			
>2.5	58 (50)	23 (21)	3.78	(2.11–6.80)	3.03	(1.59–5.77)	0.0008	-

^aAdjusted for age and BMI.

^bTo test for a trend, the hormonal variables were computed as a continuous variable.

ADT was not quantified in healthy postmenopausal women and, therefore, no ORs were calculated.

Table 3. Median hormonal levels (10th and 90th percentile) between endometrial cancer types and healthy postmenopausal women

Circulating hormones	Healthy women (n = 110)		Type I (n = 104)		Type II (n = 22)		Fold differences	
	Median	10 th -90 th	Median	10 th -90 th	Median	10 th -90 th	Type I vs. Healthy	Type II vs. Healthy
Adrenal precursors								
DHEA	ng/ml	1.91 (0.84-4.34)	2.99 (1.25-8.6)	2.33 (1.27-5.76)	2.33 (1.27-5.76)	1.57*** (0.21-1.18)	1.22**	1.29
DHEA-S	µg/ml	0.60 (0.23-1.29)	0.68 (0.27-1.29)	0.47 (0.21-1.18)	0.47 (0.21-1.18)	1.13**	0.78	1.45*
5-diol	pg/ml	230.00 (100.00-499.00)	355.82 (160.77-789.09)	323.21 (137.38-657.71)	323.21 (137.38-657.71)	1.55***	1.41**	1.10
4-dione	ng/ml	0.44 (0.24-0.80)	0.68 (0.38-1.32)	0.53 (0.36-1.04)	0.53 (0.36-1.04)	1.55***	2.10**	1.28
Androgens and their metabolites								
Testosterone	ng/ml	0.14 (0.06-0.24)	0.23 (0.12-0.52)	0.24 (0.10-0.36)	0.24 (0.10-0.36)	1.64***	1.71**	0.96
DHT	pg/ml	30.00 (10.00-70.00)	37.35 (18.02-88.93)	34.23 (12.03-147.59)	34.23 (12.03-147.59)	1.25**	1.14	1.09
ADT	pg/ml	n/a	154.36 (72.03-374.74)	112.37 (37.80-301.30)	112.37 (37.80-301.30)	n/a	n/a	1.38*
ADT-G	ng/ml	14.16 (5.35-28.79)	23.08 (7.86-51.30)	18.63 (5.97-57.78)	18.63 (5.97-57.78)	1.63***	1.32*	1.24
3α-diol-3G	ng/ml	0.57 (0.25-1.19)	0.63 (0.25-1.47)	0.53 (0.13-2.05)	0.53 (0.13-2.05)	1.11*	0.93	0.57
3α-diol-17G	ng/ml	0.25 (0.25-1.43)	0.63 (0.23-1.12)	0.35 (0.13-1.23)	0.35 (0.13-1.23)	2.52**	1.40	1.80
Estrogens and their metabolites								
E ₁	pg/ml	18.36 (10.01-35.45)	38.10 (18.46-87.79)	25.34 (11.27-49.41)	25.34 (11.27-49.41)	2.08***	1.38*	1.50*
E ₂	pg/ml	3.35 (1.00-9.67)	8.76 (3.18-22.99)	4.48 (1.63-14.08)	4.48 (1.63-14.08)	2.61***	1.34	1.96*
E ₁ -S	ng/ml	0.17 (0.04-0.52)	0.45 (0.12-1.57)	0.26 (0.06-0.61)	0.26 (0.06-0.61)	2.65***	1.53	1.73*
E ₁ -3G	pg/ml	22.55 (2.70-52.29)	33.25 (11.17-84.43)	17.20 (6.38-37.37)	17.20 (6.38-37.37)	1.48**	1.31	1.93*
E ₂ -3G	pg/ml	2.50 (2.50-15.35)	7.47 (2.50-20.51)	2.50 (0.96-9.73)	2.50 (0.96-9.73)	2.99*	1.00	2.99*
2-MeOE ₁ -3G	pg/ml	2.50 (2.50-6.67)	4.16 (2.50-29.52)	2.50 (0.52-6.56)	2.50 (0.52-6.56)	1.66***	1.00	1.66*
2-MeOE ₂ -3G	pg/ml	2.50 (2.50-10.26)	2.72 (2.41-12.10)	2.50 (2.47-11.40)	2.50 (2.47-11.40)	1.09	1.00	1.09
SHBG	nmol/L	82.95 (25.73-136.29)	49.30 (17.98-104.34)	90.95 (35.88-138.33)	90.95 (35.88-138.33)	0.59**	1.10	0.54

n/a: not available

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ for the indicated comparisons.

For statistical analysis, values were log₁₀-transformed and adjusted for age and BMI before comparisons were made, but only untransformed data are shown.

Table 4. Median hormonal levels (10th and 90th percentile) analyzed by endometrial cancer grades and by myometrium invasion status

Circulating hormones		Grade 1 (n = 49)		Grade 2 (n = 48)		Grade 3 (n = 29)		1 vs. 3 ^a		2 vs. 3 ^a		P _{trend}	
		Median		Median		Median		10 th -90 th		10 th -90 th		P _{trend}	
Estrogens and their metabolites													
E ₁	pg/ml	33.66	(17.15-88.49)	39.74	(18.42-94.81)	25.58	(13.42-54.31)	ns	0.020	ns	0.020	ns	ns
E ₂	pg/ml	7.84	(2.87-25.21)	9.51	(3.45-22.64)	4.86	(1.78-16.95)	0.037	0.016	0.037	0.016	0.043	0.043
E ₁ -S	ng/ml	0.47	(0.14-2.13)	0.47	(0.13-1.21)	0.23	(0.06-0.83)	0.002	0.017	0.002	0.017	0.0075	0.0075
E ₁ -3G	pg/ml	28.30	(11.53-91.11)	41.20	(10.90-84.85)	19.20	(8.35-49.17)	0.019	0.028	0.019	0.028	0.042	0.042
E ₂ -3G	pg/ml	7.98	(2.48-27.48)	8.33	(2.50-16.95)	2.50	(1.04-11.29)	0.005	0.016	0.005	0.016	0.014	0.014
2-MeOE ₁ -3G	pg/ml	3.98	(2.50-34.30)	4.18	(2.50-26.95)	2.50	(1.26-14.68)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2-MeOE ₂ -3G	pg/ml	3.50	(2.33-10.96)	2.51	(2.44-17.15)	2.50	(2.37-7.06)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SHBG													
	nmol/L	44.85	(14.70-105.40)	65.4	(21.70-105.85)	74.00	(27.04-131.06)	0.048	ns	0.048	ns	ns	ns
Circulating hormones													
		No invasion (n = 17)		Invasion of myometrium <50% (n = 78)		Invasion of myometrium ≥50% (n = 31)		10 vs. ≥50%		10 vs. ≥50%		P _{trend}	
		Median		Median		Median		10 th -90 th		10 th -90 th		P _{trend}	
Estrogens and their metabolites													
E ₁	pg/ml	54.82	(16.42-154.27)	33.58	(16.39-74.93)	32.95	(20.17-81.79)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E ₂	pg/ml	13.34	(4.00-189.08)	6.63	(2.73-22.15)	6.65	(2.46-20.33)	0.003	0.012	0.003	0.012	ns	0.011
E ₁ -S	ng/ml	0.64	(0.16-3.79)	0.39	(0.10-1.31)	0.39	(0.14-1.18)	0.022	ns	0.022	ns	ns	ns
E ₁ -3G	pg/ml	39.50	(10.66-188.4)	24.60	(9.78-75.40)	27.50	(13.46-84.22)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E ₂ -3G	pg/ml	5.13	(2.00-46.50)	5.32	(1.60-21.55)	7.64	(2.50-16.34)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2-MeOE ₁ -3G	pg/ml	2.50	(2.50-39.54)	2.63	(1.72-23.60)	4.09	(2.50-29.48)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2-MeOE ₂ -3G	pg/ml	2.50	(2.02-21.18)	2.50	(2.17-11.00)	4.57	(2.50-15.96)	ns	0.043	ns	0.043	ns	ns

^aP values for comparisons between endometrial cancer grades. For statistical analysis, all values were log₁₀-transformed and adjusted for age and BMI before comparisons were made, but only untransformed data are shown. Only P ≤ 0.05 are shown for pair-wise comparisons. Note that P values for comparisons between grades 1 and 2 are not shown because none were significant. ANCOVA were performed between clinical characteristics status considering only type I endometrial cancer cases or considering both types together, with similar conclusions. Therefore, only analyses with both types are shown.

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of steroidogenesis and the hormones that were measured in the circulation of postmenopausal women. Steroid hormones classified as “adrenal precursors” are in ovals, those classified as “androgens” are in rectangles, and those classified as “estrogens” are in triangles (A). The oxidative pathways mediated by cytochrome P450s (CYPs) that lead to the sequential transformation of 2-OHE₁/E₂ by the Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) to form 2-MeOE₁/E₂ are presented (B). Note that the 4-hydroxy metabolism pathway of estrogens, associated with carcinogenic effects, was not assessed in the present study. Enzymes participating in the synthesis and metabolic transformation of hormones are indicated. G: glucuronide metabolites; SULTs: sulfotransferases; 3 β -HSD: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 17 β -HSD: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; CYP19: aromatase enzyme; 5 α -red: 5 α -reductase; UGTs: UDP-glucuronosyltransferases.

Figure 2. Spearman’s correlation coefficients among endogenous hormone levels in healthy postmenopausal women and endometrial type I cancer cases. All correlations over 0.18 were shown to be statistically significant with a $P < 0.05$, and when over 0.35 with a $P < 0.0001$. Grey color background and asterisks (*) indicates $P < 0.05$ between correlation coefficients of cancer cases and healthy controls.

Figure 1

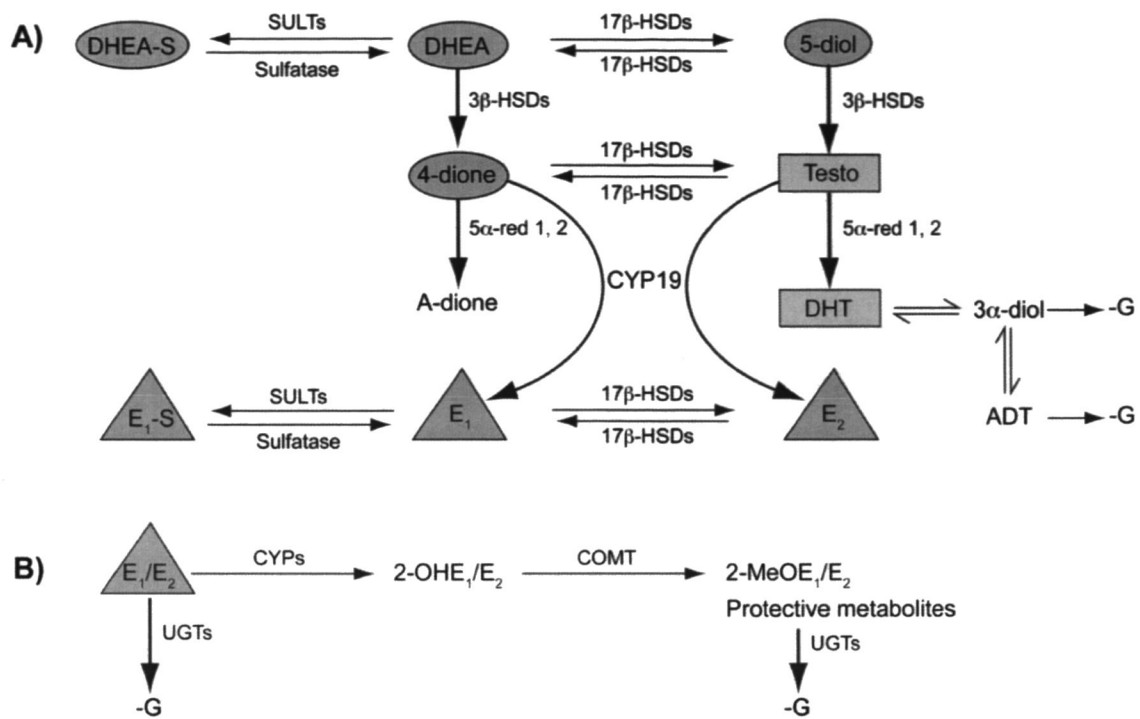


Figure 2

	Group	E ₁	E ₂	E ₁ -S	E ₁ -3G	E ₂ -3G	DHEA
E ₁	H	1	0.88	0.59	0.54	0.24	0.49
	EC	1	0.87	0.72*	0.84*	0.61*	0.23*
E ₂	H		1	0.54	0.47	0.23	0.37
	EC		1	0.71*	0.79*	0.59*	0.14*
E ₁ -S	H			1	0.48	0.28	0.28
	EC			1	0.75*	0.57*	0.11
E ₁ -3G	H				1	0.22	0.25
	EC				1	0.72*	0.12
E ₂ -3G	H					1	0.19
	EC					1	0.09

H: Healthy women; EC: Type I endometrial cancer patients.

SUPPLEMENTARY MATERIALS:

Description of methods for quantification of steroids. Unconjugated steroids were extracted with 0.50 mL of serum to which 500 μ L of 0.5 M sodium acetate was added. Then, 50 μ L of a methanolic solution containing a mixture of deuterated internal standards was added and mixed by vortexing for 1 min followed by the addition of 3 mL of 1-chlorobutane. Samples were centrifuged at $250 \times g$ at 4°C for 10 min, and the organic extracts were collected and purified on a LC-Si SPE column (Varian Inc., Palo Alto, CA). Columns were washed with 6 mL of ethyl acetate/hexane (1:9; v/v). Elution was performed with 4 mL ethyl acetate/hexane (50:50; v/v), which was evaporated at 50°C with nitrogen. The dried residue was reconstituted in 0.5 mL of ethyl acetate and vortexed for 15 sec. An aliquot of 100 μ L was used for the 4-dione assay by GC-MS, and the remaining extract was stored for the analysis of all other unconjugated steroids. For derivatization of DHEA, ADT, 5-diol, testosterone, DHT, E₁, and E₂, 50 μ L of pentafluorobenzyl chloride in ethyl acetate (1:10; w/v) and 500 μ L of pyridine in ethyl acetate (1:99; v/v) were added to the extracted serum before incubating at 60°C for 30 min. After evaporation of the reagent mixture, 1 mL of 0.5 M NaHCO₃ was added and incubated for 15 min at ambient temperature; 2 mL of hexane was then added, and the samples were vortexed for 2 min and left at room temperature for 10 min. After evaporation of the organic phase at 50°C with nitrogen, the final extract was reconstituted in 50 μ L of isooctane for injection into the GC-MS. The GC-MS system (HP5973 quadrupole MS equipped with a chemical ionization source) uses a 50% phenyl-methyl polysiloxane DB-17HT capillary column (internal diameter, 30 mm \times 0.25 mm; film thickness, 0.15 μ m; Chromatographic Specialties, Brockville, ON, Canada) with helium as the carrier gas. For derivatization of 4-dione, extracted human serum was mixed with 100 μ L of a solution of 1 mg pentafluorobenzyl

hydroxylamine/mL pyridine before incubating at 60°C for 30 min. Samples were cooled to room temperature for 5 minutes, and then 3 mL of hexane were added to each sample. The mixture was vortexed for 5 sec and then evaporated at 50°C under nitrogen. The final extract was reconstituted in 50 μ L isooctane for injection into the GC-MS.

For extraction of the sulfated steroids DHEA-S and E₁-S, 100 μ L of human serum was mixed with 2 mL of PBS buffer (pH 7.0). Fifty microliters of a methanolic solution containing the deuterated steroid internal standards was added to each sample. Samples were transferred to Oasis HLB SPE 60 mg columns (Waters, Milford, MA) and washed with water and methanol/water (10:90; v/v). Elution was performed using 4 mL of MeOH, and the eluate was evaporated at 35°C with nitrogen. The dried residue was reconstituted in 125 μ L of methanol/water (50:50; v/v) and then filtered through a 0.2- μ m nylon filter. The reconstituted sample (20 μ L) was diluted with 0.5 mL of methanol/water (50:50; v/v) containing 5 mM ammonium acetate and 0.01% acetic acid for DHEA-S, and the remaining volume was used for E₁-S quantification. The LC-MS/MS system (model API3200 or API4000; Applied Biosystems, Concord, ON, Canada) was equipped with a turbo ion-spray source. For DHEA-S, a Columbus C18 column (100 \times 3.2 mm with a 5- μ m particle size; Phenomenex, Torrance, CA) was used, and for E₁-S, a Luna C18 column (100 \times 4.6 mm with a 3.5- μ m particle size; Phenomenex) was used. For DHEA-S, the mobile phase was water/methanol (25:75; v/v) with a flow rate of 0.5 mL/min. Gradient conditions for E₁-S are described in Supplementary Table 1.

For extraction of the glucuronidated androgens ADT-G, 3 α -diol-3G, and 3 α -diol-17G, human serum (500 μ L) was mixed with 500 μ L of water by vortexing, and 100 μ L of a methanolic solution containing the deuterated steroid internal standard was added to each

sample. Tubes were vortexed again after the addition of 1.5 mL of NaH_2PO_4 /citric acid buffer (pH 2.2). Samples were transferred to Strata X 60 mg SPE columns (Phenomenex) and washed with water and a solution of methanol/water (50:50; v/v). The analytes were eluted with 4 mL of methanol/water (80:20; v/v) containing 10 mM ammonium acetate. The eluates were then evaporated at 45°C with nitrogen, and the dried residue was reconstituted in 100 μL of methanol/water (50:50; v/v) containing 0.01% acetic acid prior to LC-MS/MS analysis with a Synergy Hydro-RP column (150 \times 4.6 mm with 4- μm particle size; Phenomenex) for ADT-G, 3 α -diol-3G, and 3 α -diol-17G (see Supplementary Table 1 for gradient conditions).

For the analysis of estrogen-G, 2 mL of human serum was mixed with 1 mL of PBS and 30 μL of a solution containing deuterated internal standards. A solid-phase and a liquid-liquid extraction were performed to isolate estrogen-G. The first extraction was done with Strata X 200 mg (Phenomenex) cartridges preconditioned with methanol and PBS. Loaded cartridges were washed with water and then with methanol/water (40:60; v/v), 1% (v) acetic acid. The washed cartridges were dried under vacuum, and samples were eluted with methanol/water (80:20; v/v) containing 1% (v) ammonium hydroxide. The solvents were evaporated under nitrogen at 45°C, and residues were reconstituted in 1 mL of water/formic acid (99:1; v/v). Three milliliters of 1-chlorobutane/isoamyl alcohol (85:15; v/v) was added to each sample and mixed. Organic extracts were collected after centrifugation (260 $\times g$ for 10 min at 4°C), and an additional 3 mL of 1-chlorobutane/isoamyl alcohol (85:15; v/v) was added to the aqueous phase. After centrifugation, organic extracts were collected, and both extracts were pooled and evaporated under nitrogen. The dried residues were reconstituted in 100 μL of

methanol/water (15:85; v/v) prior to LC-MS/MS analysis with a Luna-Phenyl-Hexyl column (75 × 4.6 mm with 3- μ m particle size; Phenomenex; for gradient details, see Supplementary Table 1).

A calibration standard curve with six different concentrations prepared with charcoal-adsorbed human serum, covering a range from 100- to 200-fold over the lower limit of quantification (LLOQ) was added to each run of analyses. For DHEA, 4-dione, 5-diol, testosterone, DHT, E₁, E₁-S, E₂, E₁-3G, E₂-3G, E₂-17G, 2-MeOE₁-3G, and 2-MeOE₂-3G, a deuterated internal standard was added to each serum sample before extraction. For DHEA-S, ADT-S-D₂ was used as the internal standard. For ADT-G, 3 α -diol-3G, and 3 α -diol-17G, 3 α -diol-17G-D₃ was used as the internal standard. Intra- and interassay coefficients of variation are described in Supplementary Table 2. Most hormones were above the limit of quantification in all sera, except for E₂-3G, 2-MeOE₁-3G, and 2-MeOE₂-3G, which were not detected in 39%, 55%, and 58% of sample, respectively. When steroid hormone concentrations were below the LLOQ, if their chromatographic peaks were above the limit of detection (signal-to-noise > 3), extrapolated values of calibration curve standard were used. Undetected values were reported as LLOQ/2. E₂-17G was not detected in any of the subjects.

Supplementary Table 1. Conditions for chromatographic separation of steroids

Hormone	Time (min)	% Solvent A	% Solvent B	% Solvent C
E ₁ -S	Initial	60	40	
	2.0	34	66	
	2.1	5	95	
	2.5	5	95	—
	2.51	60	40	
	4.0	60	40	
Androgen-Gs	Initial	48	50	2
	7.0	48	50	2
	7.1	4	94	2
	7.5	4	94	2
	7.6	48	50	2
	10	48	50	2
Estrogen-Gs	Initial	10	90	
	5	30	70	
	10	95	5	—
	12	10	90	

For estrone-sulfate (E₁-S), mobile phases were as follows: Solvent A, water with 0.1% hydroxide ammonium; Solvent B, MeOH with 0.1% hydroxide ammonium. Flow rate was 1 mL/min. For androgen-glucuronides (androgen-Gs), mobile phases were as follows: Solvent A, water with 1 mM formate ammonium; Solvent B, MeOH with 1 mM formate ammonium; and Solvent C, tetrahydrofuran. Flow rate was 1 mL/min. For estrogen-glucuronides (estrogen-Gs), mobile phases were as follows: Solvent A, 0.005% ammonium hydroxide in methanol; Solvent B, 0.005% ammonium hydroxide in water. Flow rate was 0.9 mL/min. Min: minute.

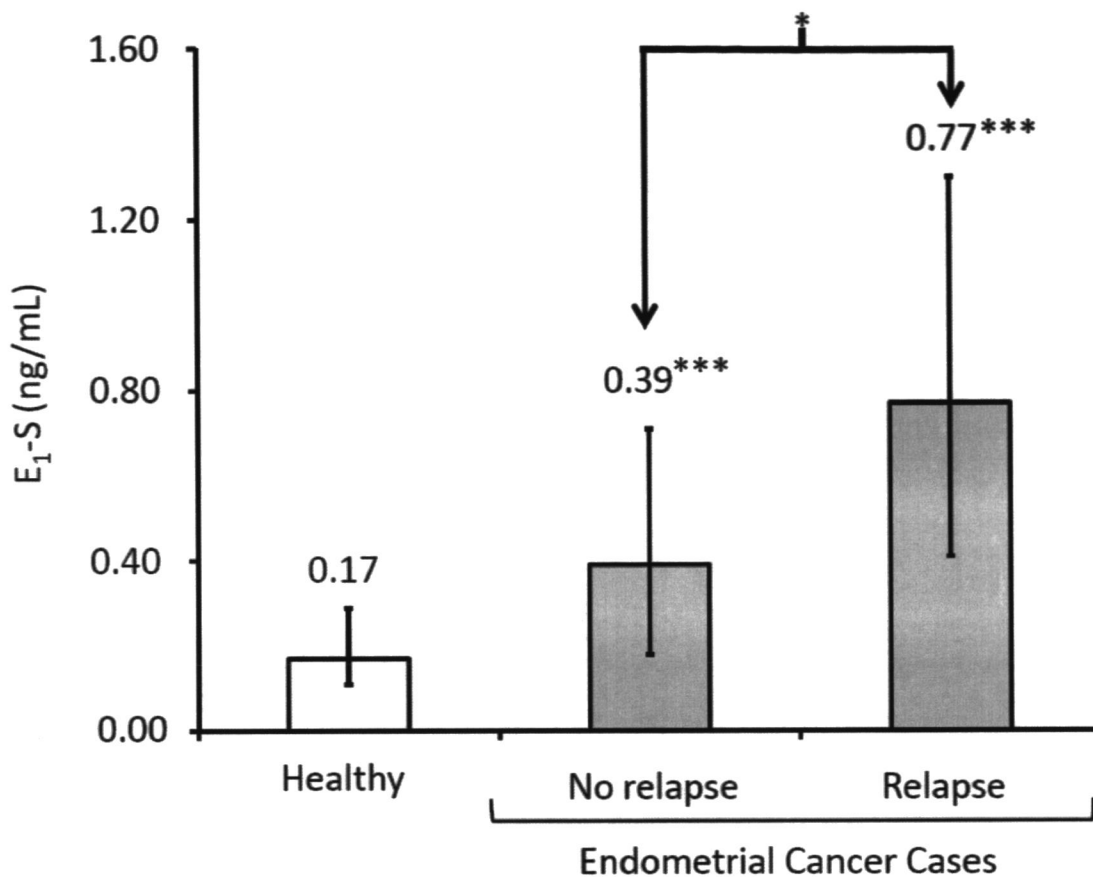
Supplementary Table 2. Coefficients of variation and detected proportions for steroids in human serum by GC-MS and LC-MS/MS

Steroid hormones	Methods	Coefficient of variation (%)		Detected in human serum (%) ¹
		Intra-assay	Inter-assay	
Adrenal precursors				
DHEA	GC-MS	6.48	1.81	100
DHEA-S	LC-MS/MS	10.00	8.75	100
5-diol	GC-MS	6.28	1.01	100
4-dione	GC-MS	3.28	0.76	100
Androgens and their metabolites				
Testosterone	GC-MS	2.34	4.71	99
DHT	GC-MS	1.45	1.28	92
ADT	GC-MS	4.24	2.63	100
ADT-G	LC-MS/MS	3.88	3.30	100
3 α -diol-3G	LC-MS/MS	2.94	2.34	73
3 α -diol-17G	LC-MS/MS	4.47	5.00	70
Estrogens and their metabolites				
E ₁	GC-MS	9.19	7.97	98
E ₂	GC-MS	5.64	1.07	88
E ₁ -S	LC-MS/MS	2.81	6.44	93
E ₁ -3G	LC-MS/MS	2.58	6.72	95
E ₂ -3G	LC-MS/MS	3.38	3.88	63
E ₂ -17G	LC-MS/MS	3.79	4.76	0
2-MeOE ₁ -3G	LC-MS/MS	8.27	6.46	47
2-MeOE ₂ -3G	LC-MS/MS	4.66	4.76	48

¹Percentages are for all the serums tested, including cancer cases and healthy postmenopausal women.

GC-MS: gas chromatography/mass spectrometry; LC-MS/MS: liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Supplemental Figure 1. Elevation of circulating levels of E₁-S in endometrial cancer cases, particularly in relapsed cases



Medians \pm quartiles 25% and 75% are shown. *** $P < 0.001$ as compared with controls; * $P < 0.05$ between cancer cases with and without relapse.

CHAPITRE V. Plusieurs polymorphismes des gènes SRD5A sont associés à une récurrence biochimique du cancer de la prostate après prostatectomie radicale

Résumé

Plusieurs polymorphismes des gènes *SRD5A* sont associés à une récurrence biochimique du cancer de la prostate après prostatectomie radicale

Étienne Audet-Walsh*, Judith Bellemare*, Geneviève Nadeau, Louis Lacombe, Yves Fradet, Vincent Fradet, Shu-Pin Huang, Bo-Ying Bao, Pierre Douville, Hugo Girard¹, Chantal Guillemette[†] et Éric Lévesque[†].

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente; [†] Co-auteur sénior.

Contexte. Notre objectif était d'étudier la relation entre les variations héréditaires au sein des gènes *SRD5A*, qui sont impliqués dans la biosynthèse de la DHT, et le risque de récurrence biochimique après prostatectomie radicale.

Matériel et Méthodes. Nous avons étudié deux cohortes composées respectivement de 526 Caucasiens (taux de récurrence de 25%) et de 320 Taïwanais (taux de récurrence de 36%) atteints d'un cancer de la prostate cliniquement localisé. Le temps de suivi médian était de 88,8 et de 30,8 mois, respectivement. Dix-neuf SNP des gènes *SRD5A1* et *SRD5A2* ont été génotypés. Leur impact sur la récurrence biochimique a été évalué par des analyses de survie de Kaplan-Meier et de régression de Cox.

Résultats. Après ajustement pour les caractéristiques clinico-pathologiques, on a observé que 4 SNP (rs2208532, rs12470143, rs523349 et le rs4952197) sont significativement associés à la récurrence chez les deux cohortes. Le variant non-synonyme V⁸⁹L du gène *SRD5A2* (rs523349C) confère l'augmentation la plus importante du risque de récurrence biochimique, soit d'un facteur de 2,87 (intervalle de confiance à 95% [IC95%], 2,07-4,00, $p = 4 \times 10^{-10}$, taux de récurrence de 48%). De plus, chez les Caucasiens, la combinaison des allèles mineurs de deux SNP, le rs518673T situé dans le gène *SRD5A1* et le rs12470143A situé dans le gène *SRD5A2*, est associée à une diminution supplémentaire du taux de récurrence chez les porteurs de trois ou quatre de ces allèles protecteurs (rapport de cote : 0,37; IC95%, 0,19-0,71; $p = 0,003$; taux de récurrence =16%) comparativement aux patients dépourvus de ces allèles (taux de récurrence =38%). Toutefois, la relation entre les polymorphismes des gènes *SRD5A* et la résistance à la thérapie de privation d'androgènes où la mort n'a pas été étudiée étant donné la rareté de ces événements dans les cohortes étudiées.

Conclusion. Notre étude est la première à montrer que plusieurs variations génétiques situées dans les gènes *SRD5A1* et *SRD5A2* sont associées significativement à la récurrence biochimique après prostatectomie radicale.

Eur Urol 60 : 1226-1234, 2011

Facteurs d'impact 2010 : 8.843

***SRD5A* Polymorphisms and Biochemical Failure after Radical Prostatectomy**

Étienne Audet-Walsh^{1*}, Judith Bellemare^{1*}, Geneviève Nadeau^{1,2}, Louis Lacombe², Yves Fradet², Vincent Fradet², Shu-Pin Huang³, Bo-Ying Bao⁴, Pierre Douville², Hugo Girard¹, Chantal Guillemette^{1†} and Éric Lévesque^{1,2†}

*These authors contributed equally.

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada. ²L'Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ Research Center, Laval University, Québec, Canada. ³Department of Urology, Faculty of Medicine, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan. ⁴Department of Pharmacy, China Medical University, Taichung, Taiwan.

Running head: *SRD5A* and PSA failure after RP.

†Correspondence:

Éric Lévesque, MD, PhD, FRCPC or Chantal Guillemette, PhD

CHUQ Research Center, T3-48, 2705 Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel. (418) 654-2296 Fax. (418) 654-2761

E-mail: eric.levesque@crchuq.ulaval.ca or chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca

Key words: Prostate cancer, germline polymorphisms, biochemical recurrence, 5 α -reductase, *SRD5A* genes.

Reproduced with permission from *European Urology*, Copyright 2011, All rights reserved.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest: EL, CG, LL and YF have been named inventors on a patent application owned by Laval University in work related to this study.

Abbreviations

ADT: androgen-deprivation therapy; BCR: biochemical recurrence; DHT: 5 α -dihydrotestosterone; HR: hazard ratio; htSNP: haplotype-tagging SNP; PCa: prostate cancer; PSA: prostate-specific antigen; *SRD5A1*: 5 α -reductase type 1; *SRD5A2*: 5 α -reductase type 2; RP: radical prostatectomy; SNP: Single nucleotide polymorphism; T: Testosterone; TNM: Tumor/Nodes/Metastasis staging system.

Take Home Message

Common polymorphisms in *SRD5A1* and *SRD5A2* genes are significantly associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy and represent independent prognostic factors in clinically localized PCa.

Abstract

Background. The relationship between inherited germline variations in the 5 α -reductase pathways of androgen biosynthesis (*SRD5A*) and the risk of biochemical recurrence (BCR) after radical prostatectomy (RP) remains an unexplored area. **Objective.** Determine the link between germline variations in *SRD5A1* and *SRD5A2* genes and BCR. **Design, Settings and Participants.** We studied retrospectively two independent cohorts composed of 526 Caucasian (25% BCR) and 320 Asian men (36% BCR) with pathologically organ-confined prostate cancer (PCa) who had a median follow-up of 88.8 and 30.8 months after surgery, respectively. **Measurements.** Patients were genotyped for 19 htSNPs in *SRD5A1* and *SRD5A2* genes and their prognostic significance on prostate-specific antigen recurrence was assessed using Kaplan-Meier analysis and Cox regression model. **Results and limitations.** After adjusting for all clinicopathologic risk factors, four SNPs (rs2208532, rs12470143, rs523349 and rs4952197) were associated with BCR in both Caucasians and Asians. The strongest effect was conferred by the *SRD5A2* V89L nonsynonymous SNP (rs523349C) with a HR of 2.87 (95% CI=2.07-4.00; $P=4 \times 10^{-10}$; 48% BCR). In addition, in Caucasians the combination of 2 SNPs, rs518673T in *SRD5A1* and rs12470143A in *SRD5A2* was associated with a reduced BCR rate for carriers of 3-4 alleles (HR=0.37; 95% CI=0.19-0.71; $P=0.003$; 16% BCR) compared to non-carriers (38% BCR), whereas the *SRD5A2* rs12470143A was significant in Asians (HR=0.46; 95% CI=0.28-0.73; $P=0.001$). Limitations of our study include few events of androgen-deprivation resistance or cancer-specific death. **Conclusion.** Our study is the first to show positive associations of several *SRD5A1* and *SRD5A2* variations as independent predictors of biochemical recurrence after RP.

Introduction

Prostate Cancer (PCa) is one of the most common cancer and the second leading cause of cancer death in North American men (Jemal, Siegel et al. 2007). The most important risk factors are age, ethnicity, and genetic factors (Steinberg, Carter et al. 1990; Platz, Rimm et al. 2000; Gronberg 2003). Patients with localized and locally advanced PCa are frequently treated with radical prostatectomy (RP). However, it is estimated that over 30% of men undergoing RP will have disease relapse, also referred to as biochemical recurrence (BCR) as the first clinical indication of rising serum level of prostate-specific antigen (PSA) (Roberts, Blute et al. 2001).

Currently, the tumoral stage, the Gleason score, and pre-treatment serum PSA are the most important factors influencing both the likelihood of more extensive disease and the probability of subsequent relapse following RP (D'Amico, Whittington et al. 2000). However, the risk of disease recurrence greatly differs between individuals and the heterogeneity in clinical behaviour further emphasizes the need to find novel markers of relapse. This is particularly true in low- and intermediate-risk patients, where the known prognostic factors do not predict adequately the risk of recurrence.

The conversion of T by 5 α -reductases (encoded by *SRD5A1* and *SRD5A2* genes) leads to DHT, the most potent androgen receptor (AR) endogenous agonist in prostate cells, which has been clearly involved in PCa development. SRD5A2 is the major 5 α -reductase enzyme expressed in the prostate compared to SRD5A1 (Thomas, Lazier et al. 2005). However, while the expression of SRD5A2 decreases in prostate cancer cells, SRD5A1 is increased in tumoral tissues (Thomas, Lazier et al. 2005; Titus, Gregory et al. 2005; Stanbrough, Bubley et al. 2006; Montgomery, Mostaghel et al. 2008). This imbalance in the expression

of *SRD5A* genes in PCa tumors illustrates the complex relation between 5 α -reductases, DHT synthesis and PCa progression. Therefore, genetic alterations in these pathways are expected to alter hormonal homeostasis and likely influence PCa recurrence.

To date, common polymorphisms such as those in sex-steroids biosynthesis pathways have been extensively studied in relation to risk of PCa (Cussenot, Azzouzi et al. 2007; Park, Tanner et al. 2007; Mononen and Schleutker 2009; Setlur, Chen et al. 2010). However, almost all of these studies did not address the association between polymorphisms in genes regulating hormonal exposure with PCa recurrence. Indeed, a rising PSA value after RP is a relevant clinical end-point because it dictates the potential needs for additional oncologic treatment, in the form of radiotherapy or androgen-deprivation therapy.

We hypothesized that genetic variation in the androgen biosynthesis *SRD5A* genes may alter systemic hormone bioavailability, *de novo* DHT synthesis and influence the tumoral microenvironment exposure to hormones, which could modify the risk of BCR after RP. This is based on the fact that *SRD5A* genes have a well characterized physiological role in DHT homeostasis, are associated with PCa risk (Salam, Ursin et al. 2005; Cussenot, Azzouzi et al. 2007) and have become standard targets for chemoprevention (Andriole, Bostwick et al. 2010) and androgen-deprivation therapy (ADT), highlighting their significant role in PCa progression. To investigate the link between germline variations in *SRD5A* genes and BCR, we conducted a retrospective genetic association study of PCa recurrence using cohorts of Caucasian and Asian men with localized prostate cancer who underwent RP.

Patients and Methods

Clinical Data and Outcome Collections

Clinical characteristics of studied cohorts are shown in **Table 1**. The first cohort is mostly composed of Caucasian men who underwent RP by open surgery at l'Hôtel-Dieu de Québec Hospital (QC, Canada) between February 1999 and December 2002. The second cohort is an Asian population of 320 localized PCa cases recruited from 3 Taiwan medical centers between 1998 and 2008. Each participant provided written consent before surgery for the analysis of their genome. The local research ethical committees approved the research protocol.

DNA Isolation and Genetic Analysis

Screening for SNPs associated with BCR was first performed in Caucasians. Polymorphisms in *SRD5A* genes were chosen according to one or more of the following criteria: i) to be likely functional, ii) to have previously been associated with PCa, and iii) to explain most of the haplotype diversity in the CEU (Utah residents with Northern and Western European Ancestry) *Hapmap* population (see **Supplementary information**). For both *SRD5A* genes, a region covering all the exons, introns and 5 kb of the 5' and 3' sections of the genes was screened using a haplotype tagging SNPs (htSNPs) strategy to maximize coverage (Stephens, Smith et al. 2001).

Blood was collected on the morning of a preoperative clinic visit and genomic DNA was purified using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Ontario, Canada). For genotyping of SNPs in *SRD5A* genes, PCR amplifications were performed using Sequenom iPLEX matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. For oligos sequence, see **Table S1**. Negative controls were present for every

run of analyses and random sample duplicates were successfully performed for 5% of the study cohorts.

Statistical Analysis

To analyse association of SNPs with BCR, each htSNP was considered using a 3 categories model since the function of most htSNPs remains unknown (major allele homozygote, heterozygote and minor allele homozygote). Cox regression was performed on each htSNP with adjustment for clinico-pathological variables. All co-variables were treated as categorical, and for PSA level, Gleason scores and stage, they were used similarly to what has been described in the D'Amico risk classification (D'Amico, Whittington et al. 2000). There was $\leq 3\%$ missing values for all covariables, except for margin status which had 13% missing data in Asians. The use of PSA level as a continuous variable resulted in similar conclusions (data not shown). The censoring variable was BCR, which was defined in Caucasians as 1) two consecutive PSA values $\geq 0.3 \mu\text{g/L}$, 2) one PSA value $\geq 0.3 \mu\text{g/L}$ followed by ADT or RT ($n=30$), and 3) a last-recorded PSA value $\geq 0.3 \mu\text{g/L}$ after prostatectomy, in agreement with PSA cut-off value as described elsewhere (Amling, Bergstralh et al. 2001; Nielsen and Partin 2007). In Asians, PSA recurrence was defined as two consecutive PSA measurements of $>0.2\text{ng/mL}$ at an interval of >3 mo, and the PSA level of $>0.2\text{ng/mL}$ at the first follow-up was considered the date of recurrence. Kaplan-Meier analyses (log-rank) and univariate Cox regression analyses were also processed for every variation, but only results for those significantly associated with BCR in Cox regression multivariate analysis are shown. Because we tested multiple SNPs ($n=19$), false-discovery rates (q values) were calculated to determine the degree to which the tests were prone to false-positives using the R *QVALUE* package

(<http://genomics.princeton.edu/storeylab/qvalue/>) (Storey and Tibshirani 2003). Predictive accuracy of each model was estimated by calculating the concordance index and related confidence interval as previously described (Therneau and Grambsch 2000). Statistical analyses were performed using PASW statistics 17 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Overall, 19 htSNPs distributed across the *SRD5A1* and *SRD5A2* genes were initially studied in the largest cohort of 526 Caucasians with localized PCa. The htSNPs strategy allowed us to portray 109 associated genetic variations in *SRD5A* genes (**Table S2**). Positive associations were then replicated in a second population, composed exclusively of Asians (n=320) (**Table 1**).

Analyses in Caucasian cohort

As expected, the risk of BCR was greatly influenced by clinical and pathological characteristics (**Figure 1A** and **Table S3**), but also by genetic factors. In multivariate analysis, 2 SNPs in *SRD5A1* and 4 SNPs in *SRD5A2* were significantly associated with the risk of BCR ($P \leq 0.05$), while 1 SNP in *SRD5A2* was significantly associated with BCR in univariate analyses and near significance in multivariate analyses (rs676033). In addition, to adjust for multiple testing, we used the false-discovery rates (q values) calculation among all significant findings; all q -values were ≤ 0.10 . Relative frequencies of SNPs of interest in cancer patients, genetic linkage, and their corresponding hazard ratios (95% CI) as well as Kaplan-Meier curves and log-rank P values are displayed in **Figures 1B, 2** and **Table 2**.

Five *SRD5A* variants were significantly or nearly significantly associated with an elevated risk of BCR with the strongest effect observed for the rs523349C V89L variation in *SRD5A2* (HR=2.04; 95%CI:1.16-3.59; $P=0.014$). Of note, this HR was similar or superior to the one observed for PSA at diagnosis, a Gleason score of 7, positive surgical margins or pathological stages. Conversely, no association was revealed for the *SRD5A2* coding variation A49T (rs9282858). For the *SRD5A1* gene, rs166050C was associated with

a higher risk of BCR (HR=1.89; 95%CI:1.02-3.50; $P=0.042$) and rs518673T with a reduced risk (HR=0.66; 95%CI:0.45-0.95; $P=0.026$). In addition, by combining the protective alleles (rs518673T in *SRD5A1* and the rs12470143A in *SRD5A2*), the effect was shown to be additive with maximal protection conferred by 3 or 4 alleles (HR=0.37; 95%CI:0.19-0.71; $P=0.003$) (**Figure 3A**). However, no other interaction was observed between other *SRD5A1* and *SRD5A2* SNPs (data not shown).

Analyses in Asian cohort

In Asian patients, 5 of the 7 studied SNPs were significantly associated with the risk of BCR, 1 conferring a protective effect (rs12470143; **Table 2** and **Figure 3B**) and 4 increasing the risk of BCR (rs676033, rs2208532, rs523349 and rs4952197; **Table 2** and **Figure 4**). We also revealed a significant association between the cSNP variant rs523349C V89L, inferred by its associated SNP in Asians (rs2208532), with a HR of 1.72 (95%CI: 1.08-2.74; $P=0.023$; **Table 2**). As observed for Caucasians, the rs12470143A was also associated with reduced risk of BCR (HR=0.46; 95%CI: 0.28-0.73; $P=0.001$) (**Figure 3B**).

Combined Analyses

Significant associations between htSNPs in *SRD5A* genes increasing risk of BCR are shown for both cohorts in **Figure 4**. With both cohorts combined, the 4 SNPs in the *SRD5A2* gene associated with an increased risk of BCR are significant with P between 6×10^{-5} and 4×10^{-10} . Data further support that these polymorphisms are independent predictors of BCR, as shown by the absence of significant associations between the positive SNPs and PSA level at diagnosis, Gleason score, surgical margins and stage (**Table S4**). The addition of each htSNP to the baseline clinicopathologic model predicting BCR modestly increased the concordance index of each model. The maximal increase –

2% – in concordance index was noted for SNP rs4952197 [base model = 0.742 (95%CI = 0.711 – 0.774); base model + SNP = 0.761 (95%CI = 0.729 – 0.792)].

Discussion

Risk of PCa progression following RP differs greatly between individuals, and the variability in clinical outcome further emphasizes the need to find novel biomarkers to distinguish the progressive from non-progressive disease (Swanson, Yu et al. 2011). Our study is the first to show positive associations of multiple *SRD5A1* and *SRD5A2* variations with BCR after RP.

Four germline polymorphisms in *SRD5A* genes were consistently associated with a modified risk of BCR in both Caucasian and Asian patients with localized PCa after prostatectomy, either by conferring a reduced or a higher risk, independently of known clinical and pathological predictors. This association was also observed when using biopsy Gleason and clinical staging as covariates, indicative of the strength of the association between *SRD5A* genetic and BCR in pre-operative or post-operative clinical settings.

One of the best characterized polymorphism in the *SRD5A2* gene, the functional V89L variant, has been associated with prostate cancer risk and to biochemical recurrence, although with conflicting results (Shibata, Garcia et al. 2002; Cicek, Conti et al. 2004; Salam, Ursin et al. 2005; Cussenot, Azzouzi et al. 2007; Neslund-Dudas, Bock et al. 2007; Li, Coates et al. 2010). In this study, the strongest association was between the *SRD5A2* V89L allele and an increased risk of BCR in both Caucasians and Asians. This result is in agreement with Shibata and colleagues who observed poorer prognosis among men with the low activity LL (Shibata, Garcia et al. 2002). On the other hand, for the other nonsynonymous *SRD5A2* A49T variant (rs9282858), our results are consistent with a recent meta-analysis evaluating PCa risk, as we observed no significant association with BCR after RP (Pearce, Van Den Berg et al. 2008).

For the first time, a protective effect on BCR by two unlinked *SRD5A1* (rs518673T) and *SRD5A2* (rs12470143A) genetic variants was revealed. In Caucasians, a reduced BCR rate was shown to be maximal in patients with ≥ 3 of these protective *SRD5A* alleles, whereas only the *SRD5A2* variant was shown to be protective in Asians, likely due to a lower frequency of the *SRD5A1* allele in that population.

Association of both *SRD5A* genes with BCR after RP is not unexpected. Indeed, they encode for key enzymes involved in testosterone biotransformation, and represent the rate-limiting step in DHT synthesis. Functional polymorphisms in *SRD5A* genes may perhaps affect the production rate of DHT and the corresponding local exposure to androgens of androgen-responsive cells, which is the basis underlying chemoprevention strategy. Our results also support a role for both *SRD5A* genes on BCR rates after RP. Indeed, even though the 5 α -reductase type 2 is the major enzyme in the normal prostate, the switch in *SRD5A1* and *SRD5A2* expression during prostate cancer carcinogenesis clearly supports that the regulation of both genes is crucial in PCa relapse (Thomas, Lazier et al. 2005; Titus, Gregory et al. 2005; Stanbrough, Bubley et al. 2006; Montgomery, Mostaghel et al. 2008). Androgen deprivation therapy (ADT) is the standard of care for metastatic PCa and is also used to treat asymptomatic patients with PSA recurrence after failed primary therapy (RP), further reinforcing the initial androgen dependency of these cells (Harris, Mostaghel et al. 2009). Furthermore, *Finasteride*, a 5 α -reductase type 2 inhibitor, and *Dutasteride*, a dual 5 α -reductase inhibitor targeting both 5 α -reductase type 1 and type 2, have been shown to be effective chemopreventive medications reducing by almost 20-25% the risk of PCa incidence (Thompson, Goodman et al. 2003; Andriole, Bostwick et al. 2010). Therefore, in addition to current clinical and pathological variables, *SRD5A* genetic

information might help discriminate who is at increased or decreased risk of BCR. These findings may possibly have also an impact on hormonal manipulation in early, advanced and relapsed PCa disease settings.

We can speculate that the identified htSNPs in *SRD5A* genes may influence active androgen (DHT) bioavailability and affect exposure of residual and disseminated cancer cells remaining after RP. Therefore, these genetic variations potentially drive hormone-dependent cells into cell replication, and subsequently lead to interindividual differences in recurrence. The protective *SRD5A2* allele rs12470143A, linked to a reduced BCR, was associated with lower levels of 3 α -diol-3-glucuronide, one of the biomarker of DHT synthesis *in situ* (Jiang, Tang et al. 2010). These observations would suggest that this variation in *SRD5A2*, or variation(s) in strong linkage disequilibrium, might be associated with a reduced conversion from T to DHT, which is required for growth of prostate cancer cells. Additional investigations are however required to characterize the underlying biological mechanisms driving the positive associations of inherited germline variations in 5 α -reductases with BCR.

Limitations include the retrospective nature of the study and few events of androgen-deprivation resistance or cancer-specific death. Statistical power may also be limited when assessing predictive accuracy for BCR as the baseline clinicopathologic model predicted well BCR. This is likely due to the fact that all validated cancer characteristics were well ascertained. Thus, adding 2% predictive accuracy to a model with a germline mutation may not be statistically significant in our models but appears of important clinical value. In fact, findings contribute to moving the field of genetic epidemiology to the field of prognostic markers after treatment of prostate cancer with curative intent. Strengths of the study are

associated with a large number of PCa patients from 2 independent cohorts, long-term follow-up and RP as the sole initial therapeutic intervention.

Conclusions

In summary, this study reveals that specific inherited variations are potential molecular candidates as novel predictive biomarkers of BCR after RP. In addition, beyond the prediction of patient outcome, findings strongly imply that the *SRD5A* sex-steroid biosynthesis pathway is involved in prostate cancer progression at early stages.

Acknowledgements

The authors wish to thank Céline Veilleux and Hélène Hovington for their help with data collection, Mario Harvey for helpful discussion and the biostatistics services of the CHUQ research center. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (C.G.; CIHR), the Canada Research Chair Program (C.G.) and the Prostate Cancer Research Foundation of Canada (E.L.). E.A.W. and J.B. are both recipients of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award. E.L. is recipient of a CIHR clinician–scientist salary award.

References

- Amling, C. L., E. J. Bergstralh, et al. (2001). "Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point?" J Urol **165**(4): 1146-1151.
- Andriole, G. L., D. G. Bostwick, et al. (2010). "Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer." N Engl J Med **362**(13): 1192-1202.
- Cicek, M. S., D. V. Conti, et al. (2004). "Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR." Prostate **59**(1): 69-76.
- Cussenot, O., A. R. Azzouzi, et al. (2007). "Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: the hidden face of estrogens." J Clin Oncol **25**(24): 3596-3602.
- Cussenot, O., A. R. Azzouzi, et al. (2007). "Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors." Eur Urol **52**(4): 1082-1087.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, et al. (2000). "Utilizing predictions of early prostate-specific antigen failure to optimize patient selection for adjuvant systemic therapy trials." J Clin Oncol **18**(18): 3240-3246.
- Gronberg, H. (2003). "Prostate cancer epidemiology." Lancet **361**(9360): 859-864.
- Harris, W. P., E. A. Mostaghel, et al. (2009). "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion." Nat Clin Pract Urol **6**(2): 76-85.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2007). "Cancer statistics, 2007." CA Cancer J Clin **57**(1): 43-66.
- Jiang, J., N. L. Tang, et al. (2010). "Association of SRD5A2 variants and serum androstane-3alpha,17beta-diol glucuronide concentration in Chinese elderly men." Clin Chem **56**(11): 1742-1749.
- Li, J., R. J. Coates, et al. (2010). "Steroid 5-(Aba et al.)-reductase Type 2 (SRD5a2) gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a HuGE review." Am J Epidemiol **171**(1): 1-13.

- Mononen, N. and J. Schleutker (2009). "Polymorphisms in genes involved in androgen pathways as risk factors for prostate cancer." J Urol **181**(4): 1541-1549.
- Montgomery, R. B., E. A. Mostaghel, et al. (2008). "Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth." Cancer Res **68**(11): 4447-4454.
- Neslund-Dudas, C., C. H. Bock, et al. (2007). "SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness." Prostate **67**(15): 1654-1663.
- Nielsen, M. E. and A. W. Partin (2007). "The impact of definitions of failure on the interpretation of biochemical recurrence following treatment of clinically localized prostate cancer." Rev Urol **9**(2): 57-62.
- Park, J. Y., J. P. Tanner, et al. (2007). "Association between polymorphisms in HSD3B1 and UGT2B17 and prostate cancer risk." Urology. **70**(2): 374-379.
- Pearce, C. L., D. J. Van Den Berg, et al. (2008). "No association between the SRD5A2 gene A49T missense variant and prostate cancer risk: lessons learned." Hum Mol Genet **17**(16): 2456-2461.
- Platz, E. A., E. B. Rimm, et al. (2000). "Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals." J Natl Cancer Inst **92**(24): 2009-2017.
- Roberts, S. G., M. L. Blute, et al. (2001). "PSA doubling time as a predictor of clinical progression after biochemical failure following radical prostatectomy for prostate cancer." Mayo Clin Proc **76**(6): 576-581.
- Salam, M. T., G. Ursin, et al. (2005). "Associations between polymorphisms in the steroid 5-alpha reductase type II (SRD5A2) gene and benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." Urol Oncol **23**(4): 246-253.
- Setlur, S. R., C. X. Chen, et al. (2010). "Genetic variation of genes involved in dihydrotestosterone metabolism and the risk of prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 229-239.
- Shibata, A., M. I. Garcia, et al. (2002). "Polymorphisms in the androgen receptor and type II 5 alpha-reductase genes and prostate cancer prognosis." Prostate **52**(4): 269-278.

- Stanbrough, M., G. J. Bubley, et al. (2006). "Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer." Cancer Res. **66**(5): 2815-2825.
- Steinberg, G. D., B. S. Carter, et al. (1990). "Family history and the risk of prostate cancer." Prostate **17**(4): 337-347.
- Stephens, M., N. J. Smith, et al. (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." Am J Hum Genet. **68**(4): 978-989.
- Storey, J. D. and R. Tibshirani (2003). "Statistical significance for genomewide studies." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9440-9445.
- Swanson, G. P., C. Yu, et al. (2011). "Validation of Postoperative Nomograms in Prostate Cancer Patients with Long-term Follow-up." Urology.
- Therneau, T. and P. Grambsch (2000). Modeling survival data: extending the Cox model. New York: Springer-Verlag.
- Thomas, L. N., C. B. Lazier, et al. (2005). "Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer." Prostate **63**(3): 231-239.
- Thompson, I. M., P. J. Goodman, et al. (2003). "The influence of finasteride on the development of prostate cancer." N Engl J Med **349**(3): 215-224.
- Titus, M. A., C. W. Gregory, et al. (2005). "Steroid 5alpha-reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer." Clin Cancer Res **11**(12): 4365-4371.

Table 1. Clinical and Pathological Characteristics of Study Populations

	Caucasians Localized PCa (n=526)	Asians Localized PCa (n=320)
Age at diagnosis (years)		
Mean	63.3	65.7
SD	6.8	6.6
Range	43.5-80.7	44.0-79.0
Follow up Median (months)		
	88.8	30.8
Biochemical Recurrence (%)		
	130 (24.7)	116 (36.3)
PSA at diagnosis (ng/mL)		
≤10	362 (69)	132 (43)
>10-20	103 (20)	105 (34)
>20	56 (11)	72 (23)
Pathological Gleason score		
≤ 6	158 (31)	122 (39)
7	244 (48)	149 (48)
≥8	107 (21)	41 (13)
Pathological T stage*		
pT = T2	313 (60)	209 (67)
pT = T3	195 (37)	95 (30)
pT = T4	13 (3)	8 (3)
Nodal invasion		
N0	481 (92)	290 (93)
N+	44 (8)	21 (7)
Neoadjuvant hormone therapy		
Yes	31 (6)	0 (0)
No	495 (94)	320 (100)
Adjuvant hormone therapy		
Yes	30 (6)	0 (0)
No	496 (94)	320 (100)
Margin Status		
Negative	368 (70)	196 (71)
Positive	154 (30)	82 (30)

PSA, prostate-specific antigen; tumor (T); node (N). *For Caucasians, there was 131 individuals with pT=T3a and 77 individuals with pT≥T3b.

Table 2. Genotypes frequencies of polymorphisms in *SRD5A* genes and their association with BCR

PCa	Genes	SNPs	MAF (%)	no BCR ² (number of patients)	BCR ² (number of patients)	BCR rate ² (%)	Cox Multivariate Analysis ³			q value	
							Genotype	HR	95% CI		P value
Caucasians (n=526)	<i>SRD5A1</i>	rs518673	33	43/189/159	9/50/70	17/21/31	CC	1.00	reference		
		rs166050	25	20/152/222	14/46/70	41/23/24	CT/TT TT/TC CC	0.66 1.00 1.89	0.45 0.95 reference 1.02 3.50	0.026 0.042	0.08 0.08
		rs2208532	44	76/178/140	38/55/37	33/24/21	AA/AG GG GG/GC CC GG/GA AA GG GA/AA GG/GA AA	1.00 1.58 1.00 2.04 1.00 1.65 1.00 0.67 1.00 1.95	reference 1.05 2.39 reference 1.16 3.59 reference 0.96 2.83 reference 0.46 0.99 reference 1.04 3.67	0.029 0.014 0.070 0.041 0.039	0.08 0.08 0.10 0.08 0.08
	<i>SRD5A2</i>	rs523349 (V89L)	25	23/139/223	15/47/68	39/25/23	CC	1.00	reference		
		rs676033	27	31/145/218	17/47/66	35/24/23	CT/TT TT/TC CC	0.97 1.00 1.84	0.60 1.54 reference 0.62 5.52	0.88 0.27	0.29 0.27
		rs12470143	44	90/182/122	22/58/50	20/24/29	AA/AG GG GG/GA AA	1.00 1.72 1.00 1.66	reference 1.08 2.74 reference 1.03 2.67	0.023 0.037	0.020 0.020
Asians (n=320)	<i>SRD5A1</i>	rs4952197	22	20/124/248	11/45/74	35/27/23	GG GA/AA GG/GA AA	1.00 0.46 1.00 1.68	reference 0.28 0.73 reference 1.03 2.73	0.001 0.039	0.002 0.020
		rs518673	19	6/61/119	5/29/70	45/32/37	CC	1.00	reference		
		rs166050	12	5/36/146	3/19/83	38/35/36	CT/TT TT/TC CC	0.97 1.00 1.84	0.60 1.54 reference 0.62 5.52	0.88 0.27	0.29 0.27
<i>SRD5A2</i>	rs2208532 ¹	57	49/98/42	51/38/17	51/28/29	AA/AG GG GG/GA AA	1.00 1.72 1.00 1.66	reference 1.08 2.74 reference 1.03 2.67	0.023 0.037	0.020 0.020	
	rs523349	55	48/91/49	46/39/18	49/30/27	AA GG GA/AA GG/GA AA	1.00 0.46 1.00 1.68	reference 0.28 0.73 reference 1.03 2.73	0.001 0.039	0.002 0.020	
	rs676033	35	25/97/62	10/35/60	29/27/49	GG GA/AA GG/GA AA	1.00 0.46 1.00 1.68	reference 0.28 0.73 reference 1.03 2.73	0.001 0.039	0.002 0.020	

¹ In Asians, the rs523349 is linked to rs2208532 ($r^2=0.91$).

² The number represents minor allele homozygotes, heterozygotes, and major allele homozygotes, respectively.

³ Multivariate models in Caucasians included PSA at diagnosis, Gleason score, pathological T stage, age at diagnosis, neoadjuvant therapy, smoking status, adjuvant therapy, surgical margin status and nodal invasion status. For Asians, smoking status was not available. Hardy-Weinberg equilibrium P values were all > 0.05. HR: hazard ratio. CI: confidence interval. MAF: minor allele frequency.

Figure Legends

Figure 1. Risk of recurrence associated with known (A) clinical and pathological prognostic variables and (B) Germline variations in *SRD5A* genes for localized PCa Caucasian men (n=526). Boxes represent hazard ratios (HR) and their 95% CI in multivariate analyses as described in **Table 2**. PSA categories are in ng/ml. Reference categories (HR: 1.00) for clinico-pathological characteristics are: PSA at diagnosis \leq 10ng/ml, pathological gleason score \leq 6, and pathological stage \leq pT2c. Reference categories (HR: 1.00) for genotypes are individuals with major allele (homozygous or heterozygous, as described in **Table 2**). Genetic linkage between htSNPs tested for each *SRD5A* gene is represented in the triangles on the left in panel B. *n.s.* = *non significant*.

Figure 2. Kaplan-Meier curves of BCR for A) *SRD5A1* and B) *SRD5A2* in cohort of localized Caucasians PCA cases (n=526). Log rank (LR) *P* values are shown in each frame.

Figure 3. Protective effects of SNPs in *SRD5A* genes in Caucasians (rs12470143 and rs518673; n=526) and Asians (rs12470143; n=320) with localized PCa. Hazard ratios (HR) and their 95% CI in multivariate analyses are indicated under each BCR-free curve. The BCR rate for every group is also indicated below each frame (% BCR).

Figure 4. htSNPs in *SRD5A* genes associated with an increased risk of BCR after RP in Caucasians (n=526) and in Asians (n=320) with localized PCa. Boxes represent hazard ratios (HR) and their 95% CI in multivariate analyses. Reference categories (HR: 1.00) for genotypes are individuals with major allele (homozygous and heterozygous). In Asians, rs2208532 tags for rs523349.

Figure 1

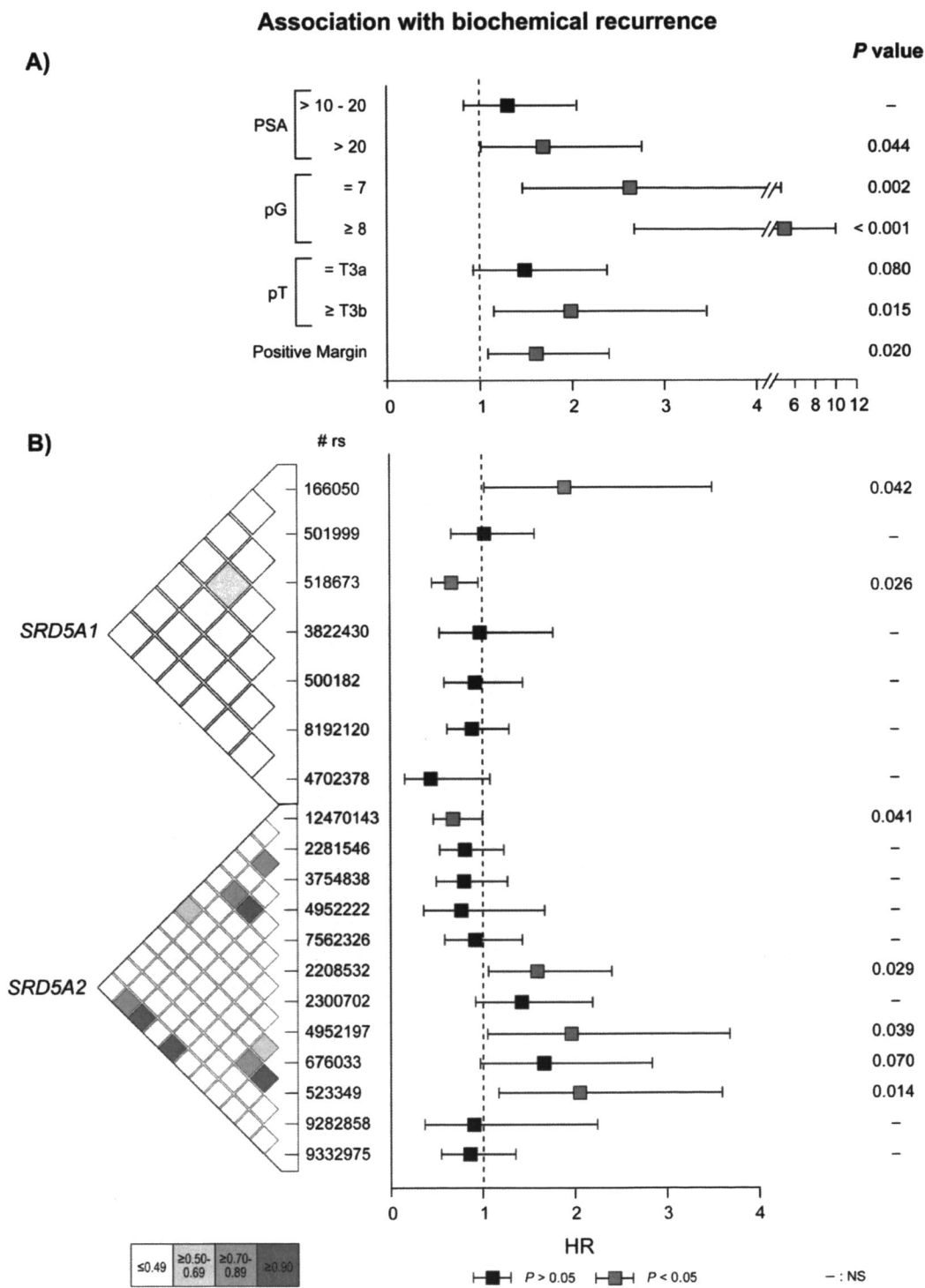


Figure 2

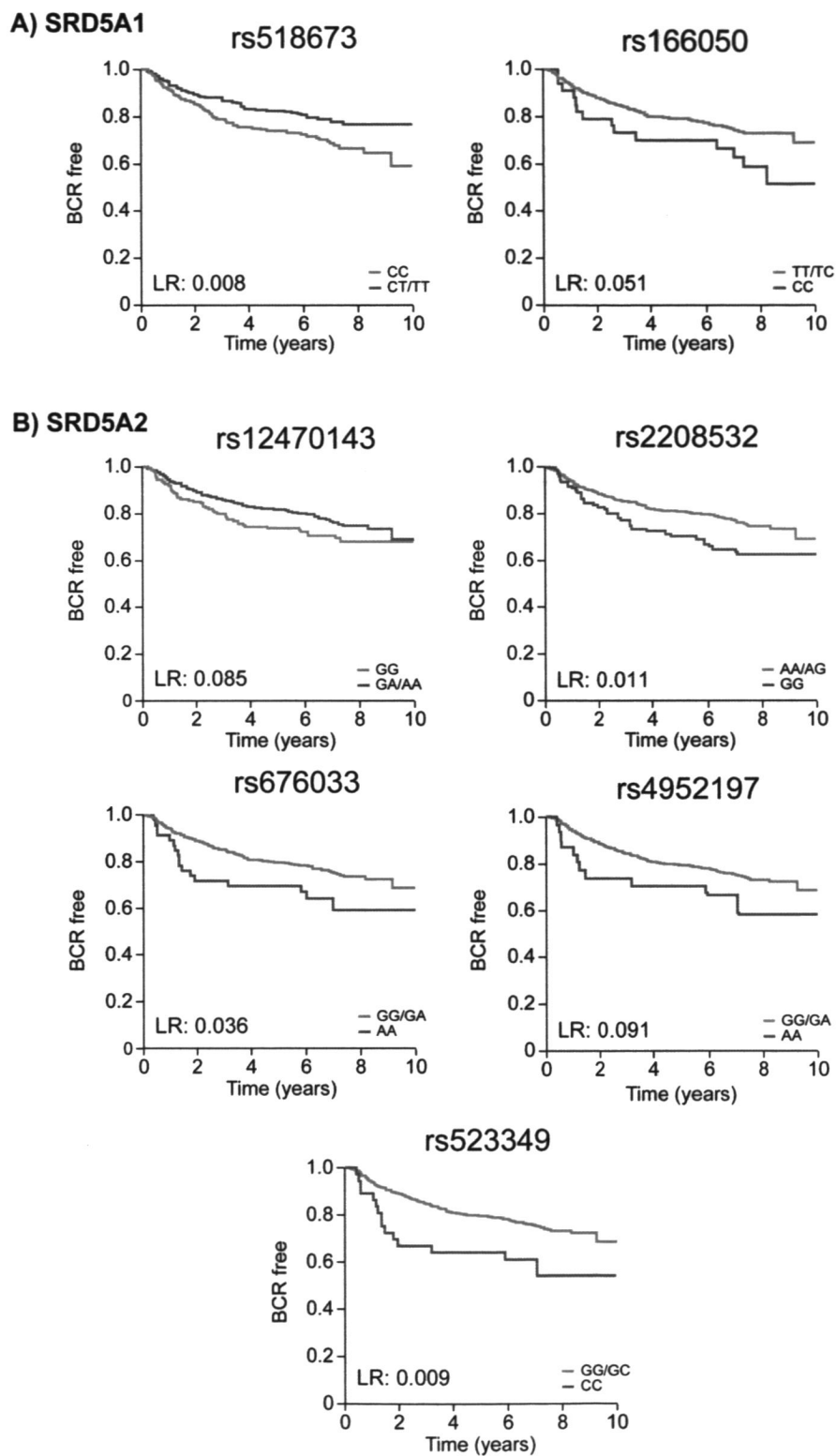
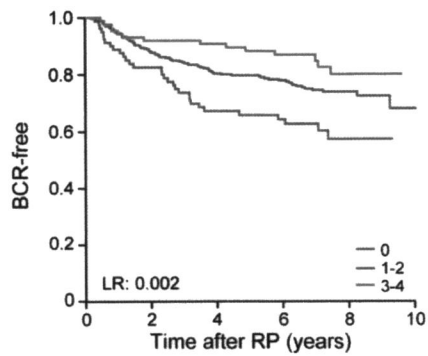
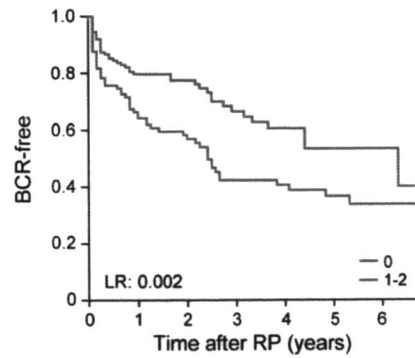


Figure 3

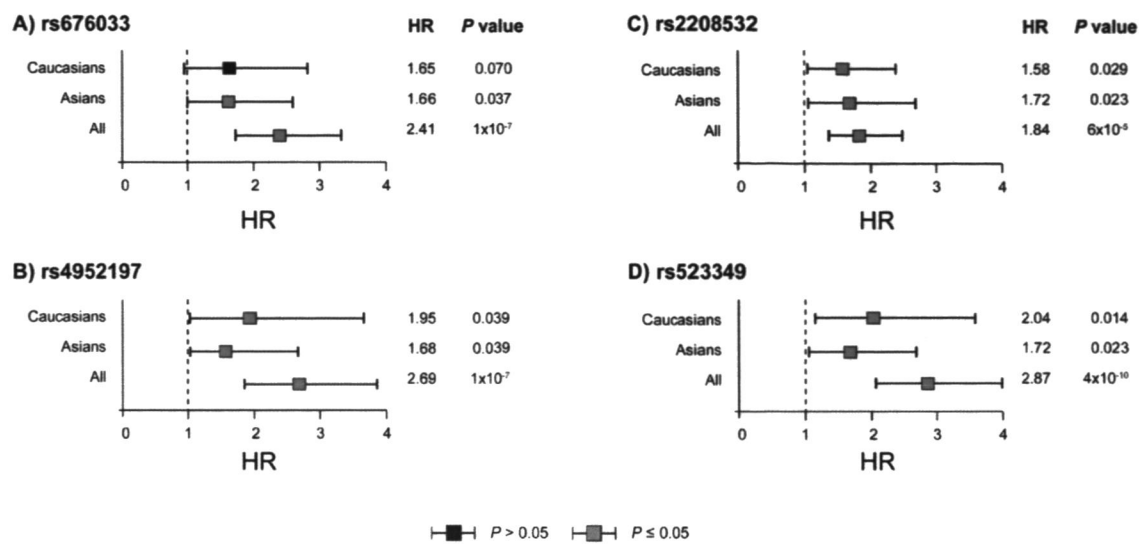
A Caucasians

Protective allele	HR	95% CI	% BCR	P value
0	1.00	(reference)	38	
1-2	0.50	0.33 – 0.77	24	0.002
3-4	0.37	0.19 – 0.71	16	0.003

B Asians

Protective allele	HR	95% CI	% BCR	P value
0	1.00	(reference)	49	
1-2	0.46	0.28 – 0.73	27	0.001

Figure 4



Supplementary Table 1. Oligonucleotides used for genotyping analysis.

Gene	SNP	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Probe Sequence
SRD5A1	rs18673	ACGTTGGATGCCGTTCCCTCATGTTGTTTC	ACGTTGGATGGAGAGAGAAATGAGTGTGAG	<u>GG</u> AAGGACGAAAGCCCTTAAATAAACCCAT
	rs166050	ACGTTGGATGTGTATTTCTCTGGACACCGC	ACGTTGGATGACCAAAAGTAGGTTATCGGGC	<u>GAAGCA</u> AGGAAAGCTGTGCATCAA
	rs192120	ACGTTGGATGCCCTCCCATCTTTGTAGTTAC	ACGTTGGATGTTGAGCCCTAAGAGCAACAC	TGCTCTCCTAAGCATATCCTAC
	rs501999	ACGTTGGATGGTGTCTATCCTAGTCCCATC	ACGTTGGATGTTCCATCACCATGCCCATTC	GGGCGAGCTTAGTAACTCATCC
	rs500182	ACGTTGGATGCCCTTGATTTCCAACACCCAC	ACGTTGGATGCATGCTGTGAATGCACATC	AATGCACATCCAGACA
	rs4702378	ACGTTGGATGACCAAAAGTAGGTTATCGGGC	ACGTTGGATGTGTATTTCTCTGGACACGC	GCTTTCCTTGCTTCAC
	rs3822430	ACGTTGGATGAGCCGTTACAGGTACAGAAC	ACGTTGGATGTTCTTGTTTCTTAAGGTGC	TCTAAGGTGCTTAATTTACCC
	rs2208532	ACGTTGGATGTTCTTGAGCTTTGTTCTGGG	ACGTTGGATGACACTCTTCTGGAACCACTG	<u>ICAA</u> CACTGAACAAATCAGATCAAA
	rs523349	ACGTTGGATGGGAAAAACCGTACCTGTGGA	ACGTTGGATGTCAGGAGCTGCCCTTCTTC	<u>CTT</u> CTGGCCCTCTTCTGC
	rs676033	ACGTTGGATGAACAGAAAGACACAGCACACC	ACGTTGGATGTACAGTAAAGGCTCTTGCCCC	<u>GCT</u> TGACCCCTCACTCC
rs9332975	ACGTTGGATGGCTACTAAGAGGATAGAG	ACGTTGGATGAAGCAGCATGTAACTCATC	GGTCTCTTTGTTTTACACTACTATTATTT	
rs2281546	ACGTTGGATGGTCACATGAGCTAGTTCCAC	ACGTTGGATGCTTGCCCTGCACCTTTTATC	CAGCAAACGATTTCCAAAGGAAGTCCCCC	
rs12470143	ACGTTGGATGCTCTCATTAAACCTCTCCCCG	ACGTTGGATGTGGAGAATAGATTGCGGTGG	<u>GG</u> CGGTGGAGTAAATGT	
rs2300702	ACGTTGGATGTCTACCTCAGCATACTCCC	ACGTTGGATGGTTGCAGAAACCTCAGATTG	<u>TAGG</u> IGCTTTTGTCTTTTTTTGTTTG	
rs9282858	ACGTTGGATGAAGCACACCGGAGAGCCTGAA	ACGTTGGATGAAGCAGCTCTGCAGGAAC	AAAGGGAACCCAGGCGGGCGGGG	
rs4952197	ACGTTGGATGTGGCACAAAGCATTCCCTTAG	ACGTTGGATGCACAAAGGACTGCAATTCCTG	<u>GGG</u> CGTGTGTGCTGGGCTTAGA	
rs7562326	ACGTTGGATGCTGAAAAAGACAGCAGAAGGG	ACGTTGGATGCTCCTCAGGCAAGGAAATGTG	GAGCAAGGAAATGTGAATTACC	
rs4952222	ACGTTGGATGAAGATATGCCCGCTGCTTTG	ACGTTGGATGGCCATAGTTTACCAATCCC	CTAAAGAAAACTATGAATGGCGTG	
rs3754838	ACGTTGGATGACTTAGCTGAGGCTCTCATC	ACGTTGGATGGAGGCCCTTGTGTGTTCTTC	TAGTACTTTTGTATTAAACATTATAGAC	

Underlined nucleotides were either only present in the first set of oligos designed for genotyping in the discovery cohort or in the set of oligos

designed for genotyping in the Asian cohort.

Supplementary Table 2. List of htSNPs and their associated SNPs in Caucasians.

Genes	htSNP	Associated SNPs	htSNP	Associated SNPs	htSNP	Associated SNPs	htSNP	Associated SNPs	
SRD5A1	rs518673	rs518673	rs500182	rs248807	rs500182	rs2677947	rs3822430	rs8192130	
	rs166050	rs166050		rs482121		rs248803		rs4702375	
		rs471604		rs2677933		rs166049		rs11738248	
		rs824811		rs494958		rs500182		rs7706809	
	rs8192120	rs8192120		rs248800		rs521293		rs7720479	
	rs501999	rs248797		rs562461		rs568509		rs8192166	
		rs248805		rs248799		rs484973		rs8192131	
		rs477930		rs500058		rs4702378		rs4702379	rs7707559
		rs501999		rs1691052				rs4702378	rs4702374
		rs566202		rs1651074				rs1560149	rs6884552
		rs472402		rs535981		rs3822430		rs3822430	rs1896670
		rs531241		rs193744				rs11134173	rs8192139
		rs181807		rs168713				rs3733773	
SRD5A2	rs2208532	rs2208532	rs676033	rs522638	rs2281546	rs2268794	rs9332975	rs6543634	
		rs2300701		rs632148		rs11889731		rs9332975	
		rs765138		rs806645		rs17011453		rs3731586	
		rs559555		rs502139		rs1042578		rs1884722	
		rs2300697		rs2754530		rs2281546		rs7571644	
	rs523349	rs523349		rs655548		rs11892064		rs7589579	
		rs12467911		rs623419		rs11690596		rs4952197	rs4952197
		rs2300699		rs499362		rs7567093			rs4952218
		rs558803		rs546935		rs1090817		rs3754838	rs3754838
		rs612224		rs481344		rs12470143		rs2300700	rs13027103
	rs477517	rs2300702		rs2268796				rs481126	rs9282858
		rs682895		rs2300702		rs585890		rs7562326	rs7562326
	rs676033	rs676033		rs2268797		rs564310		rs4952222	rs4952222
rs599300		rs4952220	rs665237						
rs614173		rs2300703	rs12470143						

Associated SNPs are polymorphisms in strong linkage with the htSNP with a $r^2 \geq 0.80$. The list of associated SNPs is derived from the analysis of a region covering approximately 250 kb for each *SRD5A* genes.

Supplementary Table 3. Association of clinical characteristics with Biochemical Recurrence in Caucasians.

Characteristics	Groups	<i>Multivariate</i>		
		HR	95% CI	<i>p</i>
PSA at diagnosis	≤ 10	1.00		
	>10-20	1.31	0.82 – 2.08	0.26
	>20	1.68	1.01 – 2.77	0.044
Pathological Gleason	≤ 6	1.00		
	7	2.63	1.45 – 4.79	0.002
	8-10	5.18	2.68 – 10.05	0.000001
Pathological Stage	≤ T2c	1.00		
	T3a	1.51	0.95 – 2.39	0.080
	≥ T3b	1.99	1.14 – 3.46	0.015
Neoadjuvant Tx	No	1.00		
	Yes	0.79	0.31 – 2.02	0.62
Adjuvant Tx	No	1.00		
	Yes	0.48	0.22 – 1.05	0.067
Age	< 65	1.00		
	≥ 65	0.84	0.57 – 1.25	0.39
Margin status	Negative	1.00		
	Positive	1.61	1.08 – 2.39	0.020
Nodal invasion	Negative	1.00		
	Positive	1.23	0.67 – 2.26	0.50
Smoking	Never	1.00		
	Ever	1.34	0.84 – 2.15	0.23

Note: results are presented when all covariates are included.

Supplementary Table 4. Relationships between SRD5A polymorphisms and pathological factors.

Gene	SNP	Caucasians				Asians			
		Gleason ≤6/7/≥8	pT ≤T2c/T3a/≥T3b	PSA ≤10/>10- 20/>20	Margin Negative/ Positive	Gleason ≤6/7/≥8	pT ² T2/T3/T4	PSA ≤10/>10- 20/>20	Margin Negative/ Positive
SRD5A1	rs166050	WT homozygote	180/74/36	201/59/29	193/97	86/107/30	148/68/7	89/75/56	146/53
		Heterozygote	115/48/32	136/38/22	146/50	20/28/6	37/16/1	23/22/9	32/18
		MA homozygote P value	17/8/9 0.24	23/6/5 0.93	28/6 0.05	4/3/1 0.94	4/4/0 0.77	3/4/1 0.57	3/3 0.22
	rs518673	WT homozygote	68/102/52	135/52/41	157/39/32	167/62	123/55/6	66/74/42	111/53
		Heterozygote	72/116/44	141/66/28	164/52/20	164/71	58/29/2	45/24/19	62/19
		MA homozygote P value	17/23/9 0.76	34/11/7 0.30	38/9/4 0.24	34/18 0.51	7/3/0 0.95	4/3/3 0.16	7/1 0.21
rs12470143	WT homozygote	51/82/34	102/42/26	119/31/22	112/57	77/39/3	50/37/33	71/35	
	Heterozygote	63/116/52	131/70/36	167/49/23	171/68	88/35/5	51/46/28	83/30	
	MA homozygote P value	43/45/21 0.26	79/18/15 0.07	74/23/11 0.84	84/28 0.26	22/13/0 0.58	13/17/4 0.22	24/8 0.50	
SRD5A2	rs2208532	WT homozygote	55/80/36	111/41/24	115/40/20	119/57	39/17/2	21/26/10	39/14
		Heterozygote	72/107/47	142/56/32	164/44/22	172/59	92/38/3	61/43/25	87/34
		MA homozygote P value	30/56/24 0.92	59/33/21 0.41	81/19/14 0.63	76/37 0.22	61/34/2 0.83	36/33/30 0.10	57/26 0.81
	rs4952197	WT homozygote	100/146/65	201/76/44	216/65/37	224/96	61/28/3	37/36/8	62/24
		Heterozygote	50/78/37	92/46/27	118/35/15	120/47	84/37/3	53/43/25	81/30
		MA homozygote P value	6/19/4 0.41	18/7/6 0.61	25/3/3 0.52	22/9 0.91	45/23/2 0.99	27/22/22 0.42	38/21 0.48
rs676033	WT homozygote	90/130/54	176/68/39	192/58/30	197/85	42/21/2	25/30/10	43/15	
	Heterozygote	58/85/44	111/48/29	132/39/20	138/52	88/35/4	56/40/27	82/34	
	MA homozygote P value	9/28/9 0.30	25/14/9 0.74	36/6/6 0.77	32/16 0.67	60/30/2 0.92	34/32/27 0.15	57/24 0.87	
rs523349 ¹	WT homozygote	92/133/56	182/70/38	197/60/30	205/84	n/a	n/a	n/a	
	Heterozygote	55/82/44	105/46/31	129/36/20	130/54	n/a	n/a	n/a	
	MA homozygote P value	7/23/6 0.25	20/10/8 0.55	28/5/5 0.85	26/12 0.95	n/a	n/a	n/a	

¹In Asians, rs523349 is tagged by the rs2208532. n/a: not available; P values are for Chi-square (Pearson) test in the allelic model. No significant association was observed.

htSNPs selection

Polymorphisms in *SRD5A* genes were chosen according to one or more of the following criteria:

1. To be likely functional or in the coding regions of the gene. This refers to the rs523349 and rs9282858, which correspond to coding region V89L and A49T substitutions, respectively. One report suggest functional impact on the enzymatic activity (Makridakis, di Salle et al. 2000).
2. To have previously been associated with PCa risk or aggressiveness. SNPs were selected based on their associations with the risk of PCa, or if associated with clinical characteristics of PCa in previous studies (Makridakis, Ross et al. 1997; Cicek, Conti et al. 2004; Cussenot, Azzouzi et al. 2007; Boger-Megiddo, Weiss et al. 2008; Scariano, Treat et al. 2008; Vaarala, Mattila et al. 2008).
3. To explain most of the haplotype diversity in the CEU (Utah residents with Northern and Western European Ancestry) *Hapmap* population. In an attempt to cover most of the genetic diversity for the candidate genes, we used haplotype tagging SNPs (htSNPs) strategy to maximize coverage in the CEU (Utah residents with Northern and Western European Ancestry) *Hapmap* population (<http://www.hapmap.org>).

References

Boger-Megiddo, I., N. S. Weiss, et al. (2008). "V89L polymorphism of the 5alpha-reductase Type II gene (*SRD5A2*), endogenous sex hormones, and prostate cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(2): 286-91.

- Cicek, M. S., D. V. Conti, et al. (2004). "Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR." Prostate **59**(1): 69-76.
- Cussenot, O., A. R. Azzouzi, et al. (2007). "Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors." Eur Urol **52**(4): 1082-7.
- Makridakis, N., R. K. Ross, et al. (1997). "A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase." Cancer Res **57**(6): 1020-2.
- Makridakis, N. M., E. di Salle, et al. (2000). "Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II." Pharmacogenetics **10**(5): 407-13.
- Scariano, J. K., E. Treat, et al. (2008). "The SRD5A2 V89L polymorphism is associated with severity of disease in men with early onset prostate cancer." Prostate **68**(16): 1798-805.
- Vaarala, M. H., H. Mattila, et al. (2008). "The interaction of CYP3A5 polymorphisms along the androgen metabolism pathway in prostate cancer." Int J Cancer **122**(11): 2511-6.

CHAPITRE VI. Les délétions des gènes UGT2B, enzymes du catabolisme des androgènes, ont un impact sur les niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes et sur la récurrence biochimique du cancer de la prostate localisé après prostatectomie radicale

Résumé

Les délétions des gènes UGT2B, enzymes du catabolisme des androgènes, ont un impact sur les niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes et sur la récurrence biochimique du cancer de la prostate localisé après prostatectomie radicale

Geneviève Nadeau*, Judith Bellemare*, Étienne Audet-Walsh*, Christine Flageole, Shu-Pin Huang, Bo-Ying Bao, Pierre Douville, Patrick Caron, Yves Fradet, Louis Lacombe, Chantal Guillemette[†] et Eric Lévesque[†].

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente; [†] Co-auteur sénior.

Contexte. L'utilité pronostique des variations génétiques des gènes de la stéroïdogénèse dans le contexte de la progression du cancer de la prostate n'a fait l'objet d'aucune étude approfondie. Notre objectif était de déterminer si des polymorphismes de 5 UDP-glucuronosyltransférases (UGT), des enzymes impliquées dans le catabolisme des stéroïdes, sont associés au risque de récurrence biochimique après une prostatectomie radicale. De plus, nous voulions explorer la relation entre ces polymorphismes et les niveaux d'hormones circulantes.

Matériel et Méthodes. Nous avons étudié une cohorte de 526 Caucasiens et une cohorte de 320 Asiatiques qui avaient tous subi une prostatectomie radicale dans le cadre de leur traitement pour un cancer de la prostate cliniquement localisé. La relation entre les polymorphismes génétiques et la récurrence biochimique a été étudiée par analyse multivariée (régression de Cox). Les niveaux d'hormones stéroïdiennes en circulation ont été mesurés par des méthodes analytiques validées de dosage par spectrométrie de masse. Leur relation avec les variations génétiques a été étudiée par analyse de covariance.

Résultats. La présence de deux délétions et plus des gènes *UGT2B17* et *UGT2B28* multiplie par 2,26 (intervalle de confiance 95% [IC95%] = 1,41-3,61; $p=0,0007$) et 2,16 (IC95%=1,24-3,73; $p=0,006$) le risque de récurrence biochimique chez les Caucasiens et les Asiatiques, respectivement. On n'a pas trouvé d'association des délétions UGT2B à l'antigène prostatique spécifique, au score de Gleason ni au stade TNM, mise à part une association entre la délétion *UGT2B17* et le score de Gleason chez les Asiatiques. Les patients porteurs de 2 délétions *UGT2B17* et ceux qui démontrent 3 délétions ou plus des gènes UGT2B présentent des niveaux de glucuronides d'androgènes significativement plus faibles, ce qui soutient l'hypothèse que le métabolisme des androgènes est altéré chez ces individus.

Conclusion. Notre étude est la première à démontrer la significativité pronostique des délétions dans la voie des UGT dans un contexte de cancer de la prostate localisé traité par prostatectomie radicale. L'altération des niveaux d'hormones stéroïdiennes circulantes associée aux délétions des gènes UGT2B supporte la notion que ces événements génétiques influencent l'exposition hormonale tumorale et altèrent le risque de récurrence biochimique.

J Clin Endocrinol Metab 96 : E1550-1557, 2011

Facteurs d'impact 2010 : 6.495

Deletions of the Androgen metabolizing *UGT2B* Genes have an Effect on Circulating Steroid Levels and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy in Localized Prostate Cancer

Geneviève Nadeau*^{1,2}, Judith Bellemare*¹, Étienne Audet-Walsh*¹, Christine Flageole¹, Shu-Pin Huang³, Bo-Ying Bao⁴, Pierre Douville², Patrick Caron¹, Yves Fradet², Louis Lacombe², Chantal Guillemette^{1†} and Eric Lévesque^{1,2†}

*These authors contributed equally.

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ) Research Center, and Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec, Canada.

²L'Hôtel-Dieu de Quebec, CHUQ Research Center and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada.

³Department of Urology, Faculty of Medicine, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan.

⁴Department of Pharmacy, China Medical University, Taichung, Taiwan.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest: GN, JB, EAW, CF, SPH, BYH, PD, PC have nothing to declare. EL, CG, LL and YF have been named inventors on a patent application owned by Laval University in work related to this study.

†Correspondence: Éric Lévesque, MD, PhD, FRCPC; Hematologist-Oncologist or Chantal Guillemette, Ph.D. CHUQ Research Center, T3-48, 2705 Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel. (418) 654-2296 Fax. (418) 654-2761; e-mail to eric.levesque@crchuq.ulaval.ca or chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca.

This work was supported by the Canadian Prostate Cancer Foundation (E.L.), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (C.G.), Canadian Urological Association-Canadian Uro-Oncology Group-Abbott Oncology research grant (L.L.) and the Canada Research Chair Program (C.G.). J.B., E.A.W., and C.F. are recipients of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award from CIHR. E.L is recipient of a CIHR clinician–scientist salary award. CG holds the Canada Research Chair in Pharmacogenomics.

Key Words: androgen, prostate cancer, UDP-glucuronosyltransferase, biochemical relapse, circulating steroid level.

ABSTRACT

Context: The prognostic relevance of inherited variations in hormone-related genes in the context of prostate cancer (PCa) progression has not been well studied. Of these, UDP-glucuronosyltransferase (UGT) gene products lead to inactivation of steroids. **Objective:** To determine whether polymorphisms in five *UGT* genes, involved in steroid metabolism, are associated with the risk of biochemical recurrence (BCR) after radical prostatectomy (RP), and to examine their relationship with hormonal exposure. **Design:** The study included 526 Caucasian and 320 Asian men who underwent RP for clinically localized PCa. The relationship between genotypes and BCR were assessed with multivariate Cox proportional hazard models. Plasma steroids were measured using specific and sensitive mass spectrometry-based methods. **Results:** The presence of ≥ 2 deleted copies of *UGT2B17* and *UGT2B28* genes resulted in an HR of 2.26 (95% CI [1.41; 3.61]; $p=0.0007$) for Caucasians and 2.16 (95% CI [1.24; 3.73]; $p=0.006$) for Asians. A positive association was observed only between *UGT2B17* deletion and the Gleason score in Asians, while no other interaction was shown with PSA, Gleason score and TNM staging. Patients carrying *UGT2B17* deletions and those with 3 deleted *UGT2B* copies had significantly lower androgen glucuronides, in support of an altered androgen metabolism **Conclusion:** This study is the first to recognize the prognostic significance of common deletions in steroid inactivation pathways in localized PCa after RP. Alteration of circulating steroid levels associated with *UGT2B* gene deletions further support the notion that such inherited genomic deletions have the potential to modify hormonal exposure and risk of recurrence.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the sixth most common cancer in the world and the second leading cause of cancer death in North American men (Jemal, Siegel et al. 2009). The specific mortality of PCa is directly related to both the stage at time of diagnosis and age at onset (Bill-Axelsson, Holmberg et al. 2005). Of the several known risk factors, the most significant are age, ethnicity, genetic and dietary factors (Steinberg, Carter et al. 1990; Platz, Rimm et al. 2000). In the early stages of carcinogenesis, androgens are centrally implicated in the development and progression of this hormone-dependent cancer. However, an association between plasma androgen levels and PCa susceptibility has not been consistently observed across studies (Eaton, Reeves et al. 1999). Currently, PCa recurrence risk is assessed based on clinical stage, prostate-specific antigen (PSA) level, and Gleason scores. However, the heterogeneity observed in clinical behavior emphasizes the need to identify additional tools suitable for use in clinical practice, such as molecular biomarkers.

Over the last several decades, a number of studies have addressed the role of inherited variations in hormone-related genes and the associated risk of prostate cancer. However, to our knowledge, few studies have looked at the prognostic value of hormone-related gene polymorphisms in PCa progression and mortality. Lindstrom and colleagues studied the role of germline variations in androgen receptor (*AR*) genes and the biosynthetic genes *CYP17* and *SRD5A2*, and suggested that polymorphisms in the *AR* gene affect hormonal treatment and ultimately PCa-related death (Lindstrom, Adami et al. 2007). More recently, overexpression of the androgen/estrogen inactivating enzyme *HSD17B4* was associated

with a poor clinical outcome (Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009). Despite the fundamental role of androgens in prostate cancer development, few data are available regarding the consequence of genetic variations in steroidogenic pathways with the risk of PCa progression following treatment, particularly for early stage disease.

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are conjugating enzymes that, in concert with other steroidogenesis enzymes, contribute to the maintenance of intracellular levels of sex-steroid hormones in target cells (Chouinard, Barbier et al. 2007). This enzymatic process generates glucuronide derivatives that are biologically inactive and subsequently excreted in bile or urine (Belanger, Pelletier et al. 2003). UGTs are expressed in almost all tissues, including hormone-targeted organs, such as prostate (Turgeon, Carrier et al. 2001; Belanger, Pelletier et al. 2003). Five UGT isoforms are mainly responsible for the inactivation of androgenic and estrogenic sex steroids (**Figure 1**). The UGT1A1 protein isoform is primarily involved in the glucuronidation of estradiol, whereas the UGT2B class of enzymes (namely UGT2B7, UGT2B15, UGT2B17, and UGT2B28) is mainly involved in androgen catabolism in hormone-dependent cells (Belanger, Pelletier et al. 2003). Common polymorphisms in two of these genes, *UGT2B15* and *UGT2B17*, have been associated with prostate cancer risk in some, but not all, studies (Hajdinjak and Zagradisnik 2004; Park, Chen et al. 2004; Park, Chen et al. 2006; Gallagher, Kadlubar et al. 2008; Karypidis, Olsson et al. 2008; Olsson, Lindstrom et al. 2008). Furthermore, deletions of the *UGT2B17* and *UGT2B28* genes have been reported, and over 50% of Caucasians and 75% of Asians have a reduced copy number in at least one of these genes (McCarroll, Hadnott

et al. 2006; Spielman, Bastone et al. 2007; Menard, Eap et al. 2009). However, their impact has not yet been addressed in PCa recurrence.

In this study, we initially assessed whether functional genetic variations or deletions of the major sex steroid metabolizing genes *UGT1A1*, *UGT2B7*, *UGT2B15*, *UGT2B17*, and *UGT2B28*, are associated with susceptibility to biochemical PSA recurrence after prostatectomy. As the majority of PCa cases are now diagnosed at a localized stage, two populations of clinically localized PCa patients comprising Caucasian and Asian men were studied; accounting for 846 men followed for BCR. Besides, the rationale for selecting the *UGT* genes was based on the following concepts: (1) the early phase of prostate carcinogenesis is hormone-dependent, and any genes modifying the level of active hormones might have an impact upon cancer recurrence and progression; (2) *UGT* genes are expressed in target cells where hormone action occurs; (3) polymorphisms in *UGT* genes are known genetic factors associated with prostate cancer risk; and (4) *UGT* genes are hormone-regulated genes that are differentially expressed in some cancers. We also established the link between genotypes positively associated with BCR and circulating steroids in plasma available from the Caucasian population.

Findings reveal that *UGT2B17* and *UGT2B28* gene deletions are predictors of PSA recurrence in clinically localized PCa after surgical treatment. These deletions are linked to altered levels of circulating sex steroids, supporting the hypothesis that reduced androgen glucuronidation by UGT-mediated inactivation would lead to an increased PSA recurrence.

MATERIAL AND METHODS

Studied Cohorts. Clinical characteristics of 846 PCa patients from 2 independent cohorts are shown in **Table 1**. The first cohort was composed of 526 Caucasians recruited at the CHUQ - Hôtel-Dieu de Québec hospital (Quebec, Canada) between 1999 and 2002 and the second was composed of 320 Asian men as described previously (Huang, Ting et al. 2010). All patients were diagnosed with localized PCa and were followed postoperatively with serial PSA measurements. Detailed clinical information was available from medical records. All participants provided a written consent before surgery for the analysis of their genome. The local research ethical committees approved the research protocol.

Definitions. The primary outcome variable was biochemical recurrence (BCR). BCR was defined as the period of time elapsed between the surgical procedure and the date of PSA recurrence. In Asians, PSA recurrence was defined as two consecutive PSA measurements of $>0.2\text{ng/mL}$ at an interval of >3 mo, and the PSA levels of $>0.2\text{ng/mL}$ at the first follow-up was considered as the time of recurrence (Huang, Ting et al. 2010). In Caucasians, PSA recurrence was defined as two consecutive PSA values $\geq 0.3 \mu\text{g/L}$, one PSA value $\geq 0.3 \mu\text{g/L}$ followed by androgen deprivation therapy (ADT) or radiation therapy, and a single last-recorded PSA value $\geq 0.3 \mu\text{g/L}$ after prostatectomy.

Genotyping. Genomic DNA was prepared from peripheral blood mononuclear cells collected from patients on the morning of a preoperative ambulatory clinical visit. All samples were kept frozen at -80°C until the time of study. Genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario, Canada) and stored at -80°C . For the Asian cohort, DNA was prepared as previously described (Huang, Ting et al. 2010).

Genotyping for *UGT1A1* (rs34815109), *UGT2B15* (rs1902023), and *UGT2B7* (rs7439366) were performed by re-sequencing of PCR amplification products. Briefly, specific PCR amplification products were cleaned-up from unused oligonucleotides, and sequenced with the Big Dye v3 terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were then resolved onto an ABI 3730xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in Caucasians. The genotyping for *UGT2B17* and *UGT2B28* deletions was performed as previously described (Menard, Eap et al. 2009). Negative controls were included in each run. Quality controls (random replicates of known genotypes) were successfully performed in 5% of the study cohort.

Measurement of Steroid levels. Five hundred plasma samples were available from the Caucasian cohort and collected on the morning of the surgical procedure. Measurement of steroid levels was carried out by validated GC/MS or LC-MS/MS methods for unconjugated steroids or glucuronides, respectively (Audet-Walsh, Lepine et al.). Internal standards (deuterated steroids) were added to all samples and quality controls were included in each run. the lower limit of quantification for each metabolite is as follow: Testo (0.025 ng/ml), DHT (0.010 ng/ml), ADT (0.025 ng/ml), ADT-G (1 ng/ml), 3 α diol-3G and 3 α diol-17G (0.25 ng/ml). Coefficients of variation for intra- and inter-assays for these methods were $\leq 10.0\%$ and accuracies for Testo, DHT, ADT, ADT-G, 3 α diol-3G and 3 α diol-17G were 100.5%, 103.5%, 96.5%, 99.5%, 89.2% and 100.2%, respectively.

Statistical Analysis. The null hypothesis of no deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each polymorphism using a chi-square test. Each variant was treated as a categorical variable, with a common (reference) homozygote group, a heterozygote, and homozygote for the minor allele, or combined, when the minor allele

frequency was below 0.10. For instance, the UGT2B28 null genotype was combined with heterozygous because of its low frequency (Caucasians n = 1; Asians n=6). Initial PSA level, Gleason score at biopsy, and tumor clinical stages were treated as categorical variables (D'Amico, Whittington et al. 2000).

Kaplan-Meier BCR analysis was performed to compare genotypes using the log-rank test. Polymorphisms positively associated with BCR in univariate analysis (p -value < 0.05) were then evaluated in a multivariate Cox regression analysis. Covariates of **Table 1** were included in the models along with *UGT2B17* and *UGT2B28* genetic status. The proportional hazard assumption of Cox models was verified graphically by log-minus-log vs. log (time) plots for each variable. Clinical variables were compared across genotypes using the Pearson's chi-square test. A p -value below 0.05 was considered statistically significant, and we considered the two-sided assumption for all tests. Statistical analyses were performed using SAS[®] Statistical Software version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and using PASW statistics 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare means of log₁₀-transformed hormonal variables between two or more independent groups, adjusted for age, but only untransformed data are shown to facilitate the interpretation. For comparisons among three or more groups, any significant differences revealed by ANCOVA were further investigated using post hoc pairwise comparisons.

RESULTS

Overall, 130 patients (24.7%) experienced PSA failure in Caucasians and 116 (36.3%) in Asians. The preoperative PSA values and the pathological biopsy Gleason scores were both associated with BCR. In Caucasians, men with a PSA value >20 were associated with BCR in a multivariate analysis (HR = 2.49, CI95 = 1.56-3.97, $p = 1 \times 10^{-4}$), a Gleason score ≥ 8 is associated with a HR of 3.25 (95% CI [2.05; 5.15], $p = 5 \times 10^{-7}$), whereas clinical T stage $\geq T2c$ was not significantly associated (95% CI [0.68; 2.54], $p = 0.411$); similar to previous reports (**Table S1**) (D'Amico, Whittington et al. 2001; Haukaas, Halvorsen et al. 2006). The deletion of either *UGT2B17* or *UGT2B28* gene is significantly associated with BCR (**Table 2**) while no significant association was observed for additional UGT variants tested in Caucasians (**Table S2**). The distribution of genotype frequencies are shown in **Table S3** and are consistent with previous reports (McCarroll, Hadnott et al. 2006; Karypidis, Olsson et al. 2008; Menard, Eap et al. 2009).

Multivariate analyses indicated that individuals with one and two deleted alleles of *UGT2B17* had an increased likelihood of PSA recurrence with HR values of 1.47 (95% CI [1.02; 2.13], $p = 0.04$) and 1.96 (95% CI [1.00; 3.85], $p = 0.051$), respectively, in support of a gene dosage effect (**Table 2**). For *UGT2B28*, one deletion was associated with HR values of 1.49 (95% CI [1.03; 2.14], $p = 0.035$). However, too few individuals with the null genotype for *UGT2B28* were found to establish a potential gene-dosage effect for this gene. It should be noted that over 28% of PCa patients with at least one deletion of *UGT2B17* were also carriers of one *UGT2B28* deletion, while 51% of heterozygous cases for *UGT2B28* were carriers of at least one deletion of *UGT2B17*. Thus, HR values likely represent the compound effect of simultaneous *UGT2B17* and *UGT2B28* genetic deletions.

Individuals of Asian Ancestry were then studied since this population presents the highest reported frequencies of *UGT2B17* deletion with a frequency of 73%, compared to 27% in Caucasians (**Table S3**) (McCarroll, Hadnott et al. 2006). In Asian, 64% (n=185) of PCa patients had the *UGT2B17* null genotype. For *UGT2B28*, the MAF was 15%, similar to the frequency of 13% observed in Caucasians. Data analysis supports that deleted copies of *UGT2B* gene also lead to a higher risk of with PSA recurrence after prostatectomy in Asian patients. Carriers of two deleted copies of the *UGT2B17* gene had a HR of 1.79 (95% CI [1.11; 2.90]; p=0.018) while two or more deletions of *UGT2B17* and *UGT2B28* resulted in a more significant HR of 2.16 (95% CI [1.24; 3.73]; p=0.006) (**Table 2**). **Figure 2** displays the Kaplan-Meier curves of BCR for ≤ 1 or ≥ 2 *UGT2B* deleted genes. The *UGT2B17* gene deletion was associated with a higher Gleason score in Asians while no other significant interaction was noted between gene polymorphisms, PSA, Gleason score and TNM staging for both Asians and Caucasians (**Table S4**).

Sex steroid hormone levels and *UGT2B* genetic deletions in Caucasian PCa patients.

We initially evaluated circulating levels of androgen and their glucuronide metabolites in carriers of the null genotype for the *UGT2B17* gene and carriers of one *UGT2B28* deleted copy. It was not possible to study patients with the null *UGT2B28* genotype because only 1 patient was found. Patients receiving ADT were also excluded from these analyses. PCa patients with the *UGT2B17* null genotype had a significant decrease in levels of a main DHT metabolite, 3 α -diol-17G by \downarrow 42% (p=0.0005) and higher levels of androsterone (\uparrow 26%; p=0.015). The same trends were observed for heterozygous *UGT2B17* patients. Furthermore, patients with 3 deleted copies of the *UGT2B17/2B28* genes, also presented significantly higher levels of androsterone (\uparrow 39%; p=0.037), lower levels of 3 α -diol-17G

(↓40%; $p=0.018$) and a trend toward lower testosterone (↓23%; $p=0.125$) (**Table 3**). As for carriers of the *UGT2B28* deletion, no significant alteration in the hormonal profile was observed.

DISCUSSION

The purpose of this study was to assess the prognostic significance of common genetic variants in five major sex steroid metabolizing *UGT* gene isoforms in clinically localized PCa patients. To our knowledge, there is no previous study reporting this association. Studying genes involved at the end of the androgenic signal is particularly biologically relevant in the initial phase of disease development because prostate cancer cells are hormone responsive at this stage, and hormonal manipulation is a cornerstone of disease management. We observed that both Caucasian and Asian cancer patients carrying common deletions of the *UGT2B17* and *UGT2B28* genes have an increased risk of BCR after surgical treatment, and that these genotypes are associated with reduced circulating levels of inactive androgen metabolites.

Over the last several decades, several studies have addressed the association between inherited variations in hormone-related genes and the risk of developing prostate cancer (Giovannucci, Stampfer et al. 1997; Cunningham, Hebring et al. 2007; Cussenot, Azzouzi et al. 2007). However, few studies have looked at the prognostic value of hormone-related gene polymorphisms in PCa progression and mortality, and none with sex steroid-inactivating *UGTs*. Few predictive or prognostic markers have been identified in the steroidogenic pathway (Lindstrom, Adami et al. 2007; Ross, Oh et al. 2008; Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009; Setlur, Chen et al. 2010), although several prognostic biomarkers have been identified in other cellular pathways, including cell cycle genes (Khor, Bae et al. 2009) and tumor suppressor genes (Huang, Ting et al. 2010).

Of all genetic process involved in prostate cancer progression, gene deletions are likely one of the most drastic molecular events. Recently, copy-number variations (CNV) in *UGT2B17*, one of the best characterized and most frequent CNV in humans (McCarroll, Hadnott et al. 2006; Menard, Eap et al. 2009), was shown to be associated with osteoporosis in Asians (Yang, Chen et al. 2008), linking CNV with a complex metabolic disease. Deletion of *UGT2B17* was shown to be associated with prostate cancer risk in some studies but not in others (Park, Chen et al. 2006; Karypidis, Olsson et al. 2008; Olsson, Lindstrom et al. 2008). However, none of these studies looked simultaneously at other *UGT2B* family members. This is relevant since genes encoding UGT2B enzymes involved in steroid metabolism are all clustered on chromosome 4q13, which may contribute to the discrepancy between studies.

Because PSA is a well-established androgen-responsive gene, lost of function of a sex steroid metabolizing enzyme is likely to affect systemic and intracellular levels of active hormones that may lead to PSA secretion and disease recurrence. *UGT2B* genes are expressed in human prostate and encode enzymes that convert steroids into inactive glucuronide derivatives in prostate cells and several other tissues (Turgeon, Carrier et al. 2001). As the products of *UGT* genes function at the end of the steroid signaling pathways in target cells, it seems reasonable that alteration of these metabolic genes might significantly affect the inactivation of hormones in a wide range of tissues including in residual prostate cancer cells following the surgical procedure. The level of active hormone is expected to be enhanced in *UGT*-deficient cells, potentially driving hormone-dependent cells into cell replication and leading to a higher risk of prostate cancer recurrence in these

individuals. UGT2B17 possesses glucuronidation activity toward androgens at the hydroxyl group at position 17 of 3 α -diol (**Figure 1**). Despite the fact that the number of patients with ≥ 2 deleted copies of UGT2B17 and UGT2B28 genes was limited, we showed that circulating levels of inactive androgens, namely the 3 α -diol-17G, are altered in individuals carrying deletions. Steroid glucuronides such as 3 α -diol-17G, are more accurate markers of hormonal actions than active hormones, because they reflect the tissular conversion of potent hormones (DHT and testo) to less-potent forms, which occurs in multiple tissues including the prostate. It is thus not unexpected to detect no significant change in Testo or DHT levels in carriers of UGT2B deletions. It is similarly observed in healthy individuals carrying *UGT2B17* genetic deletions (Olsson, Ekstrom et al. ; Jakobsson, Ekstrom et al. 2006; Schulze, Lundmark et al. 2008) and lower intra-prostatic androgen metabolite levels in PCa individuals with a deleted copy of the *UGT2B17* gene (Olsson, Ekstrom et al.). At the time of biochemical relapse the disease is particularly androgen-dependent for growth and progression, and *UGT2B* haploinsufficiency, reflected by lower circulating glucuronide levels, is thought to promote the availability of intracellular androgens, required for AR activation. Further studies are needed to carefully evaluate the impact of specific *UGT2B* deletions on prostatic hormone levels. Nevertheless, in support of our observation, a previous study showed that repression of UGT2B17 expression by RNA interference in prostatic cancer LNCaP cells led to an increase in media and in intracellular concentrations of bioactive DHT, with a greater transcriptional activation of AR and subsequent enhanced PSA secretion (Olsson, Ekstrom et al.).

Due to the mainly localized features of the tumors in this study, there were too few clinical events after PSA recurrence and, therefore, determinations regarding long terms outcome could not be assessed such as androgen deprivation resistance or cancer-specific death. Additional studies are also required to assess their role in more advanced diseases and their relationship with androgen-deprivation resistance to better understand the mechanisms involved on PCa disease progression.

In conclusion, this study provides the first evidence of deletions in sex steroid metabolizing genes as potential biomarkers for prostate cancer recurrence, and supports the significance of sex steroid metabolism in the pathogenesis and recurrence of this prevalent cancer.

REFERENCES

- Audet-Walsh, E., J. Lepine, et al. "Profiling of endogenous estrogens, their precursors, and metabolites in endometrial cancer patients: association with risk and relationship to clinical characteristics." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(2): E330-339.
- Belanger, A., G. Pelletier, et al. (2003). "Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans." *Trends Endocrinol Metab.* **14**(10): 473-479.
- Bill-Axelson, A., L. Holmberg, et al. (2005). "Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer." *N Engl J Med* **352**(19): 1977-1984.
- Chouinard, S., O. Barbier, et al. (2007). "UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 enzymes are major determinants of the androgen response in prostate cancer LNCaP cells." *J Biol Chem* **282**(46): 33466-33474.
- Cunningham, J. M., S. J. Hebbing, et al. (2007). "Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **16**(5): 969-978.
- Cussenot, O., A. R. Azzouzi, et al. (2007). "Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: the hidden face of estrogens." *J Clin Oncol* **25**(24): 3596-3602.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, et al. (2001). "Predicting prostate specific antigen outcome preoperatively in the prostate specific antigen era." *J Urol* **166**(6): 2185-2188.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, et al. (2000). "Utilizing predictions of early prostate-specific antigen failure to optimize patient selection for adjuvant systemic therapy trials." *J Clin Oncol* **18**(18): 3240-3246.
- Eaton, N. E., G. K. Reeves, et al. (1999). "Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies." *Br J Cancer* **80**(7): 930-934.
- Gallagher, C. J., F. F. Kadlubar, et al. (2008). "The UGT2B17 gene deletion polymorphism and risk of prostate cancer: A case-control study in Caucasians." *Cancer Detect Prev* **32**(3): 186-187.
- Giovannucci, E., M. J. Stampfer, et al. (1997). "The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3320-3323.
- Hajdinjak, T. and B. Zagradisnik (2004). "Prostate cancer and polymorphism D85Y in gene for dihydrotestosterone degrading enzyme UGT2B15: Frequency of DD homozygotes increases with Gleason Score." *Prostate.* **59**(4): 436-439.
- Haukaas, S. A., O. J. Halvorsen, et al. (2006). "Is preoperative serum prostate-specific antigen level significantly related to clinical recurrence after radical retropubic prostatectomy for localized prostate cancer?" *BJU Int* **97**(1): 51-55.
- Huang, S. P., W. C. Ting, et al. (2010). "Association analysis of Wnt pathway genes on prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy." *Ann Surg Oncol* **17**(1): 312-322.

- Jakobsson, J., L. Ekstrom, et al. (2006). "Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism." J Clin Endocrinol Metab. **91**(2): 687-693. Epub 2005 Dec 2006.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2009). "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): 225-249.
- Karypidis, A. H., M. Olsson, et al. (2008). "Deletion polymorphism of the UGT2B17 gene is associated with increased risk for prostate cancer and correlated to gene expression in the prostate." Pharmacogenomics J **8**(2): 147-151.
- Khor, L. Y., K. Bae, et al. (2009). "MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02." J Clin Oncol **27**(19): 3177-3184.
- Levesque, E., D. Turgeon, et al. (2001). "Isolation and characterization of the UGT2B28 cDNA encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase." Biochemistry **40**(13): 3869-3881.
- Lindstrom, S., H. O. Adami, et al. (2007). "Inherited variation in hormone-regulating genes and prostate cancer survival." Clin Cancer Res **13**(17): 5156-5161.
- McCarroll, S. A., T. N. Hadnott, et al. (2006). "Common deletion polymorphisms in the human genome." Nat Genet **38**(1): 86-92.
- Menard, V., O. Eap, et al. (2009). "Copy-number variations (CNVs) of the human sex steroid metabolizing genes UGT2B17 and UGT2B28 and their associations with a UGT2B15 functional polymorphism." Hum Mutat **30**(9): 1310-1319.
- Olsson, M., L. Ekstrom, et al. "Correlation between circulatory, local prostatic, and intra-prostatic androgen levels." Prostate.
- Olsson, M., S. Lindstrom, et al. (2008). "The UGT2B17 gene deletion is not associated with prostate cancer risk." Prostate **68**(5): 571-575.
- Park, J., L. Chen, et al. (2006). "Deletion polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 and risk of prostate cancer in African American and Caucasian men." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **15**(8): 1473-1478.
- Park, J., L. Chen, et al. (2004). "Asp85tyr polymorphism in the udp-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 gene and the risk of prostate cancer." J Urol. **171**(6 Pt 1): 2484-2488.
- Platz, E. A., E. B. Rimm, et al. (2000). "Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals." J Natl Cancer Inst **92**(24): 2009-2017.
- Rasiah, K. K., M. Gardiner-Garden, et al. (2009). "HSD17B4 overexpression, an independent biomarker of poor patient outcome in prostate cancer." Mol Cell Endocrinol **301**(1-2): 89-96.

- Ross, R. W., W. K. Oh, et al. (2008). "Inherited variation in the androgen pathway is associated with the efficacy of androgen-deprivation therapy in men with prostate cancer." J Clin Oncol **26**(6): 842-847.
- Schulze, J. J., J. Lundmark, et al. (2008). "Doping test results dependent on genotype of uridine diphospho-glucuronosyl transferase 2B17, the major enzyme for testosterone glucuronidation." J Clin Endocrinol Metab **93**(7): 2500-2506.
- Setlur, S. R., C. X. Chen, et al. (2010). "Genetic variation of genes involved in dihydrotestosterone metabolism and the risk of prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 229-239.
- Spielman, R. S., L. A. Bastone, et al. (2007). "Common genetic variants account for differences in gene expression among ethnic groups." Nat Genet **39**(2): 226-231.
- Steinberg, G. D., B. S. Carter, et al. (1990). "Family history and the risk of prostate cancer." Prostate **17**(4): 337-347.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, et al. (2001). "Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members." Endocrinology **142**(2): 778-787.
- Yang, T. L., X. D. Chen, et al. (2008). "Genome-wide Copy-Number-Variation Study Identified a Susceptibility Gene, UGT2B17, for Osteoporosis." Am J Hum Genet.

Acknowledgements

The authors wish to thank Céline Veilleux and Hélène Hovington for their help with data collection, Mario Harvey for helpful discussion and the Biostatistics Services of the CHUQ research center.

Table 1. Clinical and Pathological Characteristics of Study Populations

Characteristics	Caucasians (n=526)	Asians (n=320)
Age at diagnosis (years)		
Mean	63.3	65.7
SD	6.8	6.6
Range	43.5-80.7	44.0-79.0
Follow up Median (months)		
	88.8	30.8
Biochemical Recurrence (%)		
	130 (24.7)	116 (36.3)
PSA at diagnosis (ng/mL)		
≤10	362 (69)	132 (43)
>10-20	103 (20)	105 (34)
>20	56 (11)	72 (24)
Biopsy Gleason score (%)		
≤ 6	318 (61)	122 (39)
7	140 (27)	149 (48)
≥8	67 (13)	41 (13)
T stage at diagnosis (%)		
T1	259 (50)	209 (67) [†]
T2	247 (48)	95 (30) [†]
T3	14 (3)	8 (3) [†]
Nodal invasion (%)		
N0	481 (92)	290 (93)
N+	44 (8)	21 (7)
Neoadjuvant hormonotherapy (%)		
Yes	31 (6)	0 (0)
No	495 (94)	320 (100)
Adjuvant hormonotherapy (%)		
Yes	30 (6)	0 (0)
No	496 (94)	320 (100)
AD resistance (%)		
	12 (2)	N/A

PSA, prostate-specific antigen; tumor (T); node (N); [†] pathological staging
 N/A: not available; AD: androgen deprivation.

Table 2. Multivariate Cox Proportional Hazard Models for BCR

Cohorts	Number of deleted gene copies	Overall		PSA failure		Multivariate	
		N (%)	N (%)	HR	95% CI	p	
Caucasians (n=526)	UGT2B17	0	279 (53)	60 (22)	1.00		
		1	217 (41)	60 (28)	1.47	[1.02; 2.13]	0.040
		2	30 (6)	10 (33)	1.96	[1.00; 3.85]	0.051
	UGT2B28	0	390 (74)	84 (22)	1.00		
		1	136 (26)	46 (34)	1.49	[1.03; 2.14]	0.035
		≥2	213 (41)	41 (19)	1.00		
	UGT2B17+UGT2B28	1	226 (43)	57 (25)	1.23	[0.82; 1.86]	0.318
		≥2	87 (17)	32 (37)	2.26	[1.41; 3.61]	0.0007
		≤1	439 (83)	98 (22)	1.00		
		≥2	87 (17)	32 (37)	2.02	[1.34; 3.03]	0.0007
Asians (n=320)	UGT2B17	0	51 (18)	17 (33)	1.00		
		1	53 (18)	16 (30)	0.67	[0.31; 1.45]	0.309
		2	185 (64)	65 (35)	1.48	[0.83; 2.65]	0.187
	UGT2B28	≤1	104 (36)	33 (32)	1.00		
		2	185 (64)	65 (35)	1.79	[1.11; 2.90]	0.018
	UGT2B17+UGT2B28	0	200 (71)	67 (34)	1.00		
		1	80 (29)	25 (31)	0.97	[0.59; 1.61]	0.918
		≥2	194 (70)	66 (34)	2.16	[1.24; 3.73]	0.006

HR: Hazard ratios; 95% CI: 95% confidence intervals; N: number of patients.

Table 3. Circulating steroid levels in Caucasians stratified by *UGT2B* deletion genotypes

	Number of deleted copies of the <i>UGT2B</i> genes				
	0	1	2	0	2
<i>UGT2B17</i>					
<i>UGT2B28</i>	0	0	0	1	1
Steroids (Median \pm SD)	N = 194	N = 138	N = 16	N = 61	N = 12
Testo (pg/ml)	3675.00 \pm 1484.51	3710.00 \pm 1534.07	3640.00 \pm 1478.40	4010.00 \pm 1421.85	2830.00 \pm 1239.19
DHT (pg/ml)	315.04 \pm 149.47	313.29 \pm 155.46	288.32 \pm 168.23	335.60 \pm 156.90	251.62 \pm 120.72
Androsterone (pg/ml)	164.49 \pm 103.12	188.24 \pm 81.72†	207.39 \pm 113.38*	173.30 \pm 240.77	228.92 \pm 112.20*
Androsterone-G (ng/ml)	30.20 \pm 41.19	29.00 \pm 19.68	32.15 \pm 20.98	31.80 \pm 20.20	27.80 \pm 14.71†
3 α -diol-3G (ng/ml)	1.62 \pm 1.60	1.42 \pm 0.99*	1.43 \pm 1.33	1.49 \pm 1.15	1.74 \pm 1.63
3 α -diol-17G (ng/ml)	3.61 \pm 2.55	3.15 \pm 1.79†	2.09 \pm 1.63***	3.26 \pm 1.89	2.15 \pm 2.52*

† $P < 0.10$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

P values vs. carriers of no deletions.

It was not possible to study the null genotype for *UGT2B28* given its very low frequency (n=1).

Legend to Figure.

Figure 1. Reported specificity of UGT enzymes for sex-steroids. †The regioselectivity of UGT2B28 for the glucuronidation of 3 α -DIOL has not been assessed (Levesque, Turgeon et al. 2001). Unpublished data supports reactivity of UGT2B28 against estrogens.

Figure 2. Kaplan-Meier curves of Biochemical Recurrence-free (BCR-free) Analysis for Deletions in *UGT2B* genes. Log-rank (LR) *p* values are shown in each frame.

Figure 1

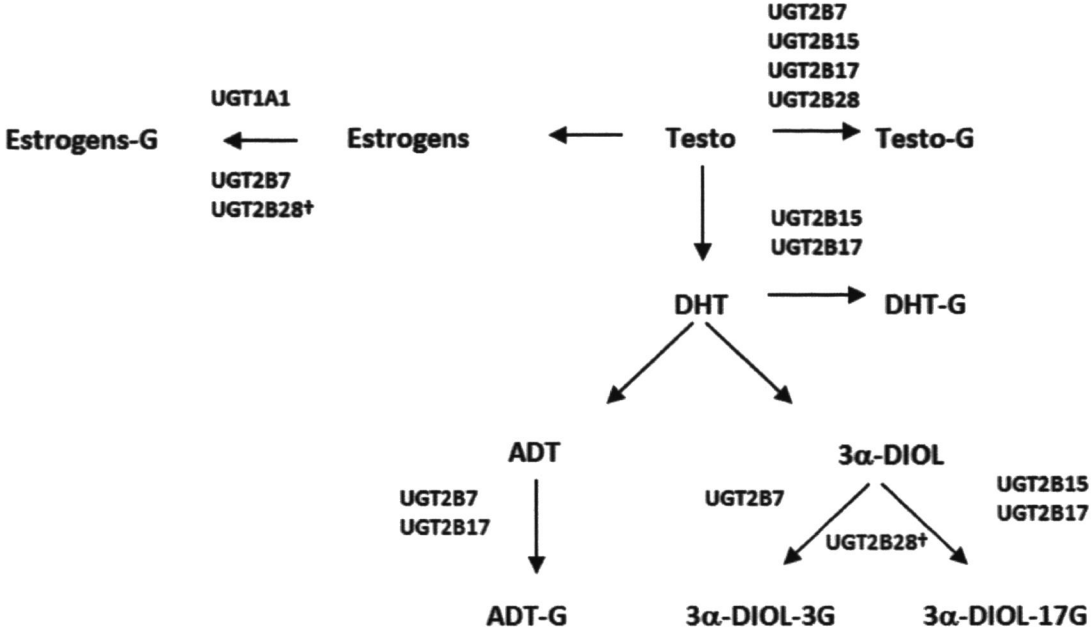
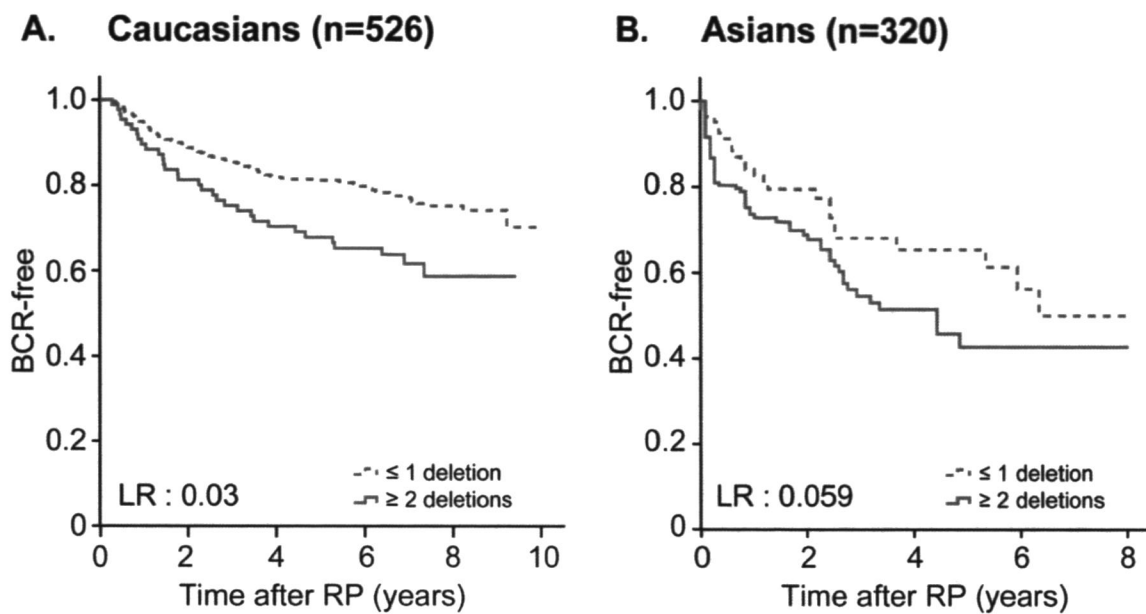


Figure 2



Supplemental Table 1 - Clinical characteristics and their Association with Biochemical Recurrence in Caucasians.

	Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Age	1.000			1.000		
	0.954	[0.674; 1.351]	0.792	0.817	[0.572; 1.167]	0.266
Smoking	1.000			1.000		
	1.109	[0.700; 1.755]	0.660	1.117	[0.696; 1.790]	0.647
Preoperation PSA	1.000			1.000		
	1.774	[1.167; 2.695]	0.007	1.609	[1.045; 2.476]	0.031
	3.416	[2.202; 5.299]	4x10 ⁻⁸	2.492	[1.564; 3.968]	1x10 ⁻⁴
Biopsy Gleason	1.000			1.000		
	1.879	[1.254; 2.814]	0.002	1.670	[1.101; 2.530]	0.016
	3.801	[2.469; 5.853]	1x10 ⁻⁹	3.250	[2.051; 5.149]	5x10 ⁻⁷
Clinical stage T	1.000			1.000		
	1.820	[1.230; 2.693]	0.003	1.521	[1.016; 2.276]	0.042
	2.145	[1.143; 4.027]	0.018	1.317	[0.683; 2.541]	0.411
Neoadjuvant ADT	1.000			1.000		
	1.553	[0.837; 2.882]	0.163	1.024	[0.535; 1.960]	0.943

Supplemental Table 2 - UGT Genotype Frequencies and their Association with Biochemical Recurrence (BCR) in Caucasians.
Caucasians (n=526)

Gene	Variation	Genotype	Overall N (%)	PSA failure N (%)	Log-rank test (p)
UGT2B7	p.H268Y rs7439366 C>T	CC	116 (22)	24 (21)	0.537
		CT	275 (52)	72 (26)	
		TT	135 (26)	34 (25)	
UGT2B15	p.D85Y rs1902023 G>T	GG	128 (24)	29 (23)	0.388
		TG	327 (62)	79 (24)	
		TT	71 (14)	22 (31)	
UGT1A1	rs34815109 c.-54_-53insTA 5, 6, 7 or 8	6/6 [§]	244 (46)	59 (24)	0.886
		6/7	221 (42)	56 (25)	
		7/7	61 (12)	15 (25)	

[§] -53insTA = 5/6 (n = 2) were combined with 6/6.
 Hardy-Weinberg equilibrium was not maintained for UGT2B15.
 N, number of patients

Supplemental Table 4 - Analyses of the interaction between copy number variations in *UGT* genes and clinico-pathological prognostic factors.

Genotypes	Caucasians (n=526)			Asians (n=320)		
	Gleason	Stage	PSA at diagnosis	Gleason	Stage	PSA at diagnosis
<i>UGT2B17</i>	0.895	0.758	0.348	0.685	0.039	0.566
<i>UGT2B28</i>	0.798	0.089	0.972	0.298	0.232	0.304

CHAPITRE VII. Impact des variations génétiques héréditaires des 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases sur l'évolution du cancer de la prostate après prostatectomie

Résumé

Impact des variations génétiques héréditaires des 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases sur l'évolution du cancer de la prostate après prostatectomie

Étienne Audet-Walsh, Judith Bellemare, Louis Lacombe, Yves Fradet, Vincent Fradet, Pierre Douville, Chantal Guillemette[†], et Éric Lévesque[†].

[†] Co-auteur sénior.

Contexte. La relation entre les polymorphismes des gènes de la famille des 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases (HSD17B), des enzymes impliquées dans la biotransformation des hormones stéroïdiennes, et le risque de progression du cancer de la prostate demeure inconnue. Notre objectif était de déterminer si certaines variations génétiques au sein de ces gènes sont associées à une récurrence biochimique et à la progression de ce cancer.

Matériel et Méthodes. Nous avons étudié deux cohortes d'origine Caucasiennne, l'une composée de 526 patients atteints d'un cancer cliniquement localisé et l'autre composée de 213 patients atteints d'un cancer localement avancé. Les temps médians de suivi étaient de 7,4 et 7,8 années, respectivement. Nous avons génotypé 88 polymorphismes des gènes *HSD17B1*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *HSD17B4*, *AKR1C3* (encodant pour la 17 β -HSD de type 5) et *HSD17B12*. Leur impact sur la récurrence biochimique a été étudié par régression de Cox et par des courbes de survie de Kaplan-Meier chez la cohorte de cas de cancer localisé. Les associations qui se sont avérées significatives ont ensuite été étudiées dans la cohorte de cas de cancer localement avancé.

Résultats. Par analyses multivariées, on a pu démontrer que 12 SNP situés au sein des gènes *HSD17B2*, *HSD17B3* et *HSD17B12* sont significativement associés au risque de récurrence biochimique dans le contexte de maladies cliniquement localisées (rapport de cote [HR] pour les polymorphismes de *HSD17B2* : 1,92-2,93; $p=0,025-0,004$). De plus, 4 polymorphismes de *HSD17B2* (rs1364287, rs2955162, rs1119933 et rs9934209) se sont avérés significativement associés à la progression d'un cancer avancé (HR=2,96-4,69; $p=0,004-0,00005$). Il a été également démontré que quatre polymorphismes des gènes *HSD17B3* et *HSD17B12* sont associés à une protection contre une récurrence biochimique (HR=0,51-0,65; $p=0,020-0,036$), mais non avec la progression, dans le contexte d'un cancer avancé.

Conclusion. À la lumière de ces résultats, il semble que les variations génétiques du gène *HSD17B2* jouent un rôle prépondérant dans l'évolution du cancer de la prostate. Toutefois, les résultats présentés dans le cadre de cette étude ont été obtenus chez deux populations caucasiennes et doivent être validés avec des populations d'ethnies différentes.

Eur Urol 2011, publié en ligne le 21 décembre (PMID : 22209174) 2011

Facteurs d'impact 2010 : 8.843

The Impact of Germline Genetic Variations in 17 β -hydroxysteroid Dehydrogenases on Prostate Cancer Outcomes After Prostatectomy.

Étienne Audet-Walsh, M.Sc.¹, Judith Bellemare, Ph.D.¹, Louis Lacombe, MD², Yves Fradet, MD², Vincent Fradet, MD², Pierre Douville, MD², Chantal Guillemette, Ph.D.^{1†} and Éric Lévesque, MD, Ph.D.^{1,2†}

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada. ²L'Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ Research Center, Laval University, Québec, Canada.

Running head: *17 β -HSDs* and prostate cancer progression

†Correspondance:

Éric Lévesque, MD, PhD, FRCPC or Chantal Guillemette, PhD

CHUQ Research Center, T3-48, 2705 Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel. (418) 654-2296 Fax. (418) 654-2761

E-mail: eric.levesque@crchuq.ulaval.ca or chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca

Key words: Prostate cancer, germline polymorphisms, biochemical recurrence, Prostate cancer progression, 17 β -HSD genes, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *HSD17B12*.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest: EL, CG, LL and YF have been named inventors on a patent application owned by Laval University for work related to this study. EAW, JB, VF and PD have nothing to declare.

Reproduced with permission from *European Urology*, Copyright 2011, All rights reserved.

Abbreviations

4-dione: androstenedione; ADT: androgen-deprivation therapy; BCR: biochemical recurrence; HR: hazard ratio; htSNP: haplotype-tagging SNP; HSD17B: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *HSD17B2*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; *HSD17B3*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3; *HSD17B12*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12; PCa: prostate cancer; PSA: prostate-specific antigen; RP: radical prostatectomy; SNP: Single nucleotide polymorphism; T: Testosterone; TNM: Tumor/Nodes/Metastasis staging system.

Abstract

Background. The relationship between polymorphisms in the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD17B*) family of genes, involved in steroid hormone biotransformation, and the risk of prostate cancer (PCa) progression remains unexplored. **Objective.** To determine if inherited variations in *HSD17B* genes are associated with PCa progression. **Design, Settings and Participants.** We studied two independent Caucasian cohorts composed of 526 men with organ-confined PCa and 213 men with advanced disease who had a median follow-up of 7.4 and 7.8 years after surgery, respectively. **Outcome Measurements and Statistical Analyses.** Patients with localized PCa were genotyped for 88 haplotype-tagging SNPs in *HSD17B1*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *HSD17B4*, *HSD17B5* and *HSD17B12*, and their prognostic significance on disease progression was assessed using Kaplan-Meier survival curves and Cox regression models. Positive findings were then investigated in advanced disease. **Results and Limitations.** After adjusting for known risk factors, 12 SNPs distributed across *HSD17B2*, *HSD17B3* and *HSD17B12* were significantly associated with risk of biochemical recurrence in localized PCa (for variants in *HSD17B2*: HR between 1.92 and 2.93, *p* values between 0.025 and 0.004). In addition, four variants of the *HSD17B2* (rs1364287, rs2955162, rs1119933, rs9934209) were significantly associated with progression-free survival (HR between 2.96 and 4.69, *p* values between 0.004 and 0.00005) and overall survival in advanced disease (HR between 3.98 and 8.14, *p* values between 0.003 and 0.00002). Four variants of *HSD17B3* and *HSD17B12* were mostly associated with a reduce risk of BCR (HR between 0.51 and 0.65, *p* values between 0.020 and 0.036) but not with progression in advance disease. These results were generated mainly in Caucasians and should be studied in other ethnic groups.

Conclusion. This study suggests a prominent role for common genetic variants in the *HSD17B2* pathway in PCa progression.

Introduction

Prostate Cancer (PCa) is a major public health concern because it is the most common cancer and the second leading cause of cancer death in North American men (Jemal, Siegel et al. 2011). PCa is clearly a heterogeneous disease, and the risk of recurrence differs greatly between individuals despite similar clinico-pathological characteristics (D'Amico, Whittington et al. 2000; Swanson, Yu et al. 2011). Furthermore, PCa susceptibility variants identified by GWAS do not necessarily appear as major contributors of PCa progression after initial treatment (Wiklund, Adami et al. 2009; Ahn, Kibel et al. 2011). Therefore, new molecular markers of progression are needed to improve PCa prognostication and treatment (D'Amico, Whittington et al. 2000; Swanson, Yu et al. 2011).

It is well established that androgen hormones play a central role in PCa development and progression. Indeed, androgen deprivation therapy (ADT) is the cornerstone therapy for metastatic PCa and is also used to treat asymptomatic patients with PSA recurrence after failed primary therapy, further reinforcing the androgen dependency of PCa cells (Harris, Mostaghel et al. 2009; Horwitz 2009). Additionally, 5 α -reductase inhibitors have been shown to be effective chemopreventive medications by reducing the risk of PCa incidence by up to 25% (Thompson, Goodman et al. 2003; Andriole, Bostwick et al. 2010). Moreover, genetic polymorphisms in *SRD5A* genes were also recently demonstrated to be associated with biochemical recurrence (BCR) in localized PCa cases in accordance with a role for germline polymorphisms in androgen biosynthesis genes in recurrence (Audet-Walsh, Bellemare et al. 2011).

Based on the above well-recognized contribution of androgens and 5 α -reductase enzymes in PCa, we investigated the impact of genetic polymorphisms in the 17 β -

hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD17B*) gene family, members of which are involved in steroid hormone biosynthesis in target tissues (**Figure 1**) (Luu-The and Labrie 2010). Members of this family encode key enzymes involved in the conversion of steroids from precursors to active hormones, and *vice versa*, depending on their substrate specificity and expression levels (Labrie, Luu-The et al. 2000). This family of enzymes is of critical importance in the endocrine system, as shown by the molecular deficiency in the 17 β -HSD type 3 gene that underlies a clinical disorder of sex development owing to impaired testicular conversion of androstenedione (4-dione) to testosterone (Geissler, Davis et al. 1994).

To our knowledge, common polymorphisms in *HSD17B* genes have not been systematically studied in relation to PCa risk, recurrence, and progression. The most prominent data have come from a large genetic study, which showed that *HSD17B1* was not associated with PCa risk (Kraft, Pharoah et al. 2005). Recently, *HSD17B4* was found to be associated with poor clinical outcome (Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009) and with androgen-deprivation efficacy (Ross, Oh et al. 2008). Given that numerous *HSD17B* genes are expressed in normal and PCa cells (Koh, Noda et al. 2002; Takase, Levesque et al. 2006; Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009), that their expression levels are significantly altered in PCa (Koh, Noda et al. 2002; Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009), and in addition to their well-characterized physiological role in active sex-steroid biosynthesis (Labrie, Luu-The et al. 2000), we thus hypothesized that genetic variations in *HSD17B* genes may alter the bioavailability of intracellular hormones, which could in turn alter PCa progression.

To investigate the link between germline variations in *HSD17B* genes and PCa, we conducted a genetic association study of PCa recurrence using two cohorts of Caucasians with localized and advanced cancer who underwent RP. We first established the relationship between *HSD17B* polymorphisms and BCR in localized PCa, and then validated positive associations with disease progression in an advanced PCa cohort.

Patients and Methods

Clinical data

The study included 739 PCa patients from two independent Caucasian cohorts; the first cohort was composed of 526 Caucasians with localized PCa, and the second was composed of 213 Caucasians with advanced PCa. Patients underwent RP by surgery at l'Hôtel-Dieu de Québec Hospital (QC, Canada). For localized and advanced PCa cohorts, the recruitment periods were between 1999-2002 and 1982-2002, respectively. Therefore, the median follow-up times were of 7.4 and 7.8 years for the localized and advanced populations, respectively. Before surgery, each participant provided written consent for the analysis of their genome. The local research ethics committee approved the research protocol.

DNA isolation and genetic analysis

Blood was collected on the morning of a preoperative clinic visit, and genomic DNA was purified using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen Inc., Ontario, Canada) and stored at -20°C . For genotyping of SNPs in *HSD17B* genes, PCR amplification was performed and the products were analyzed by Sequenom iPLEX matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. **Supplementary Table 1** presents the sequences of oligonucleotide probes and primers used for PCR.

Screening for SNPs associated with BCR was first performed using samples from the largest cohort of 526 Caucasians. Polymorphisms in *HSD17B* genes were chosen to explain most of the haplotype diversity in the CEU (Utah residents with Northern and Western European Ancestry) *Hapmap* population. For all *HSD17B* genes, a region covering all the exons, introns, and 5-kb of each of the 5' and 3' untranslated regions of the genes was

screened using a haplotype tagging SNPs (htSNPs) strategy to maximize coverage (Stephens, Smith et al. 2001). After association in our initial patient set, selected SNPs were genotyped in the 213 advanced PCa cohort. Negative controls were present for every analysis, and quality controls included 5% of the study cohorts.

Statistical analysis

To analyze the association of SNPs with BCR, disease progression, and death, each htSNP was first considered using a model based on three categories (genomic model), namely major-allele homozygote, heterozygote, and minor-allele homozygote, because the function of most htSNPs remains unknown. For rare homozygotes (frequency < 2%), minor-allele homozygotes were combined with the heterozygotes. Cox regression was performed on each SNP with adjustment for clinico-pathological variables. After analyses with the genomic model, a secondary model was developed (recessive or dominant) for each SNP. All covariables were treated as categorical in **Table 1** with $\leq 4\%$ missing values for all covariables. For localized PCa cases, the censoring variable was BCR, as reported (Audet-Walsh, Bellemare et al. 2011), based on a PSA cut-off value of ≥ 0.3 $\mu\text{g/L}$, as described previously (Amling, Bergstralh et al. 2001; Nielsen and Partin 2007). For advanced cases, disease progression was defined as resistance to androgen deprivation, metastasis, and/or death. Multivariate models included PSA at diagnosis, Gleason score, pathological T stage, age at diagnosis, neoadjuvant therapy, smoking status, adjuvant therapy, surgical margins and nodal invasion status.

Kaplan-Meier analyses (log-rank) and univariate Cox regression analyses were also carried out for every variant. Statistical analyses were performed using PASW statistics 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Because we were testing multiple SNPs, false-discovery rates (q

values) were calculated to determine the degree to which the tests were prone to false-positives, using the R *QVALUE* package (<http://genomics.princeton.edu/storeylab/qvalue/>) (Storey and Tibshirani 2003).

Results

A total of 88 htSNPs distributed across six *HSD17B* genes were initially studied in the largest cohort of 526 Caucasians with localized PCa (**Table 1**). The htSNPs strategy allowed to portray 428 genetic variations in *HSD17B* genes (**Supplementary Table 2**). Positive associations were then tested for patients with advanced cancer cases (n=213) (**Table 1**). The two cohorts differ significantly in terms of BCR rates, which were 25 and 63% for localized and advanced PCa respectively (**Table 1**). In the advanced cohort, 57 patients progressed to ADT resistance and/or metastasis and 38 patients died. After adjustments for clinico-pathological variables already used to determine BCR risk, six htSNPs in *HSD17B2*, three in *HSD17B3*, and three in *HSD17B12* were significantly associated with an increased risk of BCR (**Table 2**). Relative frequencies of SNPs in cancer patients, genetic linkage, and their corresponding hazard ratios (95% CI) as well as Kaplan-Meier curves and log-rank *p* values are shown in **Figures 2 and 3**, **Table 2**, and **Supplementary Figure 1**.

Five SNPs in *HSD17B2*, the product of which inactivates sex-steroids, were associated with an increased risk of BCR (HR between 1.92 and 2.93, *p* values between 0.025 and 0.004; **Table 2**). On the other hand, one variation was associated with a reduce risk of BCR (rs7201637 with a HR= 0.45; *p*=0.016; **Table 2**). Also, SNPs in *HSD17B3* (n=2) and *HSD17B12* (n=2), the products of which activate sex-steroids, were mostly associated with a reduced risk of BCR (HR between 0.51 and 0.65, *p* values between 0.020 and 0.036; **Table 2**). In addition, by combining the protective genotypes in *HSD17B3* (rs10739847A and rs2257157G) the effect was shown to be additive with maximal protection conferred by their co-occurrence (HR=0.34, 0.16-071, *p*=0.004; **Supplementary Figure 2**). A similar observation was made for protective alleles in *HSD17B12* (rs11037662A and

rs10838151G), with an HR of 0.50 (0.30-0.83, $p=0.007$) conferred by the combination of both genotypes (**Supplementary Figure 2**). To adjust for multiple testing, we used the false-discovery rate calculation among all significant findings; all q values were ≤ 0.07 , indicating the strength of the significant associations observed.

In addition to the variant rs9934209 that was found to be significant in the univariate analysis, 12 significant SNPs associated with BCR in multivariate analyses in localized PCa cohort ($n=526$) were genotyped in the advanced PCa cohort ($n=213$). Four of these 13 tested htSNPs (rs1364287, rs2955162, rs1119933, and rs9934209), all in *HSD17B2*, were significantly associated with PCa progression (**Table 3** and **Figures 2** and **3**). Moreover, variations in *HSD17B2* were associated with overall survival (**Table 4** and **Figure 3**). However, all other SNPs in *HSD17Bs* were not associated with disease progression in advanced PCa (**Table 3**).

Supplementary Tables 3 and 4 show the associations between *HSD17B* polymorphisms and clinico-pathological parameters. Interestingly, three *HSD17B2* SNPs (rs1364287, rs1119933, rs9934209) were all associated with margin status in localized PCa disease. The rs1364287 was also associated with Gleason score, whereas rs4243229 was associated with pathologic stage. These associations were not observed for advanced-disease cases. There was no other major association between genetic variants and other parameters, except for *HSD17B2* rs7201637, which was significantly associated with lymph node metastasis in localized disease ($p=0.002$). Interestingly, the minor-allele frequency of *HSD17B3* rs10739847 was associated with Gleason score and was significantly underrepresented in the cohort of patients with advanced disease ($p=0.000001$; **Supplementary Table 5**), in agreement with a potential protective role for this allele.

Discussion

Accurate prediction of PCa outcomes is clearly important for personalized treatments and follow-up strategies. Indeed, PCa heterogeneity greatly hinders our capability to predict disease recurrence and clinical outcome owing to a lack of prognostic molecular markers. In current clinical practice, predicting PCa risk relies mainly on tumor stage, the Gleason score, and pre-treatment serum PSA without considering the complexity of PCa genetics (Lughezzani, Budaus et al. 2009; Swanson, Yu et al. 2011).

Genetic variations in the hormone biosynthetic and degradation pathways have not been studied extensively in terms of molecular markers of PCa progression, especially in non-metastatic settings. For metastatic cases, studies have shown the impact of *HSD17B4* expression (Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009) and SNPs in *SLCO2B1* and *SLCO1B3* on palliative ADT therapy (Yang, Xie et al.). Consequently, molecular markers predictive of progression before metastatic spread are needed because identification of any individual genetic variation (or combination of variations) that might improve prognostication of PCa would be a significant step towards a better understanding of PCa. Such discoveries would at the same time identify key drug targets and help refine our follow-up strategies to optimize outcomes of these patients.

In this study, we show for the first time multiple significant associations of inherited *HSD17B* variations with progressive disease, with a major emphasis on the deleterious impact of naturally occurring germline variations in *HSD17B2*. More particularly, three germline polymorphisms (rs1364287, rs2955162, rs1119933) in *HSD17B2* were consistently associated with unfavorable outcomes both in clinically localized and more advanced diseases in multivariate analyses. Remarkably, after correction for prognostic

factors, *HSD17B2* variants remain additional predictors of progression. The importance of *HSD17Bs* in PCa is not surprising because they contribute to the maintenance and bioavailability of active hormones in target organs such as the prostate (**Figure 1**). We can speculate that the identified genetic markers in the *HSD17B* genes, or those in strong linkage disequilibrium, are more likely to produce significant effects on intracellular hormone levels in PCa cells. For instance, *HSD17B2* functions in the inactivation of active androgens (testosterone and dihydrotestosterone) and also estrogens (estradiol), and reduced *HSD17B2* expression or function potentially conferred by these genetic variations could be involved in prostate carcinogenesis through decreased inactivation of these potent hormones (**Figure 1**).

In support to our findings, an association of the loss of heterozygosity at chromosomal region 16q24, which contains *HSD17B2*, with risk of a clinically aggressive PCa has been reported (Elo, Harkonen et al. 1997; Elo, Harkonen et al. 1999; Harkonen, Kyllonen et al. 2005). Indeed, the authors stated that the allelic loss at the marker locus *HSD17B2* is associated with disease aggressiveness and seems to be a relatively early event in prostatic tumorigenesis, suggesting the potential of this locus as a prognostic marker of PCa progression. In addition, decreased expression of *HSD17B2* mRNA was observed in PCa tumors compared to peritumoral tissues or benign prostatic hyperplasia (Elo, Akinola et al. 1996; Koh, Noda et al. 2002) and also in an *in vitro* model of transition from an androgen-dependent to androgen-independent stage (Harkonen, Torn et al. 2003).

Therefore, in addition to current clinical and pathological variables, *HSD17B* genetic information, particularly at the *HSD17B2* locus, might help discriminate patients who are at increased risk of poor outcome. These genetic findings may possibly impact patient

management at different disease stages. Additional investigations are required to fully characterize the underlying biological mechanisms driving the positive associations of inherited germline variations in the 17 β -HSD type 2 enzyme with progressive disease. On the other hand, *HSD17B3* and *HSD17B12* may have an impact early in the course of localized PCa. Indeed, the presence of the rs10739847 SNP in *HSD17B3*, clearly underrepresented in advanced-stage PCa, may define a subgroup of patients with favorable outcome.

Strengths of the study include a significant number of patients, all underwent RP, long follow-up time (>7 years), and extensive information on clinico-pathological characteristics of these patients. In addition, the htSNPs strategy that was used allowed us to portray the genetic diversity of the *HSD17B* genes in Caucasians. One limitation is related to the relatively small number of death events in the advanced PCa cohort. Validation in other cohorts and different ethnic background are still needed to further confirm the significant associations identified herein.

In summary, our work demonstrates that inherited *HSD17B2* variations in the sex-steroid biosynthesis pathways are relevant molecular markers of PCa progression. These findings may advance patient management and ultimately help improve our ability to predict individuals at high risk of cancer relapse after initial curative intent. The assessment of germline variations in key steroidogenic pathway such as *HSD17B* would represent a simple and non-invasive approach to gain critical inherited genetic information associated with clinical outcomes, particularly if it provides independent prognostic information as suggested in this study. Indeed, these *HSD17B2* polymorphisms may ultimately lead to a risk-adapted clinical management toward improving outcomes.

Acknowledgements

The authors wish to thank Céline Veilleux and Héléne Hovington for help with data collection. This work was supported by the Prostate Cancer Research Foundation of Canada (E.L.), Cancer Research Society (C.G.) and the Canada Research Chair Program (C.G.). E.A.W. and J.B. are recipients of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award. E.L is recipient of a CIHR clinician–scientist salary award.

References

- Ahn, J., A. S. Kibel, et al. (2011). "Prostate Cancer Predisposition Loci and Risk of Metastatic Disease and Prostate Cancer Recurrence." *Clin Cancer Res* **17**(5): 1075-1081.
- Amling, C. L., E. J. Bergstralh, et al. (2001). "Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point?" *J Urol* **165**(4): 1146-1151.
- Andriole, G. L., D. G. Bostwick, et al. (2010). "Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer." *N Engl J Med* **362**(13): 1192-1202.
- Audet-Walsh, E., J. Bellemare, et al. (2011). "SRD5A Polymorphisms and Biochemical Failure After Radical Prostatectomy." *Eur Urol* **60**(6): 1226-1234.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, et al. (2000). "Utilizing predictions of early prostate-specific antigen failure to optimize patient selection for adjuvant systemic therapy trials." *J Clin Oncol* **18**(18): 3240-3246.
- Elo, J. P., L. A. Akinola, et al. (1996). "Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzyme expression in benign and malignant human prostate." *Int J Cancer* **66**(1): 37-41.
- Elo, J. P., P. Harkonen, et al. (1997). "Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behavior of prostate cancer." *Cancer Res* **57**(16): 3356-3359.
- Elo, J. P., P. Harkonen, et al. (1999). "Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient." *Br J Cancer* **79**(1): 156-160.
- Geissler, W. M., D. L. Davis, et al. (1994). "Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3." *Nat Genet* **7**(1): 34-39.
- Harkonen, P., A. P. Kyllonen, et al. (2005). "Loss of heterozygosity in chromosomal region 16q24.3 associated with progression of prostate cancer." *Prostate* **62**(3): 267-274.
- Harkonen, P., S. Torn, et al. (2003). "Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(2): 705-712.
- Harris, W. P., E. A. Mostaghel, et al. (2009). "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion." *Nat Clin Pract Urol* **6**(2): 76-85.
- Horwitz, E. M. (2009). "Prostate cancer: Optimizing the duration of androgen deprivation therapy." *Nat Rev Urol* **6**(10): 527-529.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2011). "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* **60**(5): 277-300.

- Koh, E., T. Noda, et al. (2002). "Differential expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozyme genes in prostate cancer and noncancer tissues." Prostate **53**(2): 154-159.
- Kraft, P., P. Pharoah, et al. (2005). "Genetic variation in the HSD17B1 gene and risk of prostate cancer." PLoS Genet **1**(5): e68.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2000). "Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease." J Mol Endocrinol **25**(1): 1-16.
- Lughezzani, G., L. Budaus, et al. (2009). "Head-to-head comparison of the three most commonly used preoperative models for prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy." Eur Urol **57**(4): 562-568.
- Luu-The, V. and F. Labrie (2010). "The intracrine sex steroid biosynthesis pathways." Prog Brain Res **181**: 177-192.
- Nielsen, M. E. and A. W. Partin (2007). "The impact of definitions of failure on the interpretation of biochemical recurrence following treatment of clinically localized prostate cancer." Rev Urol **9**(2): 57-62.
- Rasiah, K. K., M. Gardiner-Garden, et al. (2009). "HSD17B4 overexpression, an independent biomarker of poor patient outcome in prostate cancer." Mol Cell Endocrinol **301**(1-2): 89-96.
- Ross, R. W., W. K. Oh, et al. (2008). "Inherited variation in the androgen pathway is associated with the efficacy of androgen-deprivation therapy in men with prostate cancer." J Clin Oncol **26**(6): 842-847.
- Stephens, M., N. J. Smith, et al. (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." Am J Hum Genet. **68**(4): 978-989.
- Storey, J. D. and R. Tibshirani (2003). "Statistical significance for genomewide studies." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9440-9445.
- Swanson, G. P., C. Yu, et al. (2011). "Validation of Postoperative Nomograms in Prostate Cancer Patients with Long-term Follow-up." Urology.
- Takase, Y., M. H. Levesque, et al. (2006). "Expression of enzymes involved in estrogen metabolism in human prostate." J Histochem Cytochem **54**(8): 911-921.
- Thompson, I. M., P. J. Goodman, et al. (2003). "The influence of finasteride on the development of prostate cancer." N Engl J Med **349**(3): 215-224.
- Wiklund, F. E., H. O. Adami, et al. (2009). "Established prostate cancer susceptibility variants are not associated with disease outcome." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(5): 1659-1662.
- Yang, M., W. Xie, et al. "SLCO2B1 and SLCO1B3 May Determine Time to Progression for Patients Receiving Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer." J Clin Oncol.

Figure Legends

Figure 1. Schematic representation of sex-steroid biosynthesis by multiple 17 β -HSD enzymes. 17 β -HSD : 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 3 α -DIOL: androstane-3 α , 17 β diol; 3 β -DIOL: androstane-3 β , 17 β diol; 5-DIOL: androst-5-ene-3 β , 17 β diol; A-dione: androstanedione; ADT: androsterone; epi-ADT: epi-androsterone; DHEA: dehydroepiandrosterone; DHEA-S: DHEA-sulfate; DHT: dihydrotestosterone; E₁: estrone; E₂: estradiol; TESTO: testosterone.

Figure 2. Germline variations in *HSD17B2* and risk of biochemical recurrence (BCR) in localized PCa cases (n=526) (A) and risk of progression in advanced PCa cases (n=213) (B). Boxes shown within the main panel represent hazard ratios (HR) and their 95% CI in multivariate analyses as described in **Tables 2** and **3**. Reference categories (HR: 1.00) are composed of individuals with a major allele as described in **Tables 2** and **3**. The triangle on the left side of the panel represents genetic linkage between htSNPs tested in *HSD17B2* for the localized PCa cohort (n=526).

Figure 3. Kaplan-Meier curves of (A) biochemical recurrence (BCR)-free survival in localized PCa (n=526), (B) progression-free survival (PFS) in advanced PCa (n=213), and overall survival in advanced PCa. Information on SNPs significantly associated with the risk of BCR-free survival, PFS, or overall survival were included for these calculations based on the combined analyses. Log rank (LR) *p* values are shown in each frame.

Table 1. Clinical and pathologic characteristics of study populations

Characteristics	Localized PCa (n=526)	Advanced PCa (n=213)
Age at diagnosis (years)		
Mean	63.3	63.8
SD	6.8	6.2
Range	43.5-80.7	47.0-81.7
Median follow up (months) *		
	88.8	93.4
Biochemical recurrence (%) *		
	130 (24.7)	132 (63) ¹
PSA at diagnosis (ng/mL) *		
≤10	362 (69)	81 (38)
>10-20	103 (20)	66 (31)
>20	56 (11)	65 (31)
Pathological Gleason score *		
≤6	158 (31)	32 (15)
7	244 (48)	75 (36)
≥8	107 (21)	102 (49)
Pathological T stage *		
pT = T2	313 (60)	28 (13)
pT = T3a	131 (25)	59 (28)
pT ≥ T3b	77 (15)	124 (59)
Nodal invasion *		
N0	481 (92)	0 (0)
N+	44 (8)	213 (100)
Neoadjuvant hormone therapy *		
Yes	31 (6)	54 (25)
No	495 (94)	159 (75)
Adjuvant hormone therapy *		
Yes	30 (6)	94 (44)
No	496 (94)	118 (56)
Margin status *		
Negative	368 (70)	69 (32)
Positive	154 (30)	144 (68)

PSA, prostate-specific antigen; tumor (T); node (N).

Asterisk (*) indicates a significant difference between cohorts with $p < 0.001$.

¹Four patients had missing data concerning biochemical recurrence.

Table 2. Significant Associations between polymorphisms in HSD17B genes and BCR in localized PCa

Candidate genes and htSNPs	Genotypes by category ²				Genomic model ³				Secondary Model ³				
	Genotypes ¹	No BCR	BCR	BCR rate (%)	HR	95% CI	p value	Model	HR	95% CI	p value	Q value	Log-rank
HSD17B2													
rs1364287	CT	24/168/199	20/50/60	45/23/23	0.86	0.57 1.28	0.45	Recessive (TT)	2.00	1.21 3.31	0.007	0.046	0.002
	TT				1.87	1.10 3.17	0.020						
rs8059915	GC	57/186/150	28/52/50	33/22/25	0.97	0.63 1.48	0.88	Recessive (CC)	1.92	1.23 2.99	0.004	0.046	0.030
	CC				1.89	1.16 3.09	0.011						
rs2955162	GA	15/140/237	13/38/78	46/21/25	0.87	0.57 1.33	0.53	Recessive (AA)	2.14	1.17 3.89	0.013	0.053	0.008
	AA				2.04	1.11 3.77	0.023						
rs4243229	CT	0/5/389	0/8/122	-/62/24				Dominant (CT)	2.93	1.37 6.25	0.005	0.046	0.00008
	TT												
rs1119933	CT	15/160/218	13/49/66	46/23/23	0.95	0.64 1.41	0.80	Recessive (TT)	1.98	1.09 3.60	0.025	0.055	0.005
	TT				1.94	1.05 3.60	0.036						
rs9934209	GC	43/175/175	23/52/54	35/23/24	0.76	0.50 1.15	0.19	Recessive (CC)	1.31	0.82 2.11	0.27	0.12	0.042
	CC				1.15	0.69 1.91	0.60						
rs7201637	AT	2/48/339	0/14/116	0/23/25				Dominant (AT/TT)	0.45	0.23 0.86	0.016	0.053	0.49
	TT												
HSD17B3													
rs10739847	TA	96/192/103	22/60/48	19/24/32	0.67	0.45 1.02	0.060	Dominant (TA/AA)	0.65	0.44 0.96	0.029	0.058	0.022
	AA				0.60	0.35 1.03	0.062						
rs2257157	AG	79/178/134	17/65/48	18/27/26	0.93	0.62 1.38	0.71	Recessive (GG)	0.51	0.28 0.91	0.024	0.055	0.091
	GG				0.49	0.26 0.91	0.025						
rs1810711	TG	85/191/109	36/52/38	30/21/26	0.81	0.51 1.28	0.37	Recessive (GG)	1.54	1.02 2.32	0.042	0.070	0.084
	GG				1.35	0.83 2.21	0.23						
HSD17B12													
rs11037662	CA	7/135/252	2/30/98	22/18/28	0.62	0.39 0.96	0.034	Dominant (CA/AA)	0.63	0.41 0.97	0.036	0.065	0.017
	AA				0.84	0.20 3.52	0.81						
rs7928523	GA	31/176/187	13/66/51	30/27/21	1.42	0.95 2.12	0.092	Dominant (GA/AA)	1.47	0.99 2.16	0.054	0.079	0.11
	AA				1.75	0.91 3.35	0.093						
rs12800235	TC	46/173/172	20/64/45	30/27/21	1.63	1.07 2.48	0.024	Dominant (TC/CC)	1.65	1.10 2.47	0.015	0.053	0.074
	CC				1.74	0.98 3.10	0.060						
rs10838151	AG	95/204/92	30/57/43	24/22/32	0.64	0.42 0.98	0.040	Dominant (AG/GG)	0.63	0.42 0.93	0.020	0.055	0.037
	GG				0.59	0.35 0.99	0.046						

¹ Only genotypes for heterozygotes and minor-allele homozygotes are shown. The major-allele homozygotes were considered as the reference group, with a fixed hazard ratio at 1.00.

² The numbers represent minor-allele homozygotes, heterozygotes, and major-allele homozygotes, respectively.

³ Multivariate models included PSA at diagnosis, Gleason score, pathological T stage, age at diagnosis, neoadjuvant therapy, smoking status, adjuvant therapy, surgical margins status, and nodal invasion status.

No minor-allele homozygote of rs4243229 was found. Two minor-allele homozygotes were observed for rs7201637; they were combined with heterozygotes. HR: hazard ratio. CI: confidence interval. Log-rank p values are for the secondary model.

Table 3. Relationship between polymorphisms in HSD17B genes and progression-free survival in advanced disease

Candidate genes and htSNPs	Genotypes by category ²				Genomic model ³				Secondary Model ³													
	No progression		Progression rate (%)		HR		95% CI		p value		Model		HR		95% CI		p value		Q value		Log-rank	
	Genotypes ¹	progression	Progression	rate (%)	HR	95% CI	p value	Model	HR	95% CI	p value	Model	HR	95% CI	p value	Q value	Log-rank					
HSD17B2																						
rs1364287	CT	9/65/79	11/23/22	55/26/22	1.00	0.52	1.92	1.00	Recessive (TT)	3.05	1.50	6.20	0.002	0.006	0.0005							
rs8059915	TT	24/77/50	6/21/30	20/21/38	3.05	1.39	6.68	0.005	Recessive (TT)	0.60	0.24	1.49	0.27	0.51	0.31							
rs2955162	GC	6/54/92	11/14/30	65/21/25	0.48	0.19	1.22	0.12	Recessive (CC)	4.69	2.23	9.87	0.00005	0.0005	0.00003							
rs4243229	CC	0/3/143	0/1/56	-/25/28	1.06	0.53	2.11	0.88	Recessive (AA)	1.31	0.16	10.91	0.80	0.72	0.92							
rs1119933	GA	9/58/81	10/23/21	53/28/21	4.78	2.19	10.42	0.00009	Dominant (CT)	2.96	1.42	6.18	0.004	0.009	0.0009							
rs9934209	AA	13/72/67	13/26/16	50/27/19	1.22	0.63	2.38	0.55	Recessive (TT)	3.47	1.76	6.84	0.0003	0.001	0.0001							
rs7201637	CC	0/18/130	0/6/48	-/25/27	3.26	1.46	7.29	0.004	Recessive (CC)	0.91	0.35	2.36	0.85	0.72	0.98							
rs10739847	AT	17/87/47	6/32/18	26/27/28	3.91	1.78	8.60	0.0007	Dominant (AT)	0.81	0.43	1.52	0.50	0.72	0.67							
rs2257157	TT	25/69/49	11/24/17	31/26/26	0.76	0.39	1.47	0.41	Dominant (TA/AA)	1.19	0.58	2.48	0.63	0.72	0.85							
HSD17B12																						
rs11037662	CA	4/43/101	2/17/35	33/28/26	1.03	0.43	1.60	0.57	Dominant (CA/AA)	0.92	0.85	1.59	0.60	0.72	0.90							
rs7928523	AA	19/56/77	6/19/30	24/25/28	0.98	0.52	1.85	0.97	Dominant (GA/AA)	0.97	0.53	1.77	0.91	0.72	0.31							
rs12800235	GA	21/66/66	9/20/27	30/23/29	0.94	0.36	2.42	0.89	Dominant (GA/AA)	1.00	0.55	1.82	0.99	0.72	0.34							
rs10838151	AA	38/74/37	15/28/13	28/27/26	0.95	0.50	1.80	0.87	Dominant (TC/CC)	1.11	0.58	2.11	0.75	0.72	0.78							
	TC				1.16	0.50	2.66	0.73	Dominant (AG/GG)													
	CC				1.24	0.63	2.43	0.53														
	AG				0.84	0.35	2.00	0.69														
	GG																					

¹ Only genotypes for heterozygotes and minor-allele homozygotes are shown. The major-allele homozygotes were considered as the reference group, with a fixed hazard ratio at 1.00.

² The numbers represent minor-allele homozygotes, heterozygotes, and major-allele homozygotes, respectively.

³ Multivariate models included PSA at diagnosis, Gleason score, pathological T stage, age at diagnosis, neoadjuvant therapy, smoking status, adjuvant therapy, and surgical margins status (all patients had positive lymph node metastasis at surgery).

No homozygote minor-allele was found for rs7201637 and rs4243229; dominant model is thus presented. Rs1810711 was not genotyped in this population. HR: hazard ratio. CI: confidence interval. Log-rank *p* values are for the secondary model.

Table 4. Relationship between polymorphisms in *HSD17B2* gene and overall survival in advanced disease

htSNPs	Genotype ¹	Genotypes by category ²			Genomic model ³			Secondary					
		Alive	Dead	Death rate (%)	HR	95% CI	p value	model ³	HR	95% CI	p value	Q value	Log-rank
rs1364287	CT	13/71/88	7/17/14	35/19/14	1.06	0.46 2.40	0.90	Recessive (TT)	3.98	1.61 9.82	0.003	0.005	0.009
	TT				4.09	1.51 11.05	0.006						
rs8059915	GC	28/84/59	3/14/21	10/14/26	0.54	0.24 1.21	0.14	Recessive (CC)	0.40	0.12 1.41	0.16	0.19	0.18
	CC				0.32	0.09 1.15	0.08						
rs2955162	GA	9/60/102	8/8/21	47/12/17	0.85	0.33 2.16	0.73	Recessive (AA)	8.14	3.13 21.17	0.00002	0.0001	0.0001
	AA				7.70	2.82 20.98	0.00007						
rs1119933	CT	12/65/88	7/16/15	37/20/15	1.21	0.52 2.82	0.66	Recessive (TT)	4.27	1.75 10.42	0.001	0.003	0.003
	TT				4.67	1.75 12.47	0.002						
rs9934209	GC	18/78/75	8/20/9	31/20/11	1.76	0.71 4.33	0.22	Recessive (CC)	4.03	1.68 9.69	0.002	0.004	0.009
	CC				5.65	1.95 16.36	0.001						
rs7201637	AT	0/18/147	0/6/32	-/25/18				Dominant (AT)	1.59	0.60 4.20	0.35	0.35	0.25
	TT												

¹ Only genotypes for heterozygotes and minor-allele homozygotes are shown. The major-allele homozygotes were considered as the reference group, with a fixed hazard ratio at 1.00.

² The numbers represent minor-allele homozygotes, heterozygotes, and major-allele homozygotes, respectively.

³ Multivariate models included PSA at diagnosis, Gleason score, pathological T stage, age at diagnosis, neoadjuvant therapy, smoking status, adjuvant therapy, and surgical margins status (all patients had positive lymph node metastasis at surgery).

No minor-allele homozygote was found for rs7201637. There were not enough patients with a minor-allele of rs4243229 to compute these analyses.

HR: hazard ratio. CI: confidence interval. Log-rank p values are for the secondary model. SNPs in *HSD17B3* and *HSD17B12*, which were not associated with disease progression, were also not associated with overall survival in an advanced disease setting (data not shown).

Figure 1

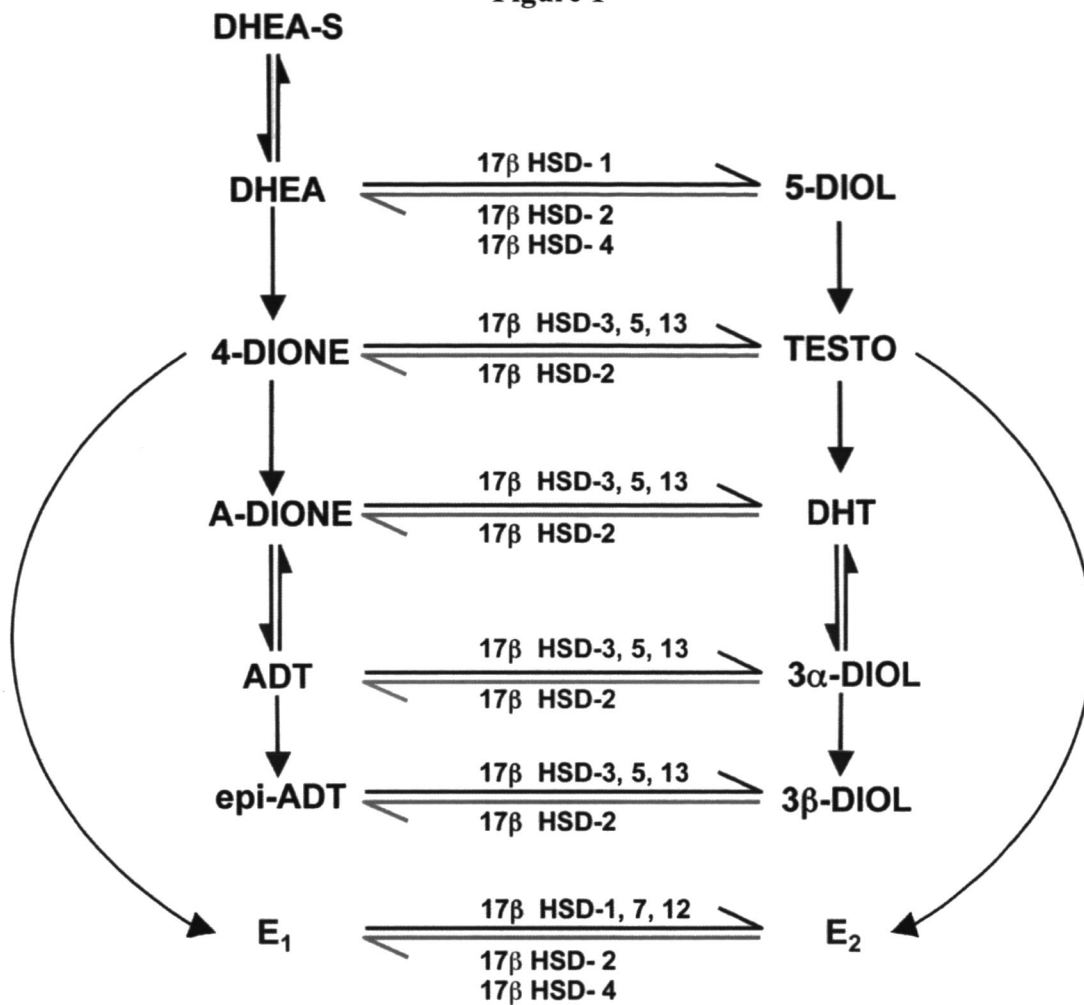
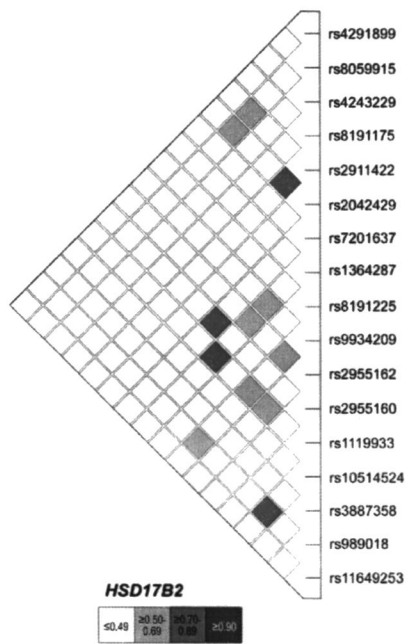


Figure 2

A) Localized PCa



B) Advanced PCa

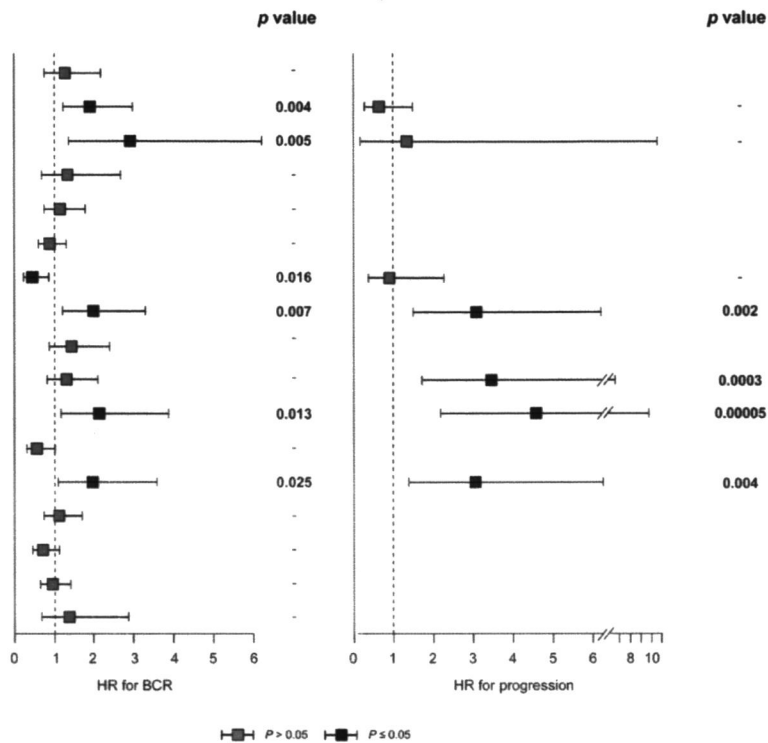
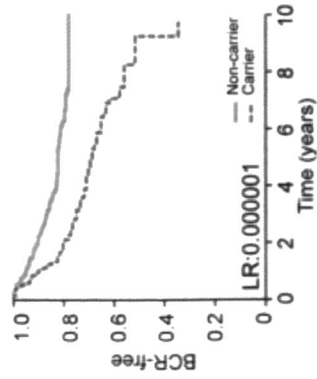


Figure 3

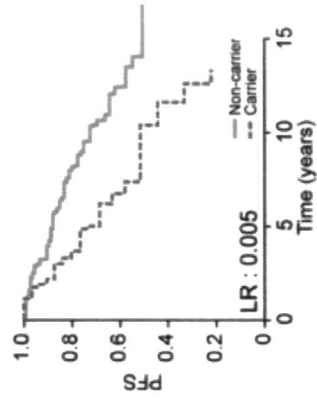
A) Localized PCa



Genotype	N	HR	95% CI	P value	BCR rate (%)
Non-carrier	379	1.00	(reference)		20%
Carrier	139	2.63	1.81 - 3.80	0.0000003	40%

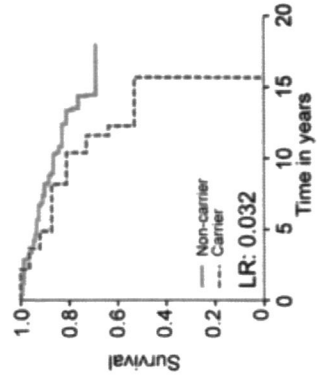
B) Advanced PCa

Progression



Genotype	N	HR	95% CI	P value	Prog. disease
Non-carrier	171	1.00	(reference)		23%
Carrier	29	2.81	1.43 - 5.52	0.003	45%

Overall survival



Genotype	N	HR	95% CI	P value	Death (%)
Non-carrier	170	1.00	(reference)		15%
Carrier	29	3.07	1.29 - 7.30	0.011	28%

Supplementary Table 1. Oligonucleotides used for genotyping analyses

Gene	rs number	Forward sequence	Reverse sequence	Probe sequence
HSD17B1	rs2676531	ACGTTGGATGCATAGATTGGGGTTACGTC	ACGTTGGATGTTATCACAGTTGTCCATGCT	TTGGGAGCTTCTGAG
HSD17B1	rs2676530	ACGTTGGATGTGGCACACAGCTAATGTGAG	ACGTTGGATGGAAACCCCTTAACTCTGACC	CCCTCTTAACTCTGACCTAGAGA
HSD17B1	rs676387	ACGTTGGATGTGGGAAGTGAGGGCGAAAG	ACGTTGGATGTAGCCCTCAGATGGATTTGG	CCCCCGTTTTCAAATGTTCTGGTTATC
HSD17B2	rs4291899	ACGTTGGATGACCAGCCATAACAGATCATC	ACGTTGGATGTGGCAATCAAAACACTCC	TTTGACCAACAAGATCTCTGTGAT
HSD17B2	rs8059915	ACGTTGGATGCCGAGCACCAGGTTTACAC	ACGTTGGATGTTGATGCACACAACAGTGGG	GGGTTCTGGGGAAATAG
HSD17B2	rs4243229	ACGTTGGATGTGGTGCAGGCTCTATCAAG	ACGTTGGATGTGGTGCATACACCCGCACAGC	CCGGTGTCTCTATCCTTGGTGA
HSD17B2	rs8191175	ACGTTGGATGATCAGAGCCCATCCCTTTG	ACGTTGGATGTTCCCTTGGCTCTGTTCAAG	TTCACTGGGTCACTGCAGAG
HSD17B2	rs2911422	ACGTTGGATGATGATTTTCTGGTTTTGCTATCAG	ACGTTGGATGTTCCGAAGCAGTAGTAAAAGTCTG	ACTTCCAAACTCATCTATGAG
HSD17B2	rs2042429	ACGTTGGATGTCCACAGAAATTAACATCC	ACGTTGGATGCTCCAGATAAGCATGTTTC	GTTTCCAAAGTACTATTACATT
HSD17B2	rs7201637	ACGTTGGATGAGCAGAGGAAATATGACCCAC	ACGTTGGATGTCAGGGAAGACATACTACAC	CAGGAAGACATACTACACATAAGC
HSD17B2	rs1364287	ACGTTGGATGCAAGCACTGTGAACCCAAAG	ACGTTGGATGCCCTGAAAAGTAAAAGACAC	GGGCTTGGAGTAAAACAGATCC
HSD17B2	rs8191225	ACGTTGGATGTACAAAGGTCATCAGTGTG	ACGTTGGATGCTGTTTCTGTCTGTCTGTGG	CGTCTGTCTGTGGGAAGAC
HSD17B2	rs9934209	ACGTTGGATGCTGGATGTGACTCTACAAAG	ACGTTGGATGCCCTATATGATCCTCTAGC	CTTACCATCACAGCC
HSD17B2	rs2955162	ACGTTGGATGCAAGAGTGGCCAGAAATCC	ACGTTGGATGTGAGCTACTATTCCCTCCTCC	GTCTCCCTGTCCCTGTCTTCCGT
HSD17B2	rs2955160	ACGTTGGATGCTGAGACAGAGAAAGAC	ACGTTGGATGTGCTCTCTGTGGGAAGGATG	GCCCTTGGAAATGAC
HSD17B2	rs1119933	ACGTTGGATGGTACGAACTCTCAAAGCCCTG	ACGTTGGATGCAGTGGAAATCTCCCAATGTC	TCCTCAATTAATCACAACTG
HSD17B2	rs10514524	ACGTTGGATGACATGGTCAAGGCATGAAGG	ACGTTGGATGGAGACAAGGATGCCATTAAG	GAAGGATGCCCTGAATGCATTA
HSD17B2	rs3887358	ACGTTGGATGGTATTAGTTCATGGTGGGC	ACGTTGGATGACAGCAGCTGCTCATTTCTC	TCTGCTCAATTTCTCCAGTCCCATT
HSD17B2	rs989018	ACGTTGGATGCTCATGCTCAGCTAGGATAA	ACGTTGGATGCAGATGGAATACCTGAGAG	GCCTACTGTGCTAGACACAAT
HSD17B2	rs11649253	ACGTTGGATGCTCATGCTCAGCTAGGATAA	ACGTTGGATGCAGATGGAATACCTGAGAG	GCATATGGAATACCTGAGAGGAACAAA
HSD17B3	rs2086479	ACGTTGGATGGCTTCTGAGCCTGATCCC	ACGTTGGATGACCTTGGTGTGAGCTTCAG	AGCCTTTGGAAGGCAC
HSD17B3	rs8190557	ACGTTGGATGTACAAGGACTATGTGGCGAG	ACGTTGGATGGAGCCACCTTACTTTCTGAG	TGAGGGAGGCCCAAGAATGAGA
HSD17B3	rs2253502	ACGTTGGATGAGTTGCCCGAGATCAAGAC	ACGTTGGATGTGGAATAGTGGAGGAGGAGC	ACGATGGAATAGTGGAGGCTGACAG
HSD17B3	rs1810711	ACGTTGGATGGAAGAGAACGGCAGTTTCCAG	ACGTTGGATGAGAGATGGTCTTGATCTCGG	TTAAGTTTTCTTTTACACTCAACAT
HSD17B3	rs2066475	ACGTTGGATGATGGGCTGTCTCTTCAATG	ACGTTGGATGATGAACAGGGATCCAAATGC	AGCCAAATGCCCCCTCGCCCATGAAGTTTC
HSD17B3	rs2026001	ACGTTGGATGTGCTTTCAGTCCAAAGACAC	ACGTTGGATGACTAGACAGCCAGACATTC	CCTTCTTCAAGTGTTCGCTCAC
HSD17B3	rs8190536	ACGTTGGATGAAGCAGGAACTAAGTGGGC	ACGTTGGATGAATGGAAAAGCCCGCTCAAG	CCAAAGGAGAGAGCAGA
HSD17B3	rs8190534	ACGTTGGATGAGGACAGTCAAGAGATTC	ACGTTGGATGCTAATCTTCTCACTGGTAGC	ACTGGTAGCAGTTTTAGGTACA
HSD17B3	rs2476927	ACGTTGGATGGCTCAAGCTAATCACAATG	ACGTTGGATGTGCTGTTTTCTTTTATTTT	CATTAATTTCTTTATCTTTTTTGTAT
HSD17B3	rs2257157	ACGTTGGATGAGTCCCAAGGATGACACAG	ACGTTGGATGCTGTCTCTGTGGTTTTCAAGTC	GGTCGGTGGTTTTCAAGTCAAAATGATTCAT
HSD17B3	rs2476923	ACGTTGGATGCCTTCTATGATCCCAACAAC	ACGTTGGATGTGGATAGAAGACACTTCAGG	GTTAAATCTGTCTTACCCACTTATTTCC
HSD17B3	rs394243	ACGTTGGATGCAAAAGAAAGGAAATGGAAGC	ACGTTGGATGCAATCACCGTTTTTCCCATC	GGGGCAAAAAGTGCAGATTAC
HSD17B3	rs10739847	ACGTTGGATGCACCTGGTACCTAAGTCAAGC	ACGTTGGATGAAGGATCAAGCAAGAAGAC	AGAAGACAAAAGACTGAGTGA
HSD17B3	rs11788785	ACGTTGGATGTAGAACACACCCCGGAAAC	ACGTTGGATGTGCTGCTCACTGACCAAGC	TTTTTGTGGTAGTGTGCTGACTAGGTAAGCT
HSD17B3	rs1983828	ACGTTGGATGCGGATTTACAGTTCTTAGC	ACGTTGGATGCAGGATGAATGAGATCTAGAG	GAAGACATAAATAACAAGGCTGTATTATA
HSD17B3	rs8190512	ACGTTGGATGCCAGTTGACAACTGTTGGAG	ACGTTGGATGCACCTGCTAGGTAATCTACCC	GCCAAGGAAAAGGAAAAGTGT
HSD17B3	rs2479828	ACGTTGGATGCCAAGGCTTAGGATTAACAG	ACGTTGGATGATTTGCTACAAGTCTCCGCC	TCCGCAAGCAATTAGCCCAAGTGGAGT
HSD17B3	rs9409407	ACGTTGGATTTTTAGGCTTGGTGCAGG	ACGTTGGATGGACTGTCAAGTGCAAATCC	AGCAATCTTTTAGGAATGAAGGGGAAAT
HSD17B3	rs7029101	ACGTTGGATGAAAGATCCAGGGAGTGGAG	ACGTTGGATGTGAGACATCCACCCCAACAC	CCCTCACCCCAACACTAGATTTTTGA
HSD17B4	rs10478424	ACGTTGGATGGCTCCTGAAATACAGGCCAAC	ACGTTGGATGGAAATGGGAGTAGGATGGG	TGAGGAACCTGGAGAGC
HSD17B4	rs6897978	ACGTTGGATGACTCGAAAGGCCCTAATG	ACGTTGGATGAAGGCAGCATAAAGGCCAC	AGACAGATGAAAAGTACATAGGAATTA
HSD17B4	rs6897978	ACGTTGGATGACTCGAAAGGCCCTAATG	ACGTTGGATGAAGGCAGCATAAAGGCCAC	AGACAGATGAAAAGTACATAGGAATTA
HSD17B4	rs11749784	ACGTTGGATGCATCAAAAACCTTTCCAGTGG	ACGTTGGATGCAGTATCTTCCATCTGACCC	ACCCTCCAAAACAAAACCTCA
HSD17B4	rs10463469	ACGTTGGATGTAGCCAGAGATGTAACGATG	ACGTTGGATGATTGAAATGTTACCACATGC	ACCACATGCTTTCTCT

HSD17B4	rs10463469	ACGTTGGATGTAGCCAGAGATGTAACGATG	ACGTTGGATGATTGAATGTTACCACATGC	ACGTTGGATGCTTCTCT	ACCACATGCTTCTCT
HSD17B4	rs257977	ACGTTGGATGGAGAAACTGGACATAGAC	ACGTTGGATGGGAGACTTTTTATACCCGC	CCATGCTTACGATTTCTATTTCTCTGAG	TCTGTTACGATTTCTATTTCTCTGAG
HSD17B4	rs439954	ACGTTGGATGGGTGAGGTTGAAAGTGG	ACGTTGGATGGTCCACATTTTGAAAACTC	CATGGCATGATTTCCACTTA	CCATGCTTACGTAATTTTAGGC
HSD17B4	rs7706359	ACGTTGGATGACTAGTTCTGGCAACCATC	ACGTTGGATGCACAAAAGGACAAATACTGGC	ATGTACACAAGAAACCCCCAG	CATGGCATGATTTCCACTTA
HSD17B4	rs457106	ACGTTGGATGCAGCATGGGAACACATGAAG	ACGTTGGATGCTTCCCTGTACACAAGAAC	TCTATAACAACAATAAATGCTGTG	ATGTACACAAGAAACCCCCAG
HSD17B4	rs2455463	ACGTTGGATGTTCCGAGTTGGTTTATCCAC	ACGTTGGATGGAAACTTAAGACATATAAC	GACTAATATCCCTCACITTTAAATTTG	TCTATAACAACAATAAATGCTGTG
HSD17B4	rs7723390	ACGTTGGATGTTGTATACGAACCTGTTG	ACGTTGGATGGTCTAACTACCCTACAGC	AAATTAAGGAATAGTTTACCTGT	GACTAATATCCCTCACITTTAAATTTG
HSD17B4	rs11241507	ACGTTGGATGTATTAAGAAGTGGTGGGAG	ACGTTGGATGAAGCACTAGTTTCTGAGCC	TACGTAGTAATACACATTTACCTTAA	AAATTAAGGAATAGTTTACCTGT
HSD17B4	rs11205	ACGTTGGATGGCGTGTGTACAGCAGTTTG	ACGTTGGATGCTTAAACCCCTTTTCTCTC	CGTTCTTGGTCCCAACTACTAA	TACGTAGTAATACACATTTACCTTAA
HSD17B4	rs17145475	ACGTTGGATGCATAGTAGGCGACAGAG	ACGTTGGATGCCTGCATGTCATGAAGCAAG	CCACCGTCGACGAAACACCA	CGTTCTTGGTCCCAACTACTAA
HSD17B4	rs3850202	ACGTTGGATGACATGTGACAGTACATGG	ACGTTGGATGCTAGGTGATGATGAGCTG	GGAGCATTTCTGAAAGGGCTAGTCT	CCACCGTCGACGAAACACCA
AKR1C3	rs11252932	ACGTTGGATGGGAGAAATCATCTTTACAG	ACGTTGGATGCCCTCGAGCATTTCTGAAG	CAATGTAGGAGGGGTACA	GGAGCATTTCTGAAAGGGCTAGTCT
AKR1C3	rs3763676	ACGTTGGATGTGCAATTTCTCCACAGACC	ACGTTGGATGCCCTGCAAACTGACTGATG	GAAGGAATGGATTTCCAAACA	CAATGTAGGAGGGGTACA
AKR1C3	rs12529	ACGTTGGATGAGGTGATAGTGCCAAATC	ACGTTGGATGTAGTCAGACAAGTGACAGGG	GGATGTTGTAGCCAGAAATGACT	GAAGGAATGGATTTCCAAACA
AKR1C3	rs2518049	ACGTTGGATGACCCCACTAGGGTTCACTTG	ACGTTGGATGGTTCAGTTCTGTTGTAGC	GTTGCTCCTCCAGGTTCC	GGATGTTGTAGCCAGAAATGACT
AKR1C3	rs7741	ACGTTGGATGGGAGCAGAACTATATGGCGG	ACGTTGGATGACTACCTTTGGTGTCTCCTC	CCCCGTACAGGAATCTCTTTCCCTT	GTTGCTCCTCCAGGTTCC
AKR1C3	rs1937841	ACGTTGGATGGAAGATAGAGGCAAGAG	ACGTTGGATGCAAGGAGGACAGGAATCTCT	AAACTTAGAGCCAATGAGTAAAGATCTAC	CCCCGTACAGGAATCTCTTTCCCTT
AKR1C3	rs4559587	ACGTTGGATGGAACTGTATCATTAGGCCA	ACGTTGGATGTACAACTTAGAGCCAATGAG	AGCGAGGAATCATCCCA	AAACTTAGAGCCAATGAGTAAAGATCTAC
AKR1C3	rs2154307	ACGTTGGATGCTTTGGGCTTCAGATTGTC	ACGTTGGATGTCCAACATCACCAAGTAC	GGGACCCCATCTACATTTCTCTCTC	AGCGAGGAATCATCCCA
AKR1C3	rs12775701	ACGTTGGATGCCCTGCAACGGAACATC	ACGTTGGATGTAACTCCAGCTACTCAGG	GGATAGATGATAAGAAATTAAGTCTCGC	GGGACCCCATCTACATTTCTCTCTC
AKR1C3	rs2275928	ACGTTGGATGGCCTAGACAGAAATCTCCAC	ACGTTGGATGACTCTCAACACCCATCCTAC	GAAACCCAGAAATATGTAAGATTATCA	GGATAGATGATAAGAAATTAAGTCTCGC
AKR1C3	rs4242785	ACGTTGGATGACAGTGGCCCTTCATAAGTG	ACGTTGGATGAGGAACAGATAAACCCAAC	CTCCGTAGAAATTTGGTACATTCCAA	GAAACCCAGAAATATGTAAGATTATCA
AKR1C3	rs10904423	ACGTTGGATGCAATGCCAATTTTGGGTG	ACGTTGGATGAGCTAGACACACTGTTGGG	AACTCGTCTCGTCCCGCGGGG60CC	CTCCGTAGAAATTTGGTACATTCCAA
AKR1C3	rs7086771	ACGTTGGATGAAAGTTCATTTGGCTTCC	ACGTTGGATGATCCCGTCTCCAGCATTTG	GTAATTTGCCAGGGTA	AACTCGTCTCGTCCCGCGGGG60CC
HSD17B12	rs4573669	ACGTTGGATGCCAGAACTAGTCATCACGG	ACGTTGGATGGCAGGTGAGTCGGATGCAG	GTAGAACCTAAGCCCAT	GTAATTTGCCAGGGTA
HSD17B12	rs10838151	ACGTTGGATGAGTACCACAGATCAACTC	ACGTTGGATGGACTTGAATTTCTAGCTTCCC	TCTCCACTTACTATGTGACTTT	GTAGAACCTAAGCCCAT
HSD17B12	rs11037567	ACGTTGGATGGAGGCAATAGACTGAAGAGG	ACGTTGGATGTCTTCTGTTAGAACCTAAG	CCGTTTCGCTTTCCAGACCCCA	TCTCCACTTACTATGTGACTTT
HSD17B12	rs7928523	ACGTTGGATGAATATAGAGAGGTCGAAGCAG	ACGTTGGATGACATAGTGGCTAAGAGAGG	CCCTCACAAATATCCTCGGAAAAGCACCC	CCGTTTCGCTTTCCAGACCCCA
HSD17B12	rs11037575	ACGTTGGATGGTGGGTGTCATTTCTTTTC	ACGTTGGATGCACAGGAAGTGTCTGTTTTC	TTGCTTTAGGGGTTAAACCTACTTA	CCCTCACAAATATCCTCGGAAAAGCACCC
HSD17B12	rs6485450	ACGTTGGATGGACTCAGTGGTCAATGGAAA	ACGTTGGATGTCTGGTGGCCCAAGAC	CCCCCAAGTATGGCACCACAAAGAAATGGTGA	TTGCTTTAGGGGTTAAACCTACTTA
HSD17B12	rs12800235	ACGTTGGATGGGAGAGTAGCTCTCATTC	ACGTTGGATGTCCITTTGCTCGGGCTTTAG	CTCCATTCACTCATC	CCCCCAAGTATGGCACCACAAAGAAATGGTGA
HSD17B12	rs6485453	ACGTTGGATGAGACCACATTCAGCTTCAGG	ACGTTGGATGTACAATGCCATGCTC	ATCCATTGCAATAAGTGGTA	CTCCATTCACTCATC
HSD17B12	rs11037589	ACGTTGGATGGCTGTGTATCATAGACAGG	ACGTTGGATGCATGGTCAATGGCAATGAGC	CTTCTCTGGTTCCTCATGGTAAATGT	ATCCATTGCAATAAGTGGTA
HSD17B12	rs11037589	ACGTTGGATGAACCTGGCAAAAGCAGGTG	ACGTTGGATGGTCTCTGGTCTCTCATGG	TGTTTCTGACTGGGG	CTTCTCTGGTTCCTCATGGTAAATGT
HSD17B12	rs16937624	ACGTTGGATGCTAAGCTGTGGCTCTTCTG	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	AAGTAAACCCGAACTGT	TGTTTCTGACTGGGG
HSD17B12	rs11037634	ACGTTGGATGACTTCCAGTGGTACTTC	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	TCAAAATACCACCCCAT	AAGTAAACCCGAACTGT
HSD17B12	rs11037634	ACGTTGGATGAGTGGGCTGTGGCTCTTCTG	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	CCCATCCAAAAGTCTGAGATCA	TCAAAATACCACCCCAT
HSD17B12	rs1114842	ACGTTGGATGAGTGGGCTGTGGCTCTTCTG	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	GTCATTATGGAGAACAGGAAA	CCCATCCAAAAGTCTGAGATCA
HSD17B12	rs11037662	ACGTTGGATGCATACACTGGGTAAGAC	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	GACAAAACAGATTTCCAAATCTTT	GTCATTATGGAGAACAGGAAA
HSD17B12	rs1118820	ACGTTGGATGTTCTGGCTCCTGCTGTTG	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	CACAGTACAAAAGTCTGAGATCA	GACAAAACAGATTTCCAAATCTTT
HSD17B12	rs11037685	ACGTTGGATGGTCAAGTTATGGTCAAG	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	TTGATAAAGCCTGGGCAAT	CACAGTACAAAAGTCTGAGATCA
HSD17B12	rs9783388	ACGTTGGATGGTCAAGTTATGGTCAAG	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	TTGATAAAGCCTGGGCAAT	TTGATAAAGCCTGGGCAAT
HSD17B12	rs9783294	ACGTTGGATGGTAAAGTCCAGATTTTACA	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG	CCAAACAACAAAGCTATATTGAGAT	TTGATAAAGCCTGGGCAAT
HSD17B12	rs10768989	ACGTTGGATGGTAAAGTCCAGACTCCTTC	ACGTTGGATGCCCCCTCCCAATAGGAATG		CCAAACAACAAAGCTATATTGAGAT

Supplementary Table 2. htSNPs and their associated SNPs

Candidate genes	htSNPs		Associated SNPs					
HSD17B1	rs2676531	rs597255	rs2676531	rs666039	rs615942	rs2830		
	rs2676530	rs2676530						
	rs676387	rs676387						
HSD17B2	rs10514524	rs10514524	rs2317615	rs989019	rs10514525	rs1364283	rs989018	rs4378606
	rs1119933	rs4274431	rs11639839	rs11645754	rs1119933	rs10514527	rs996752	
	rs11649253	rs11649253						
	rs1364287	rs1364287	rs8191248	rs8191243				
	rs2042429	rs2042429						
	rs2911422	rs2911422						
	rs2955160	rs2966246	rs2955160	rs2955163				
	rs2955162	rs2955162						
	rs3887358	rs1364284	rs9940683	rs3887358				
	rs4243229	rs2955155	rs4889452	rs2955152	rs8191256	rs2966250	rs4889453	rs11150437
		rs2911418	rs2966251	rs16956433	rs2955156	rs10514526	rs4243229	rs2966241
	rs4291899	rs4291899						
	rs7201637	rs9889094	rs7196609	rs7201637	rs13339413	rs1424151		
	rs8059915	rs11648233	rs8044837	rs4398102	rs4445895	rs2966245	rs8059915	rs3751860
		rs11642323	rs11860188	rs6564961	rs4497679	rs8191138		
	rs8191175	rs8191175						
	rs8191225	rs8191225						
	rs989018	rs2317615	rs989019	rs10514525	rs1364283	rs989018	rs4378606	rs10514524
	rs9934209	rs4888202	rs1017243	rs9939740	rs9319572	rs6564962	rs6564964	rs9940004
		rs2966248	rs4889456	rs1364285	rs9788807	rs9934209	rs2966249	rs1364286
rs2911420		rs1559427						
rs10739847	rs10739847							
rs11788785	rs13302476	rs11791650	rs11788785					
rs1810711	rs1807197	rs2031320	rs7875483	rs2147260	rs1810711	rs4306016	rs2031321	
	rs7048229	rs913580	rs6479179	rs1324196				
rs1983828	rs999269	rs2183009	rs1983828	rs9299363	rs1119864	rs8190495		
rs2026001	rs2026001							
rs2066475	rs2066486	rs8190541	rs371119	rs280659	rs867807	rs2476920	rs729390	
	rs2066475	rs407179	rs2476921	rs2479825	rs441402			
	rs12552648	rs12555788	rs12555788	rs12555788				
rs2066479	rs2066479							
rs2253502	rs2253502							
rs2257157	rs2257157							

	rs2476923	rs7039978	rs2476923					
	rs2476927	rs2476927	rs280654	rs7037932				
	rs2479828	rs2479828						
	rs394243	rs394243						
	rs7029101	rs375944	rs280663	rs7029101				
	rs8190512	rs8190512						
	rs8190534	rs8190534						
	rs8190536	rs8190536						
	rs8190557	rs12552648	rs12555788	rs8190581	rs8190557	rs2066475		
	rs9409407	rs9409407						
	HSD17B4	rs10478424	rs10478424	rs6897978				
rs6897978		rs6897978	rs10478424	rs11749784				
rs11749784		rs11749784	rs6897978					
rs10463469		rs10463469	rs6898518	rs17453681				
rs257977		rs257977						
rs439954		rs439954	rs450118	rs442923	rs384346			
rs7706359		rs7706359	rs17388769					
rs457106		rs457106	rs2945327	rs32659	rs455949	rs26180	rs2451816	rs463513
		rs32651	rs32665	rs2678070	rs257973	rs25640	rs32662	rs257974
rs2455463		rs2455463						
rs7723390		rs4895195	rs11959717	rs2560718	rs17145471	rs7723390	rs17145477	rs12653702
		rs17145475	rs11748477	rs11746780	rs17145473	rs10073818	rs17145476	rs3850200
		rs11748530	rs3850201	rs11957255	rs11539471	rs2287712	rs10051019	rs4895195
rs11241507		rs3822527	rs1490756	rs3797368	rs11949608	rs150938	rs257969	rs2451814
		rs1651227	rs10064000	rs257985	rs11241507	rs3797372	rs1155777	rs17145464
		rs2914210						
rs11205		rs11205	rs246966	rs165995				
rs17145475	rs17145475	rs11748477	rs11746780	rs17145473	rs10073818	rs17145476	rs3850200	
	rs11748530	rs3850201	rs11957255	rs11539471	rs2287712	rs10051019	rs4895195	
	rs12653702	rs11959717	rs2560718	rs17145471	rs7723390	rs17145477		
rs3850202	rs3850202	rs2636964						
HSD17B5 (AKR1C3)	rs11252932	rs11252932						
	rs3763676	rs3763676	rs1937843	rs10904415	rs11252936	rs11252931	rs11252937	rs11252934
		rs7477623	rs7741	rs6601901	rs11252972	rs11252955	rs10508294	rs11252935
		rs11252968	rs17134288	rs12354530	rs10904416			
	rs12529	rs1937840	rs1937845	rs1937904	rs12529	rs10795245	rs4880708	rs2801883
	rs2801882	rs1937906						
rs2518049	rs10904411	rs2211630	rs2518049	rs2398195	rs2518047	rs1937848	rs1937849	
	rs7920135	rs7917079	rs1937847	rs12387				

	rs7741	rs7477623	rs7741	rs6601901	rs11252972	rs11252955	rs10508294	rs11252935
		rs11252968	rs17134288	rs12354530	rs10904416	rs11252931	rs11252937	rs11252934
		rs1937843	rs10904415	rs11252936	<u>rs3763676</u>			
	rs1937841	rs2398196	rs1937841	rs2298305				
	rs4559587	rs7894034	rs4559587					
	rs2154307	rs12242350	rs11252940	rs2245191	rs12782982	rs9329316	rs11252943	rs7068685
		rs1937920	rs11252942	rs11252945	rs11252950	rs11252951	rs11252944	rs2154307
		rs2154306	rs17173403	rs7904863	rs10160019	rs1937921	rs12263243	rs11252946
	rs12775701	rs12775701						
	rs2275928	rs3209896	rs2275928					
rs4242785	rs4242785							
rs10904423	rs3750566	rs10904428	rs10508293	rs4512728	rs11252960	rs4641368	rs1937905	
	rs1937923	rs10904422	rs1937922	rs10904423	rs7917546			
rs7086771	rs1937924	rs4880709	rs7088288	rs4414120	rs4636560	rs7086771	rs7921327	
HSD17B12	rs10768989	rs1914771	rs10768989	rs10768990	rs7108755	rs10768991		
	rs10838151	rs10838151	rs7932905	rs11037579	rs4288745	rs6485451	rs7129029	rs10838153
		rs7130849	rs1320168	rs4359199	rs7942595	rs12277307	rs7106967	rs7482725
		rs938942						
	rs11037567	rs17597526	rs11037567					
	rs11037575	rs4755215	rs7118602	rs10838190	rs11037571	rs7928182	rs11037653	rs4755732
		rs7944241	rs4755742	rs6485472	rs10838160	rs3802891	rs10838157	rs11037674
		rs4755735	rs11037575	rs4755736	rs4471405	rs11037611	rs6485471	rs7928422
		rs10838176	rs10768979	rs4755749	rs1878764	rs4755740	rs10838166	rs4620711
		rs7117036						
	rs11037589	rs11037589						
	rs11037634	rs11037634						
	rs11037662	rs11037662						
	rs11037685	rs11037685						
	rs12800235	rs12800235	rs17596617	rs12577642	rs7116641	rs6485443	<u>rs7928523</u>	
	rs1518820	rs1518820	<u>rs16937624</u>					
	rs16937624	rs16937624	<u>rs1518820</u>					
	rs4573669	rs4573669						
rs6485450	rs12363667	rs2862962	rs7120203	rs10501303	rs11037553	rs12364003	rs10742687	
	rs2863001	rs11037593	rs11037581	rs6485450	rs11037574			
rs6485453	rs6485453							
rs7110115	rs9971430	rs2037296	rs9804429	rs10838183	rs7110115	rs6485460	rs10400390	
	rs10838159	rs10838172	rs11037654	rs12273608	rs10838170	rs10400325	rs7105125	
	rs11037609							
rs7110437	rs2139154	rs10742688	rs7928134	rs4755745	rs10400343	rs10742690	rs10838185	

	rs7118659	rs4755741	rs6485455	rs11555762	rs12417393	rs10768983	rs4755744
	rs1518814	rs939015	rs7110437	rs3736505	rs4643069	rs7131110	rs1914773
	rs7101808	rs10768976	rs9971535	rs7115970	rs10838158	rs1061810	rs11037676
	rs10768975	rs10838186	rs6485456	rs1878851	rs10838162	rs1518821	rs1518822
	rs10734518	rs6485464					
rs7110523	rs7110523						
rs7114842	rs7114842						
rs7120753	rs7120753						
rs7928523	rs17596617	rs12577642	rs7116641	rs6485443	rs7928523	<u>rs12800235</u>	
rs9783294	rs9783294						
rs9783388	rs9783388						

Association between SNPs and htSNPs is based on a $R^2 > 0.80$, as determined with the data of the international hapmap project data release #28 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) for the CEU population and the present study. htSNPs in linkage disequilibrium are underlined in the associated SNPs section.

Supplementary Table 3. Relationship between polymorphisms in *HSD17B* genes and main predictors of biochemical recurrence in localized PCa

htSNPs	Genotypes	Gleason ≤6/7/≥8	pT ≤T2c/T3a/≥T3b	PSA ≤10/>10-20/>20	Margin: -/+
HSD17B2					
rs1364287	Major-homozygotes	82/129/40	154/69/35	173/54/30	183/75
	Heterozygotes	64/88/57	132/48/34	156/41/18	161/54
	Minor-homozygotes	11/24/9	24/12/8	31/5/8	22/22
	p value	0.037	0.73	0.21	0.004
rs8059915	Major-homozygotes	56/95/41	118/43/37	137/40/21	135/63
	Heterozygotes	76/106/49	146/58/32	167/45/24	169/68
	Minor-homozygotes	25/41/17	47/29/8	56/18/10	63/21
	p value	0.93	0.088	0.97	0.50
rs2955162	Major-homozygotes	99/149/56	183/80/49	208/71/33	219/93
	Heterozygotes	52/76/44	115/39/22	128/29/19	130/47
	Minor-homozygotes	5/17/6	14/8/6	22/3/3	16/12
	p value	0.20	0.44	0.35	0.21
rs4243229	Major-homozygotes	155/238/101	309/123/74	350/101/55	358/149
	Heterozygotes	2/5/6	3/7/3	10/2/1	9/4
	p value	0.072	0.018	0.83	0.91
	rs1119933	Major-homozygotes	89/136/51	163/77/43	195/57/30
Heterozygotes		59/90/51	132/43/30	141/43/22	149/57
Minor-homozygotes		7/16/5	16/8/4	21/3/4	14/14
p value		0.35	0.55	0.78	0.047
rs9934209	Major-homozygotes	75/110/38	134/66/28	159/43/26	166/62
	Heterozygotes	69/98/50	141/45/37	154/48/22	164/60
	Minor-homozygotes	12/34/19	35/19/12	45/12/8	35/31
	p value	0.069	0.15	0.93	0.004
rs7201637	Major-homozygotes	142/209/90	272/115/63	321/81/50	322/129
	Heterozygotes	13/32/16	37/13/14	37/19/6	41/23
	p value	0.20	0.22	0.060	0.23
	HSD17B3				
rs10739847	Major-homozygotes	46/68/32	91/32/27	93/40/15	104/45
	Heterozygotes	73/123/49	151/66/31	185/42/24	182/68
	Minor-homozygotes	37/50/26	68/31/19	80/20/17	78/40
	p value	0.87	0.50	0.060	0.41
rs2257157	Major-homozygotes	56/87/34	108/43/29	128/35/17	121/60
	Heterozygotes	68/109/59	140/69/33	167/50/24	178/63
	Minor-homozygotes	32/45/14	61/18/15	64/17/14	65/30
	p value	0.34	0.46	0.69	0.27
rs1810711	Major-homozygotes	45/65/31	84/41/21	101/24/21	103/43
	Heterozygotes	76/111/49	151/55/33	174/49/17	168/72
	Minor-homozygotes	33/63/21	69/31/21	77/27/16	87/34
	p value	0.75	0.67	0.10	0.93
HSD17B12					
rs11037662	Major-homozygotes	94/163/80	204/93/49	240/68/41	246/100
	Heterozygotes	61/75/25	103/37/24	113/34/14	115/50
	Minor-homozygotes	2/5/2	5/0/4	7/1/1	6/3
	p value	0.12	0.065	0.81	0.92
rs7928523	Major-homozygotes	67/121/44	138/57/40	164/44/27	169/67
	Heterozygotes	74/106/54	144/64/33	169/51/20	168/73
	Minor-homozygotes	16/16/9	30/9/4	27/8/9	30/13
	p value	0.40	0.53	0.19	0.90
rs12800235	Major-homozygotes	62/108/40	125/51/37	151/41/23	151/63
	Heterozygotes	72/111/49	147/60/30	165/50/19	171/66
	Minor-homozygotes	21/23/17	39/16/10	41/12/13	42/23
	p value	0.41	0.74	0.11	0.50
rs10838151	Major-homozygotes	40/54/35	79/36/18	93/22/20	92/42
	Heterozygotes	79/126/51	161/66/33	179/57/21	184/75
	Minor-homozygotes	36/63/20	70/27/26	87/22/15	89/35
	p value				

<i>p</i> value	0.27	0.26	0.22	0.84
----------------	------	------	------	------

P values are for Chi-square (Pearson) test. For rs7201637, rare minor-allele homozygotes were combined with heterozygotes.

Supplementary Table 4. Relationship between polymorphisms in *HSD17B* genes and main predictors of biochemical recurrence in advanced PCa

htSNPs	Genotypes	Gleason ≤6/7/≥8	pT ≤T2c/T3a/≥T3b	PSA ≤10/>10-20/>20	Margin: -/+
HSD17B2					
rs1364287	Major-homozygotes	16/38/46	15/27/59	40/32/29	34/68
	Heterozygotes	13/29/44	13/27/47	33/27/28	27/61
	Minor-homozygotes	3/7/10	0/4/16	7/5/8	7/13
	<i>p</i> value	0.97	0.23	0.90	0.90
rs8059915	Major-homozygotes	10/27/41	8/22/50	28/28/24	22/58
	Heterozygotes	17/34/45	17/28/51	37/28/32	34/64
	Minor-homozygotes	5/12/14	3/8/20	14/9/8	10/21
	<i>p</i> value	0.89	0.51	0.81	0.59
rs2955162	Major-homozygotes	15/43/62	17/31/74	45/39/38	38/85
	Heterozygotes	13/24/30	11/21/35	27/21/20	23/45
	Minor-homozygotes	3/6/8	0/4/13	6/4/7	7/10
	<i>p</i> value	0.76	0.31	0.90	0.68
rs4243229	Major-homozygotes	31/68/97	24/56/118	75/61/63	63/137
	Heterozygotes	0/2/2	1/0/3	1/1/2	2/2
	<i>P</i> value	0.64	0.40	0.73	0.43
	rs1119933	Major-homozygotes	14/37/50	13/28/61	38/37/28
Heterozygotes		15/27/36	12/24/44	31/22/27	24/57
Minor-homozygotes		2/6/11	0/4/15	7/5/7	7/12
<i>p</i> value		0.79	0.32	0.71	0.83
rs9934209	Major-homozygotes	7/35/41	12/20/51	31/29/23	29/55
	Heterozygotes	19/29/47	14/31/52	36/30/32	28/70
	Minor-homozygotes	5/9/12	2/5/19	11/5/10	11/15
	<i>p</i> value	0.20	0.42	0.63	0.37
rs7201637	Major-homozygotes	24/66/86	22/48/107	67/57/54	56/123
	Heterozygotes	7/5/11	3/8/13	9/7/8	7/17
	<i>P</i> value	0.078	0.81	0.94	0.83
	HSD17B3				
rs10739847	Major-homozygotes	13/26/23	9/16/40	22/25/17	20/45
	Heterozygotes	12/39/68	16/35/67	47/34/39	39/81
	Minor-homozygotes	7/8/8	3/6/14	11/5/7	8/15
	<i>p</i> value	0.017	0.96	0.47	0.93
rs2257157	Major-homozygotes	9/20/36	8/17/41	28/20/17	24/42
	Heterozygotes	17/35/41	13/28/52	34/29/31	26/68
	Minor-homozygotes	4/13/18	4/11/20	11/15/10	11/25
	<i>p</i> value	0.64	0.94	0.60	0.50
HSD17B12					
rs11037662	Major-homozygotes	20/46/69	19/38/79	48/48/40	44/93
	Heterozygotes	10/21/27	4/18/36	24/16/19	16/43
	Minor-homozygotes	1/4/1	2/0/4	4/0/2	3/3
	<i>p</i> value	0.50	0.21	0.33	0.47
rs7928523	Major-homozygotes	14/39/52	15/32/60	44/30/33	32/76
	Heterozygotes	14/24/36	12/14/48	27/24/24	28/47
	Minor-homozygotes	3/10/12	1/10/14	7/10/8	8/17
	<i>p</i> value	0.83	0.17	0.73	0.55
rs12800235	Major-homozygotes	14/34/42	14/31/47	38/28/26	27/66
	Heterozygotes	15/30/41	13/16/57	35/23/29	31/56
	Minor-homozygotes	3/10/17	1/11/18	7/13/10	10/20
	<i>p</i> value	0.84	0.06	0.34	0.64
rs10838151	Major-homozygotes	6/14/30	5/13/32	16/21/13	15/35
	Heterozygotes	20/37/45	14/31/57	38/30/35	33/70
	Minor-homozygotes	5/21/24	9/13/30	22/14/16	19/34
	<i>p</i> value	0.23	0.77	0.45	0.81

P values are for Chi-square (Pearson) test. Major-a. homo.: major allele homozygote. Minor-a. homo.: minor allele homozygote.

Supplementary Table 5. Relationship between polymorphisms in *HSD17B* genes and disease stage (localized vs. advanced PCa)

htSNPs	Clinically localized PCa (n=526)	Advanced PCa (n=213)	<i>p</i> value
<i>HSD17B2</i>			
rs1364287	44/218/259	20/88/102	0.89
rs8059915	85/238/200	31/98/80	0.88
rs2955162	28/178/315	17/68/123	0.36
rs4243229	0/13/511	0/4/200	0.68
rs1119933	28/209/284	19/81/103	0.14
rs7201637	2/62/455	0/24/179	0.67
rs11649253	1/32/483	2/16/186	0.24
<i>HSD17B3</i>			
rs10739847	118/252/151	23/120/65	0.000001
rs2257157	96/243/182	36/94/66	0.94
<i>HSD17B12</i>			
rs11037662	9/165/350	6/59/137	0.50
rs7928523	44/242/238	25/75/108	0.031
rs12800235	66/237/217	30/87/93	0.58
rs10838151	125/261/135	53/103/50	0.85

P values are for Chi-square (Pearson) test in the genomic model. Values represent the number of individuals with minor-allele homozygous, heterozygous, and major-allele homozygous allele, respectively.

Supplementary Figures legends

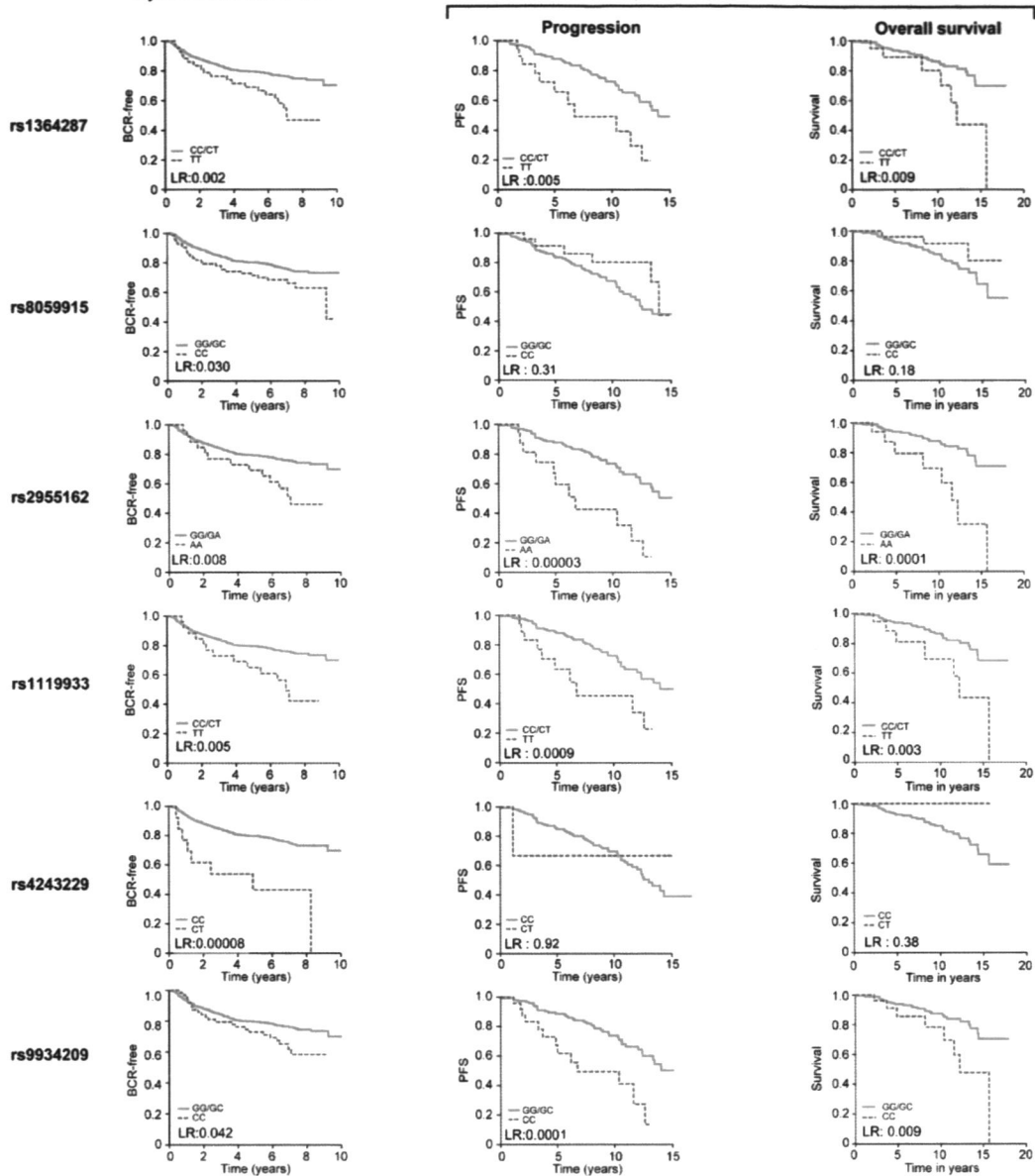
Figure 1. Kaplan-Meier curves of (A) biochemical recurrence (BCR)-free survival in localized PCa (n=526), (B) progression-free survival (PFS) in advanced PCa (n=213), and overall survival in advanced PCa. Kaplan-Meier curves of carriers of *HSD17B2* SNPs are indicated at the bottom of the figure. Log rank (LR) *p* values are shown in each frame.

Figure 2. Polymorphisms in *HSD17B3* (A) and *HSD17B12* (B) associated with a lower risk of biochemical recurrence (BCR) in localized PCa (n=526). Log rank (LR) *p* values are shown in each frame.

Supplementary Figure 1

A) Localized PCa

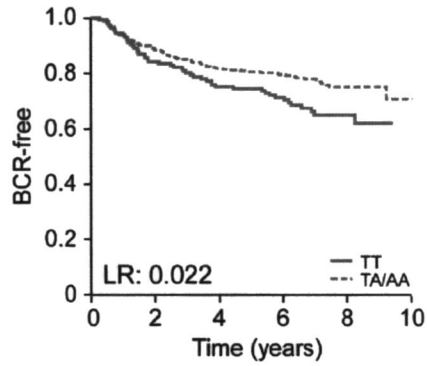
B) Advanced PCa



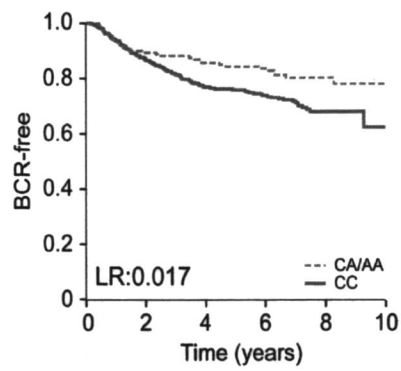
Supplementary Figure 2

A) *HSD17B3*

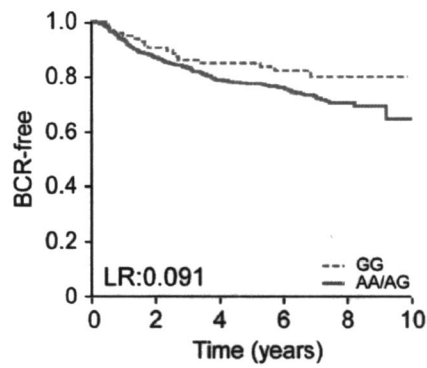
rs10739847

B) *HSD17B12*

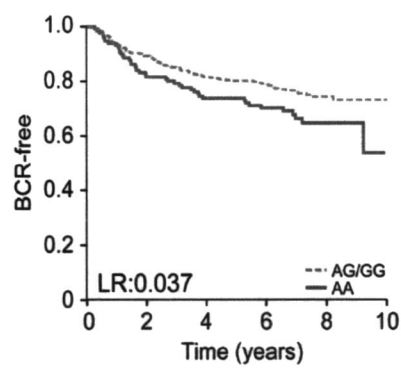
rs11037662



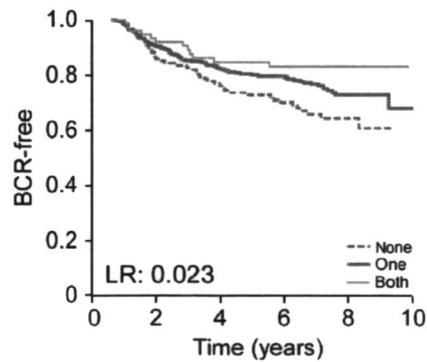
rs2257157



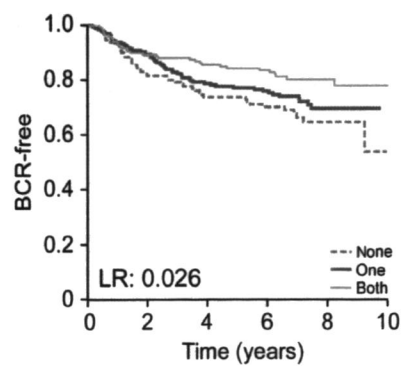
rs10838151



Co-occurrence



Co-occurrence



CHAPITRE VIII. Des marqueurs génétiques de gènes de la stéroïdogénèse sont associés à une forme létale du cancer de la prostate

Résumé

Des marqueurs génétiques de gènes de la stéroïdogénèse sont associés à une forme létale du cancer de la prostate

Éric Lévesque*, Shu-Pin Huang*, Étienne Audet-Walsh, Louis Lacombe, Yves Fradet, Chao-Yuan Huang, Chia-Cheng Yu, Chantal Guillemette^{†*} et Bo-Ying Bao^{†*}.

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente; [†] Co-auteur sénior.

Contexte. Le risque de récurrence et de mortalité associé au cancer de la prostate varie de façon importante entre les individus, malgré des caractéristiques clinico-pathologiques similaires. Il est donc nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs pronostiques afin de mieux cibler les patients atteints d'une forme agressive de cancer. Dans ce contexte, notre objectif était d'identifier l'association de variations génétiques de gènes de la stéroïdogénèse à la mortalité chez des patients atteints d'un cancer de la prostate avancé et traités par thérapie de privation d'androgènes.

Matériel et Méthodes. La cohorte à l'étude comprenait 601 patients atteints d'un cancer de la prostate avancé avec un temps moyen de suivi de 39 mois. Quarante-trois SNP au sein de 12 gènes candidats de la stéroïdogénèse ont été étudiés, et leur association à la mortalité a été évaluée par Kaplan-Meier (log-rank) et par régression de Cox.

Résultats. Après ajustement pour les facteurs pronostiques déjà utilisés en clinique, le rs1870050 (*CYP19A1*) s'est avéré être associé à une diminution du risque de mortalité de 30% ($p=0,048$). Nous avons démontré que quatre SNP situés au sein des gènes *CYP17A1* (rs6162), *HSD17B2* (rs4243229), *HSD17B3* (rs2257157) et *ESR1* (rs1062577) sont significativement associés à un risque accru de mortalité (augmentation par un facteur de 1,45 à 1,75; p entre 0,048 et 0,002). La présence de 1-2 et celle de ≥ 3 de ces génotypes multiplie le risque de mortalité par 3,06 (intervalle de confiance à 95% [IC95%] : 0,95-9,83; $p=0,07$) et de 7,33 (IC95%, 2,28-23,55; $p=0,0008$), respectivement.

Conclusion. Nous avons pu montrer l'association de plusieurs marqueurs moléculaires de la voie de la stéroïdogénèse à un mauvais pronostic. L'identification de variations génétiques associées à une forme létale du cancer de la prostate, pourrait permettre une médecine plus personnalisée dans le suivi des patients ainsi qu'une amélioration de l'approche thérapeutique utilisée. En fait, les gènes où se trouvent ces variations génétiques représentent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Article en préparation

Molecular Markers in Key Steroidogenic Pathways Associated With Lethal Prostate Cancer.

Éric Lévesque, MD, Ph.D.^{1,2*}, Shu-Pin Huang, MD, Ph.D.^{3,4*}, Étienne Audet-Walsh, M.Sc.¹, Louis Lacombe, MD², Yves Fradet, MD², Chao-Yuan Huang, MD⁵, Chia-Cheng Yu, MD⁶, Chantal Guillemette, Ph.D.^{1†} and Bo-Ying Bao, Ph.D.^{7,8†}

*These authors contributed equally.

¹Pharmacogenomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ) Research Center and Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada. ²L'Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ Research Center, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada. ³Department of Urology, Faculty of Medicine, College of Medicine, Kaohsiung Medical University and ⁴Department of Urology, Kaohsiung Medical University Hospital, Kaohsiung 80708, Taiwan; ⁵Department of Urology, National Taiwan University Hospital, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan; ⁶Division of Urology, Department of Surgery, Kaohsiung Veterans General Hospital, Kaohsiung, Taiwan; ⁷Department of Pharmacy, China Medical University, Taichung 40402, Taiwan; and ⁸Sex Hormone Research Center, China Medical University Hospital, Taichung 40402, Taiwan

Running head: Biomarkers of lethal PCa.

†Correspondence:

Drs Chantal Guillemette and Bo-Ying Bao are co-senior authors.

Bo-Ying Bao, PhD, Department of Pharmacy, China Medical University, 91 Hsueh-Shih Road, Taichung 40402, Taiwan. Phone: 886-4-2205-3366 ext. 5126; Fax: 886-4-2203-1075. E-mail: bao@gmail.cmu.edu.tw or

Chantal Guillemette, PhD, CHUQ Research Center, T3-48, 2705 Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel. (418) 654-2296 Fax. (418) 654-2298

chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca

Key words: Lethal prostate cancer, germline polymorphisms, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *CYP19A1*, *ESR1* and *CYP17A1*.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest: EL, CG, LL and YF have been named inventors on a patent application owned by Laval University on related work that preceded this study.

Abbreviations

4-dione: androstenedione; ADT: androgen-deprivation therapy; HR: hazard ratio; htSNP: haplotype-tagging SNP; HSD17B: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *HSD17B2*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; *HSD17B3*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3; *HSD17B12*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12; PCa: prostate cancer; PSA: prostate-specific antigen; SNP: Single nucleotide polymorphism; T: Testosterone; TNM: Tumor/Nodes/Metastasis staging system, CYP17A1; cytochrome P450 17-20 lyase; CYP19A1: aromatase, C18-steroids: estrogens; C19-steroids: androgens; C21-steroids: Progestins; ESR1: estrogen receptor alpha; P450_{scc}: P450 side-chain cleavage, SRD5A: 5 α -reductase, UGT: UDP-glucuronosyltransferase.

Abstract

Purpose. Prostate cancer (PCa) is a heterogeneous genetic disease, and the risk of recurrence and death differs greatly between individuals despite similar clinico-pathologic characteristics. Molecular methods for predicting prognosis in patients with aggressive form of the disease are urgently needed to personalize treatment approaches. The objective was to identify host genetic variations in key steroidogenic genes associated with aggressive and lethal PCa. **Methods.** The study examined 601 men with advanced PCa who had a mean follow-up of 39 months. Patients were genotyped for 43 haplotype-tagging SNPs in twelve candidate steroidogenic pathway genes and their prognostic significance on overall survival (OS) was assessed using Kaplan-Meier survival curves and Cox regression models. **Results.** After adjusting for known risk factors, the variant *CYP19A1* rs1870050 was associated with a reduced risk of death with a HR value of 0.70 ($p=0.048$). In contrast, four SNPs distributed across *CYP17A1* (rs6162), *HSD17B2* (rs4243229), *HSD17B3* (rs2257157) and *ESR1* (rs1062577) were significantly associated with poorer overall survival (OS) (HR and p values between 1.45 and 1.75, and 0.048 and 0.002, respectively). The presence of 1-2 or ≥ 3 of these polymorphisms was significantly associated with OS with HR values of 3.06 (95%CI, 0.95-9.83; $p=0.06$) and 7.33 (95%CI, 2.28-23.55; $p=0.0008$), respectively. **Conclusion.** This study identifies candidate molecular markers in key steroidogenic pathways with poor prognosis associated with lethal PCa and represents potential new therapeutic targets. These findings may facilitate a patient-tailored selection for follow-up and treatment strategies.

Introduction

One in 7 men will be diagnosed with prostate cancer (PCa) at some point in their lifetime (Jemal, Siegel et al. 2011). This malignant disease is clearly a major public health concern because it is the most common cancer in men and the second leading cause of cancer death in North America (Jemal, Siegel et al. 2011). It is well established that androgen hormones play a central role in PCa development and progression. Indeed, androgen deprivation therapy (ADT) is the cornerstone therapy for recurrent and metastatic PCa (Harris, Mostaghel et al. 2009; Horwitz 2009). Furthermore, castration-resistant prostate cancer (CRPC), once thought to be hormone-refractory, remains clearly driven by sex-steroid hormones (Bianchini and de Bono 2011). At this stage, even in low circulating testosterone environment, cancer cells generate significant active intracellular hormone levels to fuel cancer growth and proliferation (Montgomery, Mostaghel et al. 2008). Several studies support the role of sex-steroid formation in prostate cancer cells, which possess the enzymatic machinery to convert steroid precursors into more potent hormones (Montgomery, Mostaghel et al. 2008; Chang, Li et al. 2011; Sharifi 2011). This reinforces the need to block intracellular steroidogenesis of prostatic cells. In metastatic settings, this concept is further reinforced with the advent of new compounds such as *abiraterone acetate* and *MDV-3100*, which targets respectively the *CYP17A1* gene and the androgen receptor, both effective in the castration-resistant state (Miller 2010; Payton 2010; Scher, Beer et al. 2010; de Bono, Logothetis et al. 2011; Yap, Zivi et al. 2011). However, despite the improvement in survival of some patients with advanced prostate cancer, there are no available clinical prognostic molecular biomarkers of mortality after treatment modalities such as prostatectomy, radiation therapy, hormonal manipulation and chemotherapy.

In addition to tumour markers, host factors that include common germline variations might determine tumour behavior or serve as informative biomarkers. Indeed, in advanced disease state, studies have shown the impact of *HSD17B4* genetic variation (Ross, Oh et al. 2008), and expression (Rasiah, Gardiner-Garden et al. 2009) relative to disease progression, and variations in *SLCO2B1* and *SLCO1B3* on response to palliative ADT therapy (Yang, Xie et al.). However, for clinicians in the field, there is still a lack of molecular markers better defining aggressive and lethal PCa. Such discoveries would improve prognostication of PCa, help refine our follow-up strategies to optimize outcomes and identify key drug targets for new potential personalized approach.

Recently, genetic polymorphisms in *SRD5A*, *HSD17B* and common deletions in *UGT2B* genes were shown to be associated with biochemical recurrence in Caucasian and Asian PCa patients after prostatectomy (Audet-Walsh, Bellemare et al. 2011; Nadeau, Bellemare et al. 2011; Audet-Walsh et al. 2012). Such results are in agreement with significant effect of inherited genetic variations in the androgenic pathway on PCa recurrence and progression, regardless of race. Based on the above findings, we sought to investigate the link between common germline variations in additional candidate steroidogenic genes with progression and mortality.

Patients and Methods

Clinical data

Prostate cancer patients treated with ADT (orchiectomy or LHRH agonist with or without antiandrogen), including those with disease recurrence after local treatment, were recruited at three medical centers in Taiwan (Kaohsiung Medical University Hospital, Kaohsiung Veterans General Hospital, and National Taiwan University Hospital, from 1995 to 2009) and were included in this study. The patients' clinical characteristics at diagnosis (e.g., tumor stage, Gleason score) were obtained from medical records. At least two pathologists reached the same interpretation on the specimen before signing out the pathology report. Disease stage was determined by pathologic findings, pelvic computed tomography or magnetic resonance imaging, and radionuclide bone scans, according to the criteria outlined by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) tumor-node-metastasis (TNM) classification system.

Patient data were also collected during prospective follow-up. PCSM and ACM data were updated in 2010. The PSA nadir was defined as the lowest PSA value achieved during ADT treatment. Time to PSA nadir was defined as the duration of time it took for the PSA value to reach nadir after ADT initiation. In general, patients were followed every month with PSA tests at 3-monthly intervals. The cause of death was obtained by matching patients' personal identification number with the official cause of death registry provided by the Department of Health, Executive Yuan, Taiwan. PCSM was defined as the interval from the initiation of ADT to death from prostate cancer. The ACM was defined as the period from the initiation of ADT to death from any cause. In our cohort, 45% of the patients had local therapy before ADT initiation. Patients were excluded if the

clinicopathologic information or follow-up period were insufficient, leaving 601 patients in this cohort followed for a mean of 39 months. Overall, 145 deaths were identified and 101 of them died from prostate cancer. Prior to recruitment, each participant provided written informed consent for the analysis of their genome. The Institutional Review Board of all recruiting centers approved the research protocol.

DNA isolation and genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the Genomic DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) and stored at -80°C , as previously reported (Huang, Huang et al. 2011). For genotyping, PCR amplification was performed and the products were analyzed by Sequenom iPLEX matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry at the National Center for Genome Medicine, Academia Sinica, Taiwan. The average genotype call rate was 98% and SNPs with a missing call rate $\geq 5\%$ were excluded ($n=6$). Negative controls were present for every analysis and quality controls included 54 blind duplicates.

Statistical analysis

To analyze the association of SNPs with PCa-specific mortality (PCSM) and overall survival, individual htSNP was first considered using a model based on three categories (genomic model), namely major-allele homozygote, heterozygote, and minor-allele homozygote, because the function of most htSNPs remains unknown. For rare homozygotes (frequency $< 2\%$), minor-allele homozygotes were combined with the heterozygotes. Cox regression was performed on each SNP as an isolated covariate, with adjustment for clinicopathologic variables, as previously described (Huang, Huang et al. 2011). Multiple explanatory variables included known prognostic factors age at diagnosis,

clinical stage, Gleason score, PSA at ADT initiation, PSA nadir, time to PSA nadir, and treatment modality, as previously defined (Huang, Huang et al. 2011). After analyses with the genomic model, a secondary model was developed (recessive or dominant) for each SNP. All covariables were treated as categorical with $\leq 4\%$ missing values for all covariables. Statistical analyses were performed using PASW statistics 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Because multiple SNPs ($n=43$) were tested, false-discovery rates (q values) were calculated to determine the degree to which the tests were prone to false-positives, using the R *QVALUE* package (<http://genomics.princeton.edu/storeylab/qvalue/>) (Storey and Tibshirani 2003). The q value represents the expected proportion of false-positive results when announcing a test significant. Q values ≤ 0.20 were considered statistically significant.

Results

Clinical and pathologic characteristics of the studied population are shown in **Table 1**. A total of 43 htSNPs distributed across twelve candidate genes were selected for this study based on their role in hormone action, biosynthesis and metabolism (**Table 2**, **Supplementary Tables 1-3**). After adjustments for known clinicopathologic variables, five htSNPs in *CYP17A1*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *CYP19A1* and *ESR1* were significantly associated with overall survival (**Table 2**). Relative frequencies of SNPs in cancer patients and their corresponding hazard ratios (95% CI) as well as Kaplan-Meier curves and log-rank *p* values are shown in **Figure 1**, **Supplementary Figure 1**, **Table 2** and **Supplementary Tables 1-3**.

The rs4243229A in the *HSD17B2* gene, the product of which inactivates sex-steroids, was associated with an increased risk of death (HR 1.75, 95%CI 1.22-2.51; *p*=0.002). The variant rs2257157C of *HSD17B3*, involved in hormone bioactivation, was also associated with an increase risk of death (HR 1.60, 95%CI 1.11-2.33; *p*=0.013; **Table 2**). In addition, positive findings were observed for *CYP17A1*, involved in one of the initial steps in hormone biosynthesis immediately downstream the action of the P450 side chain cleavage (*P450scc*) gene, which transforms cholesterol into C21-steroids. The *CYP17A1* variant rs6162G was associated with mortality with a HR value 1.69 (95% CI 1.03-2.78; *p*=0.037).

Two additional variants in genes of the estrogen action and biosynthetic pathway were associated with risk of death. The rs1870050C variant in *CYP19A1*, encoding aromatase and the rate-limiting step involved in the estrogen formation from androgen, was associated with a lower risk of death (HR 0.70, 95%CI 0.49-1.00; *p*=0.048). The rs1062577A variant of the *ESR1* gene, which encodes for the estrogen receptor alpha, was

also associated with an increased risk of death with a HR of 1.45 (95% CI 1.02-2.07; $p=0.038$). For the association between genetic markers and known prognostic factors, only CYP17A rs6162 in relation to PSA levels at ADT initiation reached significance ($p=0.05$).

To adjust for multiple testing, we used the false-discovery rate calculation among all significant findings; rs6162 ($q=0.31$); rs1870050 ($q=0.31$); rs1062577 ($q=0.31$), rs2257157 ($q=0.20$) and rs4243229 ($q=0.06$). In this study, SNPs in *HSD17B2* and *HSD17B3* genes remained statistically significant after false-discovery rate corrections with q values ≤ 0.20 . The other 3 SNPs are not individually significant after corrections for multiple testing; they are comparable to results obtained in previous publications similar in scope (Ross, Oh et al. 2008; Yang, Xie et al. 2011). When the cumulative effects of the risk genotypes were investigated, significant associations with OS were observed for patients with one or two risk genotypes (HR 3.06, 95%CI 0.95-9.83, $p=0.06$) and carriers of 3 or more risk genotypes (HR 7.33, 95%CI 2.28-23.55, $p=0.0008$), with per-genotype HR of 1.55 (95%CI 1.31-1.83, $p=3 \times 10^{-7}$) (**Figure 1A**). Most of these associations were also significant for PCSM (**Figure 1B; Supplementary Table 1**). It is expected that the combination of these germline variations will be more powerful to predict recurrence than individual SNP. There was no other significant association between genetic variants and cancer survival.

Discussion

The assessment of clinical outcomes in PCa patients with the use of the molecular markers is of great importance for a personalized medical approach. At present, there is a clear unmet oncological needs to better predict lethal PCa; and thus far, no prognostic markers fill this gap in knowledge. Indeed, host genetic variations in the well-characterized hormone biosynthetic and degradation pathways have not been studied comprehensively in terms of molecular markers associated with lethal PCa in advanced disease settings (Ross, Oh et al. 2008; Huang, Huang et al. 2011; Huang, Huang et al. 2011). Here, we revealed the impact of common inherited variations in *CYP17A1*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, and *ESR1* on disease mortality, whereas a variation in *CYP19A1* gene was associated with an improvement in survival.

In this Asian cohort of advanced and CRPC patients, the *HSD17B2* polymorphism rs4243229 (a variant more frequent in Asians than Caucasians (MAF; 20% vs 1% (Audet-Walsh et al. 2012))), was associated with shorter survival after adjustment for known prognostic factors and defines a subgroup of patients at higher risk of dying of their disease. The product of the *HSD17B2* gene is involved in conversion of the 17 β -hydroxy forms of estrogens and androgens and activates 20 α -hydroxyprogesterone to progesterone (Saloniemi, Jokela et al. 2012). Remarkably, variants in this gene persist as prognostic markers associated with unfavourable outcomes at all disease stages from localized to more advanced diseases in both Asians and Caucasians (this study and ref. (Audet-Walsh et al. 2012)). Moreover, the *HSD17B3* gene was also associated with cancer death in this study. These two major *HSD17B2* and *HSD17B3* genes are involved in steroids interconversion and control C21, C19- and C18-steroid bioavailability for nuclear receptor

bindings and actions (Labrie, Luu-The et al. 2000; Harkonen, Torn et al. 2003). Positive markers in those genes, or functional polymorphisms in strong linkage, may impair or enhance gene function with subsequent modification in hormone levels in target cells and modification of the hormonal balance that favour cell proliferation, and ultimately patient's survival. Collectively, this study and those of others sustain a major role of the *HSD17B2* pathway as a crucial determinant in PCa aggressiveness, progression and survival (Elo, Harkonen et al. 1997; Harkonen, Torn et al. 2003; Harkonen, Kyllonen et al. 2005; Friedlander, Roy et al. 2011; Sun, Oh et al. 2011) and suggest that targeting this pathway might be beneficial for anticancer therapy.

Positive findings were also observed for genetic variations in *CYP17A1*, *CYP19A1* and *ESR1* genes (**Fig. 2**). *CYP17A1* is one of the early step in the biosynthesis of sex-steroids and the molecular target of abiraterone acetate that improves survival after docetaxel treatment in CRPC patients (de Bono, Logothetis et al. 2011). The *CYP17A1* rs6162 variation was associated with mortality further reinforcing the importance of this pathway in PCa progression (de Bono, Logothetis et al. 2011). Conversely, the rs1870050, associated with an improvement in OS, is located in the promoter of *CYP19A1* (aromatase), which is the rate-limiting step in estrogen production from androgen. Interestingly, this particular SNP was also associated with ADT failure in advanced PCa patients (Ross, Oh et al. 2008). Therefore, we may speculate that the impact of these SNPs on PCa survival is a direct result of their influence on gene activity altering local and/or systemic androgens and estrogens exposure, thus influencing tumor growth and progression of disseminated cancer cells.

The importance of inherited genetic variations in the sex-steroid biotransformation pathways is not surprising because they contribute to the maintenance and bioavailability of active hormones in target organs despite hormonal therapy (Montgomery, Mostaghel et al. 2008; Chang, Li et al. 2011). Nevertheless, most of these SNPs have not been biochemically studied and their functionality still remains unknown. However, based on our preliminary data and those of others (Elo, Harkonen et al. 1997; Harkonen, Torn et al. 2003; Harkonen, Kyllonen et al. 2005; Friedlander, Roy et al. 2011), we can speculate that genetic variations in the *HSD17B2* gene might lead to a loss of function in favour of the oxidative pathway and accumulation of potent androgens and estrogens (Figure 2), thereby potentially modifying the course of the disease. Results further emphasize the need to investigate the potential relationship between prognostic markers and tissular and circulating hormone levels to better understand their physiological consequence and contribution to cancer progression.

Strengths of the study include a significant number of patients, a candidate gene approach, survival as primary endpoint and the high plausibility of the association based on their biological function. Limitations are related to the use of a homogeneous Asian population, number of death (n=145) preventing us to report interaction between markers, a relatively short follow-up time and the scarcity of functional data for positive markers. Nonetheless, the rs4243229 (*HSD17B2*) and rs2257157 (*HSD17B3*) SNPs associated with mortality herein were also significantly associated with progression in localized disease²⁰. These results underscore the importance of *HSD17B* genes in cancer progression regardless of ethnic origins. For *CYP19A1*, the rs1870050 SNP was also previously associated with

time to progression in a cohort composed mainly of Caucasians¹³. Validation in other ethnic groups is also required for SNPs in *CYP17A1* and *ESR1*.

This study thus provides promising prognostic candidates for explaining the difference in clinical outcomes of advanced PCa. Indeed, the presence of such germline prognostic markers may partially explain why Asian men with PCa seem to have better outcomes compared to men of Western countries (Chen, Tzai et al. 2008). The assessment of host genetic variations in key steroidogenic pathways, such as those identified herein, represent additional evidence that these genes are involved throughout all stages of disease progression including a castrate environment. Furthermore, findings support the seed and soil hypothesis in which variation in steroidogenic pathways influence the hormonal microenvironment to which cancer cells are exposed and that would impact prostate cancer proliferation, recurrence and progression. These molecular markers based on individual patients' germline genetic variations, may thus lead to a better patient stratification in future clinical trials, targeting therapeutic interventions to optimize hormonal manipulation in patients with a high risk of recurrence and more likely to benefit from treatment. However, before such translational advance, additional investigations are required to fully characterize the underlying biological mechanisms driving the positive associations of inherited germline variations in those five key genes and survival. In conclusion, in combination with tumour changes, the major challenge will be to decipher precisely which sets of inherited gene combinations are associated with favourable and adverse outcomes to ultimately personalized the management of this highly prevalent and lethal cancer.

Acknowledgements: This work was supported by the National Science Council (NSC), Taiwan (grants NSC-98-2320-B-039-019-MY3, NSC-99-2314-B-037-018-MY3, and NSC-100-2314-B-039-009-MY3), China Medical University (grant CMU99-COL-13), and Kaohsiung Medical University Hospital (grant KMUH99-9R12 and grant KMUH100-0R42). This work was also supported by Canadian research grants from the Prostate Cancer Research Foundation of Canada (E.L.), Cancer Research Society (C.G.) and the Canada Research Chair Program (C.G.). E.L. is recipient of a CIHR clinician–scientist salary award. E.A.W. is recipient of a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship award. C.G. holds the Canada Research Chair in pharmacogenomics (Tier II). We thank the National Center for Genome Medicine, NSC, Taiwan, for technical support.

References

- Audet-Walsh, E., J. Bellemare, et al. (2011). "SRD5A Polymorphisms and Biochemical Failure After Radical Prostatectomy." Eur Urol **60**(6): 1226-1234.
- Audet-Walsh, E., Bellemare, J, Lacombe, L, Fradet, Y, Fradet, V, Douville, P, Guillemette C, and Lévesque E. (2012). "The Impact of Germline Genetic Variations in 17 β -hydroxysteroid 2 Dehydrogenases on Prostate Cancer Outcomes After Prostatectomy." Eur Urol.
- Bianchini, D. and J. S. de Bono (2011). "Continued targeting of androgen receptor signalling: a rational and efficacious therapeutic strategy in metastatic castration-resistant prostate cancer." Eur J Cancer **47 Suppl 3**: S189-194.
- Chang, K. H., R. Li, et al. (2011). "Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13728-13733.
- Chen, C. H., T. S. Tzai, et al. (2008). "Clinical outcome of Taiwanese men with metastatic prostate cancer compared with other ethnic groups." Urology **72**(6): 1287-1292.
- de Bono, J. S., C. J. Logothetis, et al. (2011). "Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer." N Engl J Med **364**(21): 1995-2005.
- Elo, J. P., P. Harkonen, et al. (1997). "Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behavior of prostate cancer." Cancer Res **57**(16): 3356-3359.
- Friedlander, T. W., R. Roy, et al. (2011). "Common Structural and Epigenetic Changes in the Genome of Castration Resistant Prostate Cancer." Cancer Res.

- Harkonen, P., A. P. Kyllonen, et al. (2005). "Loss of heterozygosity in chromosomal region 16q24.3 associated with progression of prostate cancer." Prostate **62**(3): 267-274.
- Harkonen, P., S. Torn, et al. (2003). "Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state." J Clin Endocrinol Metab **88**(2): 705-712.
- Harris, W. P., E. A. Mostaghel, et al. (2009). "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion." Nat Clin Pract Urol **6**(2): 76-85.
- Horwitz, E. M. (2009). "Prostate cancer: Optimizing the duration of androgen deprivation therapy." Nat Rev Urol **6**(10): 527-529.
- Huang, C. N., S. P. Huang, et al. (2011). "Genetic polymorphisms in androgen receptor-binding sites predict survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy." Ann Oncol.
- Huang, C. N., S. P. Huang, et al. (2011). "Genetic polymorphisms in oestrogen receptor-binding sites affect clinical outcomes in patients with prostate cancer receiving androgen-deprivation therapy." J Intern Med.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2011). "Cancer statistics, 2010." CA Cancer J Clin **60**(5): 277-300.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2000). "Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues." Trends Endocrinol Metab **11**(10): 421-427.

- Miller, K. (2010). "Words of wisdom. Re: Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. Scher HI, Beer TM, Higano CS, et al. Prostate Cancer Foundation/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium." Eur Urol **58**(3): 464-465.
- Montgomery, R. B., E. A. Mostaghel, et al. (2008). "Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth." Cancer Res **68**(11): 4447-4454.
- Nadeau, G., J. Bellemare, et al. (2011). "Deletions of the Androgen-Metabolizing UGT2B Genes Have an Effect on Circulating Steroid Levels and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy in Localized Prostate Cancer." J Clin Endocrinol Metab **96**(9): E1550-1557.
- Payton, S. (2010). "Prostate cancer: MDV3100 has antitumor activity in castration-resistant disease." Nat Rev Urol **7**(6): 300.
- Rasiah, K. K., M. Gardiner-Garden, et al. (2009). "HSD17B4 overexpression, an independent biomarker of poor patient outcome in prostate cancer." Mol Cell Endocrinol **301**(1-2): 89-96.
- Ross, R. W., W. K. Oh, et al. (2008). "Inherited variation in the androgen pathway is associated with the efficacy of androgen-deprivation therapy in men with prostate cancer." J Clin Oncol **26**(6): 842-847.
- Saloniemi, T., H. Jokela, et al. (2012). "The diversity of sex steroid action: novel functions of hydroxysteroid (17beta) dehydrogenases as revealed by genetically modified mouse models." J Endocrinol **212**(1): 27-40.

- Scher, H. I., T. M. Beer, et al. (2010). "Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study." Lancet **375**(9724): 1437-1446.
- Sharifi, N. (2011). "The 5alpha-Androstane-3-one Pathway to Dihydrotestosterone in Castration-Resistant Prostate Cancer." J Investig Med.
- Storey, J. D. and R. Tibshirani (2003). "Statistical significance for genomewide studies." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9440-9445.
- Sun, T., W. K. Oh, et al. (2011). "The impact of common genetic variations in genes of the sex hormone metabolic pathways on steroid hormone levels and prostate cancer aggressiveness." Cancer Prev Res (Phila) **4**(12): 2044-2050.
- Yang, M., W. Xie, et al. "SLCO2B1 and SLCO1B3 May Determine Time to Progression for Patients Receiving Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer." J Clin Oncol.
- Yang, M., W. Xie, et al. (2011). "SLCO2B1 and SLCO1B3 may determine time to progression for patients receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer." J Clin Oncol **29**(18): 2565-2573.
- Yap, T. A., A. Zivi, et al. (2011). "The changing therapeutic landscape of castration-resistant prostate cancer." Nat Rev Clin Oncol **8**(10): 597-610.

Figure Legends

Figure 1. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) with SNPs located in *HSD17B2*, *HSD17B3*, *CYP19A1*, *CYP17A1* and *ESR1*. Log rank (LR) *p* values are shown in each frame. Panels illustrate overall survival (A) and prostate cancer specific mortality (PCSM) (B).

Figure 2. Schematic representation of sex-steroid biosynthesis pathways. 17 β -HSD: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 5-DIOL: androst-5-ene-3 β , 17 β diol; A-dione: androstanedione; 4-Dione: androstenedione; DHEA: dehydroepiandrosterone; DHEA-S: DHEA-sulfate; DHT: dihydrotestosterone; E₁: estrone; E₂: estradiol; TESTO: testosterone.

Table 1. Clinical and pathologic characteristics of the study population (n=601)

Characteristics	N (%)
Age at diagnosis (years)	
Median (IQR)	73 (67 – 79)
≤73	320 (53.2)
>73	281 (46.8)
Follow up Median (months)	
Mean (range)	39 (3 – 125)
Disease Progression	
No ADT failure	184 (30.7)
ADT failure	415 (69.3)
PCSM	
Alive	499 (83.2)
Dead of disease	101 (16.8)
ACM	
Alive	455 (75.8)
Dead of any cause	145 (24.2)
Clinical stage at diagnosis	
T1/T2	189 (31.7)
T3/T4/N1	184 (30.8)
M1	224 (37.5)
Gleason score at diagnosis	
≤ 6	194 (33.0)
7	180 (30.6)
≥8	214 (36.4)
PSA at ADT initiation (ng/mL)	
Median (IQR)	35 (11 – 129)
<34.6	287 (49.6)
≥34.6	292 (50.4)
PSA nadir (ng/mL)	
Median (IQR)	0.18 (0.01 – 1.33)
<0.2	301 (50.8)
≥0.2	292 (49.2)
Time to PSA nadir, months	
Median (IQR)	10 (5 – 18)
<10	293 (49.4)
≥10	300 (50.6)
Treatment modality	
ADT as primary treatment	333 (55.7)
ADT for post RP PSA failure	68 (11.4)
ADT for post RT PSA failure	18 (3.0)
Neoadjuvant/adjuvant ADT with RT	125 (20.9)
Others	54 (9.0)

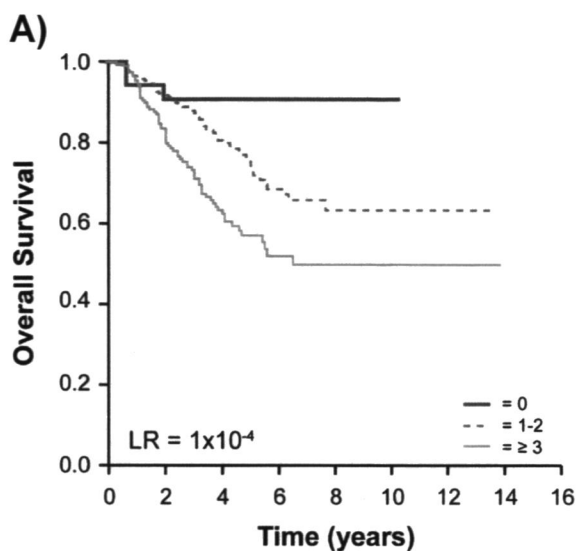
PSA, prostate-specific antigen; tumor (T); node (N). IQR, inter-quartile range.

Table 2. Association between SNPs in the steroidogenic pathway and all-cause mortality

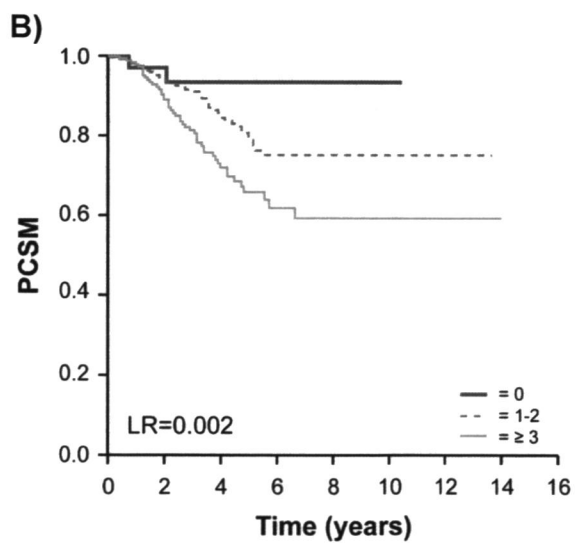
SNP	MAJO R	MINO R	MAF	ACM		Heterozygotes			All-cause Mortality			Secondary Model						
				DEAD	ALIVE	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	Model	HR	95% CI	p			
<i>CYP17A1</i>																		
rs1004467	TT	CC	33%	15/59/59	40/196/177	0.94	0.65	1.37	0.75	0.78	0.43	1.42	0.42	DOM	0.91	0.63	1.29	0.58
rs2486758	TT	CC	22%	7/47/80	17/148/246	0.96	0.66	1.38	0.81	1.87	0.85	4.11	0.12	REC	1.90	0.87	4.13	0.10
rs6162	AA	GG	47%	34/66/34	85/207/120	1.24	0.80	1.92	0.35	1.69	1.03	2.78	0.037	REC	1.49	0.99	2.25	0.06
rs743572	GG	AA	47%	32/65/36	84/206/117	1.13	0.73	1.74	0.59	1.53	0.93	2.52	0.10	REC	1.42	0.93	2.17	0.10
<i>CYP19A1</i>																		
rs1870050	AA	CC	29%	7/51/76	39/174/200	0.72	0.50	1.04	0.08	0.57	0.26	1.25	0.16	DOM	0.70	0.49	1.00	0.048
rs2446404	AA	GG	3%	0/7/127	1/29/382									DOM	0.55	0.24	1.28	0.17
<i>ESR1</i>																		
rs1062577	TT	AA	24%	9/52/72	23/144/249	1.42	0.98	2.06	0.06	1.68	0.82	3.41	0.15	DOM	1.45	1.02	2.07	0.038
rs2982683	CC	TT	18%	2/41/91	11/127/275	0.90	0.61	1.32	0.58	0.99	0.24	4.08	0.99	REC	1.03	0.25	4.21	0.97
rs3003922	GG	CC	46%	24/69/38	75/226/107	1.11	0.73	1.68	0.63	1.10	0.64	1.88	0.73	DOM	1.11	0.74	1.64	0.62
rs488133	CC	TT	7%	1/16/117	0/54/356									DOM	0.66	0.38	1.14	0.14
rs9341016	TT	CC	14%	2/36/93	12/85/310	1.00	0.67	1.49	0.99	1.52	0.37	6.34	0.56	REC	1.52	0.37	6.32	0.56
<i>HSD17B2</i>																		
rs1119933	GG	AA	9%	1/21/111	1/75/336									DOM	1.12	0.70	1.78	0.63
rs1364287	CC	TT	5%	0/14/119	1/43/366									DOM	1.00	0.57	1.75	0.99
rs2955162	GG	AA	10%	1/21/112	2/80/332									DOM	1.04	0.66	1.66	0.85
rs4243229	GG	AA	20%	9/48/76	15/123/273	1.73	1.19	2.51	0.004	1.96	0.87	4.38	0.10	DOM	1.75	1.22	2.51	0.002
rs7201637	TT	AA	18%	4/33/97	13/130/270	0.65	0.43	0.98	0.041	1.13	0.41	3.10	0.82	DOM	0.68	0.46	1.02	0.06
rs8059915	CC	GG	32%	15/50/69	41/181/190	0.73	0.50	1.07	0.11	0.89	0.50	1.60	0.70	DOM	0.76	0.54	1.09	0.13
rs9934209	GG	CC	44%	25/68/41	77/211/126	1.06	0.70	1.59	0.79	1.21	0.72	2.03	0.47	REC	1.17	0.74	1.84	0.50
<i>HSD17B3</i>																		
rs10739847	AA	TT	41%	22/60/50	73/191/144	1.03	0.70	1.52	0.89	0.95	0.56	1.62	0.85	REC	0.94	0.58	1.51	0.79
rs1810711	GG	TT	41%	21/66/47	60/214/137	0.87	0.59	1.29	0.50	1.08	0.64	1.83	0.76	REC	1.18	0.73	1.88	0.50
rs2257157	TT	CC	35%	14/76/44	52/180/181	1.72	1.17	2.52	0.005	1.14	0.61	2.15	0.68	DOM	1.60	1.11	2.33	0.013

P<0.05 are indicated in bold. HRs were adjusted for age, TNM staging, Gleason score, PSA at ADT initiation, PSA nadir, time to PSA nadir, and treatment modality as described in the Materials and Methods section. DOM= dominant model. REC= recessive model. When the frequency of rare minor-allele homozygotes was ≤2%, they were combined with heterozygotes. For these SNPs, values were not computed for heterozygotes or minor-allele homozygotes, and corresponding boxes are in gray.

Figure 1

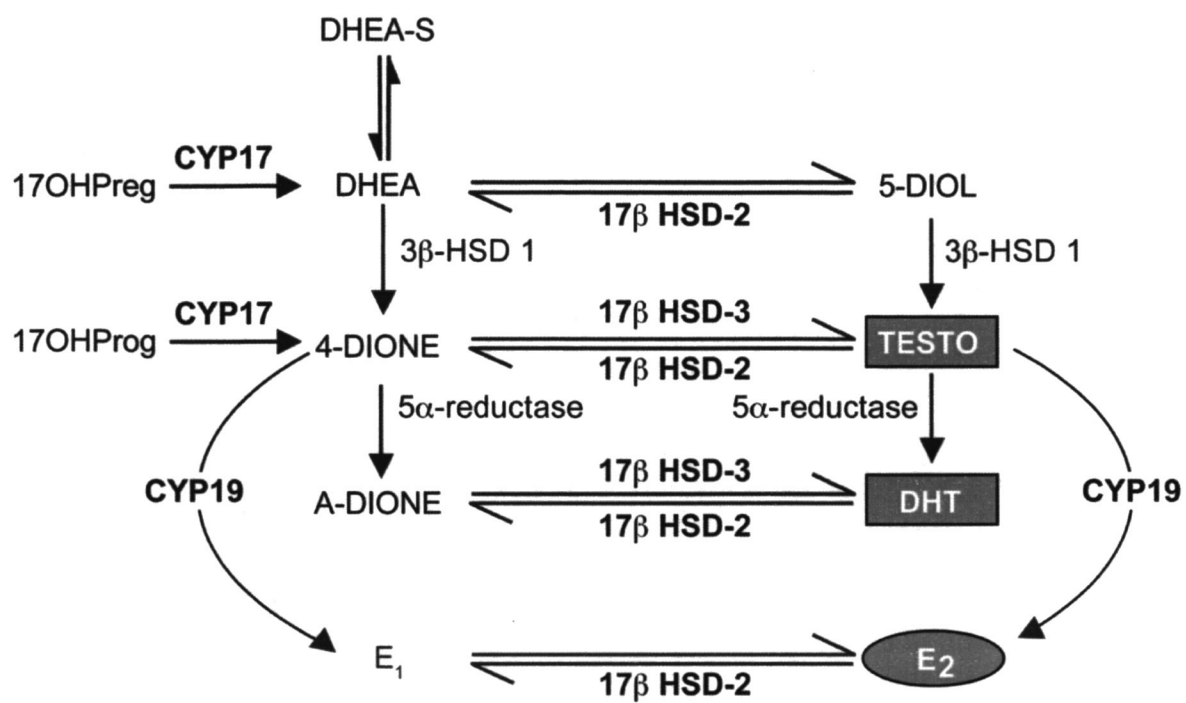


	HR	95% CI		<i>p</i>
0 risk genotype	1.00	(reference)		
1-2 risk genotypes	3.06	0.95	9.83	0.06
≥ 3 risk genotypes	7.33	2.28	23.55	0.0008
Per allele	1.55	1.31	1.83	3×10^{-7}



	HR	95% CI		<i>p</i>
0 risk genotype	1.00	(reference)		
1-2 risk genotypes	3.47	0.84	14.44	0.087
≥ 3 risk genotypes	8.43	2.03	35.05	0.003
Per allele	1.54	1.27	1.88	0.00002

Figure 2



Supplementary Table 1. Association between SNPs in the steroidogenic pathway and prostate cancer-specific mortality

SNP	MAJOR	MINOR	MAF	PCSM		Heterozygotes				Prostate Cancer-Specific Mortality				Secondary Model				
				DEAD	ALIVE	HR	95% CI	p	HR	95% CI	P value	Model	HR	95% CI	p			
CYP17A1																		
rs1004467	TT	CC	33%	11/40/44	44/215/192	0.87	0.56	1.35	0.53	0.70	0.35	1.42	0.33	DOM	0.83	0.54	1.26	0.38
rs2486758	TT	CC	22%	5/34/57	19/161/269	0.91	0.59	1.40	0.66	2.06	0.81	5.27	0.13	REC	2.14	0.85	5.39	0.11
rs6162	AA	GG	47%	25/47/25	94/226/129	1.27	0.75	2.15	0.37	1.84	1.03	3.28	0.040	REC	1.59	0.99	2.55	0.06
rs743572	GG	AA	47%	23/45/27	93/226/126	1.07	0.64	1.80	0.80	1.55	0.87	2.78	0.14	REC	1.49	0.91	2.43	0.11
CYP19A1																		
rs1870050	AA	CC	29%	4/37/56	42/188/220	0.69	0.45	1.06	0.09	0.43	0.15	1.20	0.11	DOM	0.65	0.43	0.99	0.043
rs2446404	AA	GG	3%	0/5/91	1/31/418									DOM	0.46	0.16	1.28	0.14
ESR1																		
rs1062577	TT	AA	24%	5/36/55	27/160/266	1.26	0.82	1.94	0.30	1.35	0.53	3.41	0.53	DOM	1.27	0.84	1.92	0.26
rs2982683	CC	TT	18%	1/31/64	12/137/302	0.97	0.62	1.50	0.88	0.76	0.10	5.59	0.79	REC	0.77	0.11	5.63	0.80
rs3003922	GG	CC	46%	16/49/28	83/246/117	1.10	0.68	1.79	0.70	1.02	0.54	1.93	0.95	DOM	1.08	0.68	1.72	0.74
rs488133	CC	TT	7%	0/13/83	1/57/390									DOM	0.71	0.38	1.31	0.27
rs9341016	TT	CC	14%	2/23/68	12/98/335	0.77	0.48	1.26	0.30	2.81	0.66	11.90	0.16	REC	2.92	0.69	12.37	0.15
HSD17B2																		
rs1119933	GG	AA	9%	1/19/75	1/77/372									DOM	1.56	0.94	2.59	0.08
rs1364287	CC	TT	5%	0/12/83	1/45/402									DOM	1.31	0.71	2.43	0.38
rs2955162	GG	AA	10%	1/19/76	2/82/368									DOM	1.42	0.86	2.34	0.18
rs4243229	GG	AA	20%	7/31/57	17/140/292	1.47	0.94	2.32	0.09	2.37	0.98	5.71	0.06	DOM	1.57	1.02	2.41	0.042
rs7201637	TT	AA	18%	3/25/68	14/138/299	0.62	0.38	1.01	0.06	1.34	0.41	4.33	0.63	DOM	0.67	0.42	1.06	0.09
rs8059915	CC	GG	32%	12/36/48	44/195/211	0.71	0.45	1.10	0.13	0.90	0.46	1.75	0.75	DOM	0.75	0.49	1.13	0.16
rs9934209	GG	CC	44%	20/48/28	82/231/139	1.02	0.63	1.65	0.94	1.36	0.75	2.46	0.31	REC	1.34	0.80	2.24	0.26
HSD17B3																		
rs10739847	AA	TT	41%	13/41/41	82/210/153	0.84	0.54	1.32	0.46	0.64	0.33	1.25	0.19	REC	0.71	0.38	1.32	0.27
rs1810711	GG	TT	41%	15/50/31	66/230/153	0.96	0.61	1.53	0.88	1.13	0.61	2.11	0.69	REC	1.16	0.66	2.02	0.60
rs2257157	TT	CC	35%	8/57/31	58/199/194	1.76	1.13	2.74	0.012	1.03	0.47	2.27	0.94	DOM	1.62	1.05	2.50	0.029

P<0.05 are indicated in bold. HRs were adjusted for age, TNM staging, Gleason score, PSA at ADT initiation, PSA nadir, time to PSA nadir, and treatment modality as described in the Materials and Methods section.

DOM= dominant model. REC= recessive model. When the frequency of rare minor-allele homozygotes was $\leq 2\%$, they were combined with heterozygotes. For these SNPs, values were not computed for heterozygotes or minor-allele homozygotes, and corresponding boxes are in gray.

Supplementary Table 2. Non-significant associations between SNPs in candidate steroidogenic pathways and prostate cancer-specific mortality

SNP	MAJOR	MINOR	MAF	PCSM		Heterozygotes			Prostate Cancer-Specific Mortality			Secondary Model						
				DEAD	ALIVE	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value	Model	HR	95% CI	P value			
rs165849	GG	AA	48%	23/41/32	109/222/118	0.75	0.46	1.23	0.25	0.88	0.51	1.53	0.65	DOM	0.80	0.51	1.25	0.32
COMT																		
HSD17B12																		
rs10838151	GG	AA	26%	5/41/49	36/160/252	1.35	0.88	2.07	0.18	1.21	0.47	3.09	0.69	DOM	1.33	0.88	2.02	0.18
rs12800235	AA	GG	26%	5/41/50	35/161/254	1.30	0.85	2.01	0.23	1.19	0.47	3.05	0.71	DOM	1.29	0.85	1.96	0.23
rs7928523	CC	TT	26%	5/42/49	35/160/255	1.37	0.89	2.10	0.15	1.22	0.48	3.12	0.68	DOM	1.35	0.89	2.04	0.16
rs11037662	TT	GG	44%	15/51/30	97/205/150	1.27	0.79	2.02	0.32	0.85	0.45	1.62	0.63	REC	0.74	0.42	1.30	0.29
HSD3B1																		
rs6203	TT	CC	33%	7/48/41	52/201/199	0.90	0.58	1.40	0.65	0.75	0.33	1.69	0.48	DOM	0.88	0.58	1.34	0.54
SRD5A1																		
rs166050	AA	GG	9%	2/17/77	5/69/374									DOM	1.36	0.81	2.27	0.25
rs518673	GG	AA	23%	2/37/58	21/165/267	1.12	0.74	1.71	0.59	0.83	0.20	3.42	0.79	DOM	1.10	0.73	1.67	0.64
SRD5A2																		
rs12470143	CC	TT	34%	11/52/33	44/212/194	1.36	0.86	2.13	0.19	1.60	0.80	3.19	0.18	DOM	1.40	0.90	2.16	0.13
rs2208532	GG	AA	43%	20/51/25	71/233/144	1.21	0.74	1.98	0.45	1.53	0.84	2.79	0.17	REC	1.35	0.82	2.24	0.24
rs523349	GG	CC	45%	19/52/24	80/233/133	1.15	0.70	1.89	0.59	1.52	0.82	2.80	0.18	REC	1.39	0.83	2.31	0.21
rs676033	AA	GG	47%	24/52/21	88/237/125	1.28	0.76	2.15	0.36	1.69	0.93	3.07	0.09	REC	1.43	0.89	2.28	0.14
SULT2B1																		
rs10426628	AA	GG	47%	20/51/26	100/223/128	0.93	0.57	1.52	0.77	0.83	0.45	1.53	0.55	REC	0.87	0.52	1.46	0.61
rs3848542	CC	TT	42%	13/49/34	73/243/137	0.71	0.45	1.13	0.15	0.59	0.30	1.15	0.12	DOM	0.68	0.44	1.06	0.09
UGT1A																		
rs10929252	GG	CC	13%	1/19/76	9/104/339									DOM	1.26	0.76	2.08	0.37
rs11891311	GG	AA	13%	2/22/73	10/92/352									DOM	1.11	0.70	1.78	0.66
rs17862847	TT	AA	13%	2/17/73	9/102/330									DOM	1.18	0.70	1.97	0.54
rs17862875	GG	AA	12%	2/21/72	9/93/350									DOM	1.06	0.66	1.72	0.81
rs1823803	TT	CC	20%	3/27/66	17/146/286	0.93	0.59	1.46	0.74	1.35	0.42	4.37	0.62	REC	1.38	0.43	4.44	0.59
rs2741048	CC	AA	47%	13/53/28	98/222/121	1.20	0.74	1.94	0.46	0.88	0.45	1.74	0.72	REC	0.79	0.43	1.43	0.43
rs4663871	GG	AA	25%	4/30/62	34/169/243	0.88	0.57	1.38	0.58	1.03	0.37	2.91	0.95	DOM	0.90	0.58	1.38	0.62
rs6731242	TT	GG	12%	1/16/79	8/98/341	1.08	0.62	1.87	0.79	1.70	0.23	12.75	0.61	REC	1.69	0.23	12.62	0.61

HRs were adjusted for age, TNM staging, Gleason score, PSA at ADT initiation, PSA nadir, time to PSA nadir, and treatment modality as described in the Materials and Methods section.

DOM= dominant model. REC= recessive model. When the frequency of rare minor-allele homozygotes was $\leq 2\%$, they were combined with heterozygotes. For these SNPs, values were not computed for heterozygotes or minor-allele homozygotes, and corresponding boxes are in gray.

Supplementary Table 3. Non-significant associations between SNPs in candidate steroidogenic pathways and all-cause mortality.

SNP	MAJOR	MINOR	MAF	ACM		Heterozygotes			All cause mortality									
				DEAD	ALIVE	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value	Model	HR	95% CI	P value			
rs165849	GG	AA	48%	38/53/43	94/210/107	0.72	0.47	1.10	0.13	0.99	0.63	1.56	0.97	DOM	0.82	0.56	1.20	0.30
COMT																		
HSD17B12																		
rs10838151	GG	AA	26%	8/55/70	33/146/231	1.21	0.83	1.74	0.32	1.30	0.62	2.74	0.49	DOM	1.22	0.85	1.74	0.28
rs12800235	AA	GG	26%	8/55/71	32/147/233	1.18	0.81	1.70	0.39	1.31	0.62	2.75	0.48	DOM	1.19	0.84	1.70	0.33
rs7928523	CC	TT	26%	8/56/70	32/146/234	1.21	0.84	1.75	0.30	1.32	0.63	2.78	0.46	DOM	1.23	0.86	1.75	0.25
rs11037662	TT	GG	44%	25/66/43	87/190/137	1.04	0.70	1.55	0.84	0.99	0.59	1.65	0.97	REC	0.97	0.62	1.51	0.88
HSD3B1																		
rs6203	TT	CC	33%	14/62/58	45/187/182	0.90	0.62	1.30	0.56	1.04	0.56	1.93	0.89	DOM	0.92	0.64	1.32	0.65
SRD5A1																		
rs166050	AA	GG	9%	2/20/112	5/66/339									DOM	1.00	0.63	1.61	0.99
rs518673	GG	AA	23%	3/48/83	20/154/242	0.95	0.66	1.37	0.78	0.83	0.26	2.63	0.75	DOM	0.94	0.66	1.35	0.74
SRD5A2																		
rs12470143	CC	TT	34%	14/67/53	41/197/174	1.16	0.79	1.69	0.45	1.36	0.74	2.47	0.32	DOM	1.19	0.83	1.71	0.35
rs2208532	GG	AA	43%	26/71/36	65/213/133	1.22	0.80	1.85	0.35	1.52	0.91	2.56	0.11	REC	1.34	0.86	2.08	0.19
rs523349	GG	CC	45%	24/73/35	75/212/122	1.15	0.75	1.75	0.52	1.41	0.83	2.40	0.20	REC	1.29	0.82	2.02	0.27
rs676033	AA	GG	47%	30/74/30	82/215/116	1.30	0.84	2.02	0.24	1.51	0.90	2.54	0.12	REC	1.26	0.83	1.91	0.28
SULT2B1																		
rs10426628	AA	GG	47%	29/70/35	91/204/119	1.06	0.69	1.62	0.79	0.98	0.58	1.64	0.93	REC	0.94	0.61	1.45	0.78
rs3848542	CC	TT	42%	18/72/44	68/220/127	0.85	0.58	1.27	0.43	0.65	0.36	1.15	0.14	DOM	0.81	0.55	1.18	0.27
UGT1A																		
rs10929252	GG	CC	13%	1/30/103	9/93/312									DOM	1.34	0.89	2.03	0.16
rs11891311	GG	AA	13%	4/28/102	8/86/323									DOM	1.13	0.75	1.69	0.57
rs17862847	TT	AA	13%	2/28/100	9/91/303									DOM	1.27	0.84	1.93	0.26
rs17862875	GG	AA	12%	4/27/102	7/87/320									DOM	1.08	0.72	1.63	0.72
rs1823803	TT	CC	20%	6/38/90	14/135/262	0.99	0.67	1.45	0.94	1.99	0.86	4.62	0.11	REC	2.00	0.87	4.60	0.10
rs2741048	CC	AA	47%	26/70/36	85/205/113	1.13	0.74	1.73	0.56	1.24	0.73	2.10	0.43	REC	1.14	0.73	1.78	0.57
rs4663871	GG	AA	25%	7/45/82	31/154/223	0.91	0.62	1.32	0.61	1.13	0.51	2.48	0.77	DOM	0.93	0.65	1.33	0.69
rs6731242	TT	GG	12%	1/27/106	8/87/314	1.27	0.82	1.96	0.28	1.27	0.17	9.35	0.81	REC	1.23	0.17	9.06	0.84

HRs were adjusted for age, TNM staging, Gleason score, PSA at ADT initiation, PSA nadir, time to PSA nadir, and treatment modality as described in the Materials and Methods section.

DOM= dominant model. REC= recessive model. When the frequency of rare minor-allele homozygotes was $\leq 2\%$, they were combined with heterozygotes. For these SNPs, values were not computed for heterozygotes or minor-allele homozygotes, and corresponding boxes are in gray.

CHAPITRE IX. DISCUSSION

9. Rôle des hormones stéroïdiennes dans les cancers hormonodépendants

La dépendance hormonale des cancers du sein, de l'endomètre et de la prostate n'est plus à démontrer et est maintenant l'une des cibles thérapeutiques les plus communes dans le traitement de ces maladies. Depuis, de la purification des hormones stéroïdiennes jusqu'au clonage de leurs récepteurs, bien des progrès ont été réalisés quant à la reconnaissance de leurs rôles dans plusieurs cancers chez l'humain. Dans le cadre de mon doctorat, j'ai étudié le lien entre les hormones stéroïdiennes sexuelles et les cancers de l'endomètre et de la prostate, des premières phases de la maladie jusqu'au décès du patient, à l'aide de méthodes et d'approches novatrices. La relation entre ces hormones et l'évolution de ces cancers sera analysée en détail afin d'en apprécier l'ampleur et l'importance de mieux comprendre comment on pourrait utiliser la dépendance hormonale dans une perspective de médecine personnalisée.

9.1. Cancer de l'endomètre

9.1.1 Modèle des *unopposed estrogens*

Le modèle des *unopposed estrogens* est celui qui est le plus complet et le mieux appuyé par la littérature scientifique pour expliquer l'apparition et la progression du cancer de l'endomètre. Il ne fait plus aucun doute que l'exposition prolongée et excessive à l'E₂ est l'une des principales voies impliquées dans la transformation maligne et le développement du cancer de l'endomètre, qu'il soit d'origine endogène ou exogène (Gambrell 1977; Austin et al. 1991; Nyholm et al. 1993; Potischman et al. 1996; Sherman et al. 1997; Akhmedkhanov et al. 2001; Berstein et al. 2003; Lukanova et al. 2004; Allen et al. 2008; Allen et al. 2010). En effet, les niveaux circulants d'œstrogènes et de leurs métabolites sont augmentés de 11-147% chez les cas de cancer de l'endomètre par rapport aux femmes saines (Chapitres II et IV). Cela se traduit par un risque de plus de 10 fois supérieur de développer un cancer de l'endomètre chez les femmes qui se retrouvent dans les tertiles supérieurs d'E₁ ou d'E₂ (Chapitre IV). Toutefois, les causes de l'augmentation des niveaux d'œstrogènes endogènes circulants et probablement tissulaires (Berstein et al.

2003), n'ont pas encore été totalement élucidées. L'aromatation de précurseurs dans le tissu adipeux, telle que démontrée par le lien de causalité obésité-cancer, est en partie responsable de cette élévation d'œstrogènes (Akhmedkhanov et al. 2001; Bergstrom et al. 2001; Crosbie et al. 2010). De plus, cette augmentation des niveaux circulants d'œstrogènes est probablement favorisée par les niveaux élevés de précurseurs surrénaliens et d'androgènes, qui sont les précurseurs obligatoires des estrogènes (4-dione et testostérone).

En effet, chez les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre, il y a une altération du profil des stéroïdes circulants plus globale que ce qui avait été rapporté préalablement (Chapitre IV) (Bonney et al. 1986; Austin et al. 1991; Nyholm et al. 1993; Potischman et al. 1996; Sherman et al. 1997; Lukanova et al. 2004; Allen et al. 2008). En fait, les femmes démontrant des niveaux circulants de DHEA ou de 4-dione dans le tertile supérieur ont un risque 10 fois plus élevé de développer un cancer de l'endomètre que les femmes se situant dans le tertile inférieur. Cela se traduit par des niveaux circulants de précurseurs surrénaliens et d'androgènes de 11 à 152% significativement plus élevés dans les cas de cancers de types I et II (Chapitre IV). Il semble que cette augmentation puisse se produire plusieurs années avant le diagnostic de cancer car les femmes se situant dans le quartile supérieur des niveaux de DHEA-S deux ans et plus avant leur diagnostic ont un risque deux fois plus grand de développer la maladie (Lukanova et al. 2004). On peut supposer que cette relation entre les niveaux de précurseurs surrénaliens et le risque de cancer de l'endomètre s'expliquerait par une augmentation subséquente des niveaux d'œstrogènes, bien que la cause de l'élévation de ces précurseurs soit encore inconnue. Comme les niveaux d'œstrogènes en circulation sont plus élevés chez les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre plusieurs années avant leur diagnostic (Lukanova et al. 2004), ils pourraient induire la synthèse de précurseurs par les surrénales tout comme le fait l'E₂ exogène (Abraham et al. 1975). En effet, l'E₂ exogène peut stimuler une production doublement accrue de DHEA et de DHEA-S par les surrénales (Abraham et al. 1975). Il est pertinent d'ajouter à cela que les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre ont des niveaux de testostérone et de 4-dione dans les veines ovariennes de deux à cinq fois plus élevés que

chez les femmes sans cancer (Bremond et al. 1982; Nagamani et al. 1986). Il y a donc un dérèglement des hormones stéroïdiennes circulantes chez les femmes atteintes de cancer de l'endomètre, dérèglement qui pourrait être causé notamment par une surproduction de stéroïdes sexuels par les ovaires et les glandes surrénales en plus des œstrogènes produits par le tissu adipeux.

Malgré l'augmentation de 11 à 152% des niveaux circulants des précurseurs surrénaliens et des androgènes (Chapitre IV), il est peu probable que ces stéroïdes soient transformés en œstrogènes dans la tumeur elle-même. Tout d'abord, l'ARNm de l'aromatase n'est que faiblement exprimé dans l'endomètre sain et son expression n'est pas altérée dans les tumeurs (Chapitre II), ce qui a aussi été observé par d'autres auteurs pour l'ARNm et la protéine (Jeon et al. 2007; Cornel et al. 2012). Ensuite, la sulfatase et la 17 β -HSD de type 12 sont exprimées à des niveaux plus de 700 fois supérieurs à ceux de l'aromatase (Chapitre II). De plus, l'expression de ces deux enzymes est augmentée de 2,2 et de 1,6 fois, respectivement, dans les tumeurs (Chapitre II). À partir de ces observations, il semble que la source majeure d'E₂ chez la femme postménopausée soit l'E₁-S circulant, bien qu'il reste à déterminer si les transporteurs de l'E₁-S sont eux-aussi surexprimés dans les tumeurs de l'endomètre. Cornel et coll. ont quant à eux observé une expression de la 17 β -HSD de type 1 plus de 40 fois plus élevée dans les tumeurs endométriales de grade 1, mais aucun changement d'expression de la 17 β -HSD de type 12 (Cornel et al. 2012). Une différence majeure entre l'étude de Cornel et la nôtre est que les échantillons de référence que nous avons utilisés provenaient d'endomètre péritumoral, généralement apparié avec l'endomètre tumoral correspondant. Au contraire, Cornel et coll. ont comparé l'expression des enzymes dans leurs échantillons tumoraux avec celle mesurée dans des échantillons d'endomètre provenant de femmes saines, i.e. non atteintes de cancer de l'endomètre (Cornel et al. 2012). Malgré tout, le profilage d'expression de l'ARNm et des dosages enzymatiques les amènent à la même conclusion que nous : c'est la réduction de l'E₁ en E₂ à partir de la désulfurylation de l'E₁-S qui représente la voie majeure d'apport en œstrogènes dans l'endomètre tant sain que tumoral, et non pas l'aromatase de la 4-dione et de la testostérone. C'est aussi le cas rencontré chez plusieurs lignées cellulaires

dérivées de cancers de l'endomètre (HEC-1A, Ishikawa, HEC-1B), chez lesquelles l'aromatase est négligeable comparativement à l'activité de sulfatase en ce qui a trait à la conversion de l' E_1 -S en E_1 (Fournier et al. 2009). Cette hypothèse est aussi supportée par l'observation faite chez les femmes atteintes d'un cancer de type endométrioïde, chez lesquelles la corrélation entre les niveaux d' E_1 et d' E_2 avec celui de l' E_1 -S ($r = 0,72$ et $0,71$, respectivement) est significativement plus élevée que chez les femmes saines ($r = 0,59$ et $0,54$, respectivement); Chapitre IV). Au contraire, la corrélation des niveaux d' E_1 et d' E_2 avec celui de la DHEA est significativement plus faible (passant respectivement de $0,49$ et $0,37$ chez les femmes saines à $0,23$ et $0,14$ chez les femmes atteintes d'un cancer; Chapitre IV). Chez les femmes avec un cancer de l'endomètre, la synthèse de l' E_2 intra-tumoral semble donc provenir davantage de l' E_1 -S que de la DHEA. Des expériences à partir de cellules d'endomètre en culture primaire visant à déterminer lequel des substrats parmi la 4-dione, la testostérone et l' E_1 -S permet la synthèse la plus élevée d' E_2 permettraient d'étudier cette hypothèse, soit que la source majeure d' E_2 dans l'endomètre tumoral est l' E_1 -S.

Les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre de type II ne démontrent pas de niveaux significativement plus élevés d'œstrogènes, mise à part l' E_1 , mais comme chez les femmes avec un cancer de type I, elles ont des niveaux de précurseurs surrénaliens et d'androgènes (DHEA, 4-dione, 5-diol, testostérone, ADT-G; Chapitre IV) de 22 à 110% plus élevés. Bien que les tumeurs de l'endomètre de type II ne soient pas associées à une stimulation marquée par les œstrogènes, elles ne seraient pas pour autant indépendantes de l'action des œstrogènes. En effet, Berstein et coll. ont démontré une absence d'expression protéique de l'aromatase dans la moitié des tumeurs de type I étudiées, alors que toutes les tumeurs de type II l'exprimaient (Berstein et al. 2005). Par contre, l'activité aromatase détectée était très faible (≈ 10 fmol/mg protéine/h), soit plus de 1000 fois moins que l'activité détectée chez des tumeurs mammaires avec la même technique de dosage (Tilson-Mallett et al. 1983). Au niveau tissulaire, Berstein et coll. n'ont pas observé de différences significatives des concentrations d' E_2 entre les tumeurs de type I et de type II (Berstein et al. 2003). Ces travaux, limités à l'étude d'une quarantaine de tissus ($n < 31$

tumeurs de type I et $n \leq 10$ de type II), appuient l'hypothèse que les œstrogènes promouvoient le développement tumoral chez les deux types de cancer. Puisque ces tumeurs se développent dans un endomètre atrophique chez des femmes possédant des niveaux normaux d'œstrogènes, il se peut que ces tumeurs surexpriment l'aromatase de façon à produire, à partir des précurseurs surrenaliens circulants, les œstrogènes qui favorisent leur croissance. L'E₂ ainsi synthétisé permettrait d'activer non pas l'ER α , généralement non exprimé chez les tumeurs non-endométrioïdes, mais peut-être d'activer la voie du GPER tel que suggéré par Smith et coll (Smith et al. 2007). Les résultats décrits ci-haut, ainsi que l'augmentation des niveaux d'E₁ dans les cas de cancer de type II (Chapitre IV), remettent en doute l'absence d'un rôle des hormones stéroïdiennes dans le développement des tumeurs non-endométrioïdes (Bokhman 1983; Sherman et al. 1997; Sivridis, Giatromanolaki, et al. 2001; Shabani et al. 2007) et supportent l'hypothèse que les œstrogènes seraient aussi impliqués dans l'évolution de ce type de cancer.

L'une des limites inhérentes aux travaux présentés dans cette thèse est que les femmes saines (cohorte témoin) n'ont pas été recrutées au même centre hospitalier ni durant la même période de temps que les patientes atteintes d'un cancer. Il y a donc plusieurs différences significatives entre les cohortes témoin et cancéreuse, notamment en ce qui a trait à l'âge, l'IMC, la prise de contraceptifs oraux, le recours à des thérapies hormonales de remplacement, etc. En fait, les différences observées entre les deux cohortes étaient prévisibles puisque ces derniers facteurs sont associés à une modification du risque de développer un cancer de l'endomètre (voir **Tableau 2**, Chapitre I). Il est possible que ces facteurs puissent expliquer en partie les différences dans les caractéristiques hormonales des deux groupes de femmes décrits dans les Chapitres II et IV. Seuls l'âge et l'IMC avaient, dans nos cohortes, un impact significatif sur les niveaux hormonaux, et il est peu probable que ces facteurs expliquent à eux seuls les différences de profil hormonal entre les cas de cancer et les femmes saines. En effet, étant donné la moyenne d'âge plus élevée des femmes atteintes d'un cancer, on aurait dû s'attendre à une diminution des niveaux de précurseurs surrenaliens en circulation plutôt qu'à une augmentation. De plus, toutes les analyses statistiques ont pris en compte ces variables et les associations

observées demeurent quand même significatives. Néanmoins, la validation de nos résultats dans des cohortes indépendantes, appariées suivant l'âge et l'IMC, est souhaitable afin de renforcer les conclusions présentées dans cette thèse.

9.1.2 Métabolisme des œstrogènes

Plusieurs résultats obtenus *in vitro* appuient le rôle du métabolisme des œstrogènes dans la transformation maligne et le développement du cancer de l'endomètre. Les données présentées au Chapitre II démontrent que les niveaux d'expression en ARNm de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des œstrogènes sont significativement altérés dans les tumeurs de l'endomètre, notamment plusieurs CYP, la COMT ainsi que plusieurs UGT.

La voie 4-OH des œstrogènes, catalysée par le CYP1B1, semble la voie principale d'hydroxylation dans le tissu endométrial sain, puisque cette enzyme est exprimée à un niveau 30 000 fois plus élevé que celui du CYP1A1, qui catalyse l'hydroxylation en position C2. Cette observation a en outre été décrite également dans une étude subséquente d'Hevir et coll. (Hevir, Sinkovec, et al. 2011). Si cette différence d'expression importante se répercute au niveau protéique, cela impliquerait que la voie de la 4-OH soit la voie prédominante dans l'endomètre sain, et ce, à un niveau bien supérieur à celui de la 2-OH. Dans ce contexte, il est possible que les dérivés 4-OH influencent la transformation maligne de par leurs propriétés cancérogènes. Notamment, ces dérivés entraînent une instabilité des microsatellites (Salama et al. 2008), i.e. un phénotype moléculaire associé au syndrome de Lynch (Liu 2007). L'endomètre est donc un tissu peut-être plus sensible que les autres à ce type de mutation. L'observation que de 20 à 45% des cas de cancers de l'endomètre de type I démontrent une instabilité des microsatellites est un autre argument appuyant cette hypothèse (Liu 2007; Zigelboim et al. 2007). Ainsi, dans un environnement où les œstrogènes sont plus abondants [\uparrow 2 fois dans la circulation et 1,5 fois dans les tissus; Chapitres II et IV et (Berstein et al. 2003)], la production de dérivés 4-OH est peut-être suffisante pour affecter de façon significative l'intégrité génomique et ainsi favoriser la transformation maligne. La quantification des niveaux circulants et tissulaires des dérivés 4-OH et de leur impact sur les erreurs de mésappariement des brins

d'ADN reste nécessaire afin de confirmer cette hypothèse. Des méthodes comme celle utilisée par Rogan et coll., qui ont pu démontrer que dans les tumeurs mammaires, les niveaux de 4-OHE_{1/2} sont plus de 3 fois supérieurs à ceux du tissu mammaire non-tumoral (Rogan et al. 2003), pourraient ainsi être utilisées. De façon similaire, Fuhrman et coll. ont démontré que des niveaux circulants élevés de 4-OHE₁ étaient associés à un doublement du risque de cancer du sein (Fuhrman et al. 2012). Le dosage tissulaire des œstrogènes dérivés de la voie 4-OH pourrait aider à comprendre leur rôle dans l'initiation tumorale ou, au contraire, rejeter cette hypothèse. Suite à la transformation maligne, on aurait pu s'attendre à ce que la synthèse des dérivés 4-OH soit augmentée de façon à accroître la formation de métabolites cancérigènes. Toutefois, l'ARNm du CYP1B1 diminue des deux tiers dans le tissu tumoral de l'endomètre (Chapitre II), diminution qui a aussi été observée par d'autres quant à l'ARNm et la protéine (Singh et al. 2008; Hevir, Sinkovec, et al. 2011). Cette diminution d'expression du CYP1B1 intra-tumoral entraîne probablement une réduction de la synthèse des dérivés 4-OH. L'UGT2B7 est exprimée à des niveaux élevés dans l'endomètre sain, et son expression en ARNm est augmentée de 3 fois dans l'endomètre tumoral (Chapitre II), ce qu'ont aussi observé Hevir et coll. (Hevir, Sinkovec, et al. 2011). Cette enzyme est, avec l'UGT1A10, l'UGT ayant l'activité de conjugaison la plus élevée en ce qui a trait aux dérivés 4-OH (Lépine et al. 2004; Starlard-Davenport et al. 2007). Ainsi, la combinaison d'une diminution de l'activité du CYP1B1 et de l'augmentation de l'UGT2B7 entraîne probablement une diminution de la production de dérivés 4-OH cancérigènes dans les tumeurs de l'endomètre.

Contrairement à la diminution probable de la voie 4-OH, la voie protectrice 2-MeOE₂ semble être à première vue favorisée dans le tissu tumoral comparativement au tissu péri-tumoral. En effet, l'expression de la COMT est augmentée dans les tissus tumoraux de l'endomètre de type I, ce qui a aussi été observé dans une plus petite étude (Singh et al. 2008). Au niveau protéique, Hevir et coll. ont montré que les niveaux de la MB-COMT diminuent alors que ceux de la S-COMT augmentent (Hevir, Sinkovec, et al. 2011), ce qui corrèle avec une hyper- ou une hypométhylation de leurs promoteurs, respectivement (Sasaki et al. 2003). La S-COMT démontre une préférence pour la méthylation du 2-OHE₂ comparativement au 4-OHE₂, tandis que la MB-COMT les

méthyle avec la même efficacité enzymatique (Bai et al. 2007). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il y a une augmentation de la production de 2-MeOE_{1/2} par les tumeurs endométriales. Toutefois, l'UGT1A1 et l'UGT1A3, qui peuvent conjuguer les 2-MeOE_{1/2} (Lépine et al. 2004), sont aussi surexprimées dans les tumeurs de l'endomètre. L'expression de la 17β-HSD de type 2, qui inactive le 2-MeOE₂ protecteur en le transformant en 2-MeOE₁ inactif (Liu et al. 2005; Kato et al. 2007), est augmentée de 4 fois dans les tumeurs (Chapitre II) (Cornel et al. 2012). La surexpression de la COMT, de la 17β-HSD de type 2, de l'UGT1A1 et de l'UGT1A3 corrèle avec l'augmentation des niveaux de 2-MeOE₁-3G et de 2-MeOE₂-3G dans les cas de cancers de type I ou de tumeurs invasives (Chapitre IV). Par conséquent, bien qu'il semble y avoir une augmentation de la synthèse du 2-MeOE₂ protecteur dans les cas de cancer de l'endomètre, il semble aussi y avoir une augmentation de son inactivation par l'induction de la transcription des enzymes nécessaires à son catabolisme, ce qui se refléterait sur les niveaux circulants des métabolites inactifs du 2-MeOE₂.

Le paradoxe apparent d'une diminution de la voie 4-OH cancérogène malgré une augmentation de la voie 2-MeOE₂ protectrice s'explique possiblement par des niveaux de 4-OH suffisants pour déclencher l'initiation de la transformation maligne, ainsi que par une augmentation du catabolisme du 2-MeOE₂. Pour confirmer cette hypothèse, le dosage des niveaux tissulaires ou circulants des métabolites 4-OH et 2-OH chez des femmes saines et des femmes atteintes de lésions pré-néoplasiques, permettrait de mieux comprendre leur rôle dans l'initiation tumorale. De plus, la quantification des dérivés 4-OH circulants ou tissulaires permettrait aussi de mieux comprendre leur rôle dans le développement tumoral suite à la transformation maligne. L'étude des dérivés de la voie 16-OH est tout aussi pertinente puisqu'ils représentent une des voies d'hydroxylation des œstrogènes prédominantes chez l'humain et que les niveaux urinaires de certains de ces stéroïdes ont été associés à la présence de cancers du sein (Eliassen et al. 2012; Huang et al. 2012). Il est aussi possible que l'expression des gènes associés à la voie 16-OH soit affectée, telle celle du CYP3A7, qui est réduite de 10 fois dans le tissu tumoral de l'endomètre (Hevir, Sinkovec, et al. 2011). D'ailleurs, l'expression de plusieurs autres gènes encodant des

enzymes de la stéroïdogénèse pourrait être quantifiée afin d'élargir le profil d'expression génique, notamment en ce qui a trait aux gènes impliqués dans l'inactivation des dérivés 2-OH et 4-OH (*NQO1*, *NQO2*, *GSTPI*, etc.), dans le transport des stéroïdes conjugués (*SLCO1B3*, *SLCO2B1*, *SLC21A6*, *ABCC2*, etc.) ou encore dans l'action des stéroïdes (*ESR1*, *ESR2*, *GPER*, etc.). Quoiqu'il en soit, à la lumière des résultats présentés, on peut penser que le métabolisme des œstrogènes est différent entre les tumeurs de l'endomètre et le tissu péri-tumoral, ce qui semble se refléter dans la circulation sanguine.

9.1.3 Relation entre les hormones circulantes et les caractéristiques clinico-pathologiques

Les travaux présentés au Chapitre IV montrent pour la première fois que les hormones stéroïdiennes circulantes sont associées à plusieurs caractéristiques différentes du cancer de l'endomètre. En fait, chez les femmes atteintes d'un cancer de type I, les augmentations significatives des niveaux circulants d'œstrogènes et de leurs métabolites atteignent en moyenne 225%. De façon générale, des niveaux circulants élevés d'œstrogènes sont associés à des tumeurs bien différenciées (de faible grade), confinées à l'endomètre et n'ayant pas envahi les ganglions lympho-vasculaires. La validité de nos résultats est appuyée par plusieurs forces de notre étude : la compilation des dossiers médicaux a été révisée par le même gynécologue, nous avons étudié un large éventail d'hormones et nous avons utilisé des méthodes analytiques sensibles et spécifiques en ce qui a trait au dosage de ces hormones (HPLC-MS/MS et GC-MS; Chapitres II à IV). Nous avons notamment étudié pour la première fois des œstrogènes-glucuronides dans le cadre du cancer de l'endomètre, et ce avec une méthode de dosage des stéroïdes circulants aussi sensible que les méthodes développées pour le dosage des métabolites des œstrogènes urinaires (matrice plus simple; Chapitre III) (Huang et al. 2012; Faupel-Badger et al. 2010; Eliassen et al. 2011) et plus spécifique pour les dérivés glucuronides des œstrogènes que les méthodes existantes (Stanczyk et al. 1980). De plus, nos résultats indiquent une surexpression des enzymes nécessaires à la synthèse de l'E₂ dans les tumeurs de type I, surexpression qui est associée à une surexposition aux œstrogènes. En fait, les tumeurs bien différenciées et peu invasives ont été associées aux niveaux les plus élevés observés

pour les œstrogènes en circulation. De telles tumeurs sont justement celles qui expriment le plus fortement l'ER α au niveau protéique (Creasman 1993; Rose 1996; Kounelis et al. 2000; Sivridis and Giatromanolaki 2001; Jeon et al. 2006). Enfin, les concentrations tumorales d'E₂ sont plus élevées dans les tumeurs de grades 1 et 2 que celles de grade 3 (Berstein et al. 2003), ce qui corrèle avec une activité de réduction de l'E₁ en E₂ environ 100 fois plus élevée dans les tumeurs de grade 1 que dans l'endomètre sain ou dans les tumeurs de grade supérieur (Cornel et al. 2012). L'association entre les caractéristiques clinico-pathologiques et les niveaux de plusieurs œstrogènes en circulation pourrait être le reflet partiel d'une modification de l'expression des voies enzymatiques dans les tumeurs.

Dans le contexte du cancer de l'endomètre, les œstrogènes endogènes stimulent la prolifération et favorisent la survie de la tumeur. Ainsi, la tumeur contribue peut-être de façon significative à la modulation des niveaux d'œstrogènes circulants de façon directe (production intra-tumorale) ou indirecte (stimulation de la production extra-tumorale). La mise en évidence d'un profil différent d'expression des gènes de la stéroïdogénèse entre les tumeurs de types I et II démontre que : 1) la tumeur possède la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse et au métabolisme de plusieurs hormones stéroïdiennes, 2) la stéroïdogénèse est affectée lors du développement tumoral, et 3) ce bouleversement varie selon les caractéristiques des tumeurs (i.e. celles de type I vs. type II). Ces résultats vont donc de pair avec notre démonstration que les niveaux des œstrogènes circulants sont associés à des caractéristiques clinico-pathologiques. L'observation que les femmes ayant subi une hystérectomie sans ablation des ovaires démontrent une diminution de 30-40% des niveaux de testostérone circulante suggère aussi que l'utérus influence de façon significative les concentrations d'hormones en circulation (Laughlin et al. 2000; Danforth et al. 2009). Chez ces femmes, il n'y a pas de diminution des niveaux d'E₁ et d'E₂ en circulation (Laughlin et al. 2000), ce qui va de pair avec l'expression très faible, voir sous le seuil de détection, de l'aromatase (Jeon et al. 2007; Cornel et al. 2012). Il n'est donc pas impossible que les tumeurs endométriales affectent de façon significative les niveaux d'œstrogènes circulants. L'utilisation de modèles de xénogreffes chez les rongeurs pourrait permettre de déterminer l'impact d'une tumeur endométriale sur les niveaux d'hormones

en circulation. On pourrait ainsi transplanter des cellules tumorales humaines de l'endomètre à des souris et vérifier s'il y a une altération du profil des hormones stéroïdiennes en circulation, un peu comme l'ont fait Foster et coll. Ceux-ci ont implanté des xénogreffes de cellules Ishikawa (tumeur endométriale humaine) chez des souris immunosupprimées ovariectomisées, traitées ou non avec des inhibiteurs de la sulfatase, dans le but de mesurer les niveaux circulants d' E_2 (Foster, Woo, et al. 2008). Il serait intéressant de vérifier, dans un contexte similaire, comment la présence d'une tumeur de l'endomètre affecterait les stéroïdes circulants et d'ainsi démontrer si une tumeur influence la stéroïdogénèse dans les tissus périphériques.

Les résultats de dosage et d'expression ainsi que les analyses de corrélation indiquent que l' E_1 -S est la source majeure d' E_2 dans l'endomètre sain et qu'il devient encore plus important dans les tumeurs de l'endomètre (Chapitres II et IV). Tout d'abord, des niveaux circulants élevés de ce stéroïde sont associés à un quadruplage du risque de cancer de l'endomètre, ce qui se traduit par des niveaux circulants d' E_1 -S 2,65 fois plus élevés chez les femmes avec un cancer de l'endomètre de type I. Chez ce type de tumeur, l'expression des enzymes impliquées dans la conversion de l' E_1 -S en E_2 représente la voie majeure de production d'œstrogènes actifs (i.e. une expression en ARNm de plus de 700 fois supérieure à celle de l'aromatase). Ensuite, des niveaux d' E_1 -S élevés sont associés à des tumeurs de bas grade et peu invasives, tout comme le sont ceux de l' E_2 . Toutefois, seul l' E_1 -S est associé à une invasion des ganglions lympho-vasculaires et à la récurrence du cancer de l'endomètre suite à une hystérectomie. Le nombre réduit de patientes ayant subi une récurrence de leur cancer est une contrainte importante de notre étude ($n=11$), et malgré que notre échantillonnage limité montre que les niveaux d' E_1 -S soient 4,5 fois supérieurs chez les femmes ayant développé une récurrence que chez les femmes saines, il est essentiel de répliquer nos résultats en utilisant de plus grandes cohortes. Cependant, les résultats observés dans le cancer du sein appuient les résultats présentés au Chapitre IV. En effet, dans le tissu tumoral mammaire, l'activité de la sulfatase est plus de 50 fois supérieure à celle de l'aromatase, ce qui suggère que l' E_1 -S est aussi la source intra-tissulaire majeure de l' E_2 (Pasqualini et al. 1996; Chetrite et al. 2000). Tout comme dans le cancer de

l'endomètre, l'activité sulfatase dans le tissu tumoral mammaire est 2,5 fois supérieure à celle du tissu sain (Chetrite et al. 2000). De plus, les niveaux d'E₁-S augmentent dans le tissu tumoral mammaire, passant de 237 à 454 pg/g tissu, soit une augmentation semblable à celle des niveaux d'E₂ intra-tumoral (Chetrite et al. 2000). Enfin, les niveaux moyens d'E₂ circulants chez les femmes ayant développé une récurrence de leur cancer du sein équivalent au double de ceux retrouvés chez les femmes ne développant pas de récurrence (Rock et al. 2008). En effet, bien que l'E₁-S n'ait pas été mesuré dans leur étude, les résultats de Rock et coll. indiquent que les niveaux circulants d'œstrogènes sont associés au risque de récurrence d'un cancer hormonodépendant, soit des résultats similaires à ceux qui ont été obtenus pour le cancer de l'endomètre dans notre étude. Dans le contexte du cancer de l'endomètre l'E₁-S semble donc être une source intra-tumorale importante d'E₂. Ainsi, une confirmation de nos résultats dans une plus grande cohorte ouvrirait la voie à l'utilisation d'inhibiteurs de la sulfatase pour le traitement ou la prévention de la récurrence d'un cancer de l'endomètre après une hystérectomie (Foster, Reed, et al. 2008; Purohit et al. 2011).

En résumé, les résultats présentés démontrent que les caractéristiques tumorales sont en partie liées aux niveaux circulants d'œstrogènes. En fait, il est possible, voire probable, que cette corrélation s'explique en partie par la production hormonale de la tumeur, une production qui serait suffisamment significative pour altérer les niveaux circulants d'œstrogènes et de leurs métabolites. Notamment, plusieurs voies de la stéroïdogénèse sont surexprimées au niveau tumoral et le profil d'expression varie selon le type de tumeur. De plus, les niveaux circulants d'œstrogènes et de leurs métabolites vont de pair avec les changements d'expression intra-tumoraux et varient eux aussi selon le type de tumeur. Enfin, les corrélations entre les niveaux circulants des différents œstrogènes sont différents en présence d'un cancer comparativement aux femmes en santé, ce qui indique aussi que la présence de néoplasie affecte l'équilibre hormonal.

9.2 Cancer de la prostate

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence de polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate (Amundadottir et al. 2006; Gudmundsson, Sulem, Manolescu, et al. 2007; Gudmundsson, Sulem, Steinthorsdottir, et al. 2007; Haiman et al. 2007; Yeager et al. 2007; Eeles et al. 2008; Gudmundsson et al. 2008; Sun et al. 2008; Thomas et al. 2008; Al Olama et al. 2009; Eeles et al. 2009; Gudmundsson et al. 2009; Yeager et al. 2009), mais aucune des variations génétiques qui en sont responsables n'a été associée de façon reproductible avec la progression de la maladie (**Tableau 7**) (Wiklund et al. 2009; Szulkin et al. 2012). Il est possible que ces variations génétiques ne jouent de rôle que lors de la transformation maligne et, qu'ultérieurement, elles n'influencent plus de façon majeure l'évolution d'un cancer de la prostate. Dans ce contexte, les polymorphismes des gènes de la stéroïdogénèse devenaient des candidats attrayants pour la découverte de marqueurs pronostiques. Les travaux présentés aux Chapitres V à VIII démontrent un rôle persistant des gènes de la stéroïdogénèse après le traitement initial d'une tumeur prostatique. En effet, plusieurs polymorphismes de gènes de la stéroïdogénèse sont associés à une récurrence biochimique, à la progression de cancers avancés et même à la mort, dans le cas de cancers traités à la TPA.

Dans un premier temps, un retour sur les polymorphismes associés à une récurrence biochimique, à la progression et à la mortalité chez les différentes populations sera effectué (**Section 9.2.1**). Ensuite, l'effet observé ou attendu de ces polymorphismes sur les hormones stéroïdiennes sera discuté (**Section 9.2.2**). Enfin, l'incorporation éventuelle de ce type de données génétiques dans la pratique clinique sera abordée (**Sections 9.2.3 et 9.2.4**).

9.2.1 Identification de marqueurs génétiques associés à la stéroïdogénèse et influençant l'évolution du cancer de la prostate

Dans les Chapitres V à VIII, il a été mis en évidence que plusieurs variations génétiques des gènes de la stéroïdogénèse influencent l'évolution du cancer de la prostate. L'hypothèse sous-jacente est que ces polymorphismes, ou ceux qui y sont associés, modifient l'exposition hormonale des cellules tumorales, ce qui se traduit par des effets positifs ou négatifs sur leur prolifération et sur la progression de la maladie.

Tout d'abord, les polymorphismes des gènes *SRD5A1* et *SRD5A2* étaient parmi les candidats les plus vraisemblables dans la recherche de variants génétiques pouvant affecter la progression du cancer de la prostate. Les résultats présentés au Chapitre V démontrent que 7 polymorphismes des gènes *SRD5A* sont associés à une récurrence biochimique du cancer de la prostate suite à une prostatectomie radicale. Cinq variations génétiques, la majorité dans le gène *SRD5A2*, doublent le risque de récurrence biochimique après chirurgie, alors que les deux autres sont protectrices. L'effet protecteur de ces deux variations se cumule, permettant une protection maximale chez les porteurs de 3-4 allèles mineurs (\downarrow 3 fois du risque de récurrence). Quatre des variations génétiques des gènes *SRD5A* ont aussi été associées à une récurrence biochimique chez une cohorte de patients d'origine asiatique. Ainsi, ces polymorphismes sont associés à une récurrence biochimique chez deux populations d'ethnies qui diffèrent par leurs fréquences alléliques et par les déséquilibres de liaison génétique (**Figure 14**). Parmi les SNP associés à une récurrence biochimique chez les Caucasiens et les Asiatiques, le rs523349 avait déjà été associé par plusieurs groupes au risque et à l'agressivité du cancer de la prostate (Shibata et al. 2002; Cicek et al. 2004; Salam et al. 2005; Cussenot, Azzouzi, Nicolaiew, Mangin, et al. 2007; Boger-Megiddo et al. 2008). L'importance des gènes *SRD5A* dans l'évolution du cancer de la prostate est appuyée par l'inhibition de l'activité 5 α -réductase, ce qui s'avère un moyen efficace de prévenir cette maladie (Thompson et al. 2003; Andriole et al. 2010). Au niveau tumoral, l'expression protéique et de l'ARNm du gène *SRD5A2* de 2-10 fois plus faible lors du développement de la tumeur, tandis qu'au contraire, celle du gène *SRD5A1* est de 2-10 fois supérieure, indique une expression différentielle des deux 5 α -réductases dans les tumeurs comparativement au tissu sain (Thomas, Lazier, et al. 2005; Titus et al. 2005; Stanbrough et al. 2006; Montgomery et al. 2008). Il apparaît donc probable que les 5 α -réductases jouent un rôle prépondérant dans le cancer de la prostate, bien que celui-ci reste à définir clairement. Aussi, il reste à déterminer si les polymorphismes identifiés permettent de mieux prédire une récurrence biochimique chez d'autres groupes ethniques (e.g. africaine), mais aussi par rapport à leur impact sur d'autres traitements comme les inhibiteurs de 5 α -réductase, le finastéride et le dutastéride.

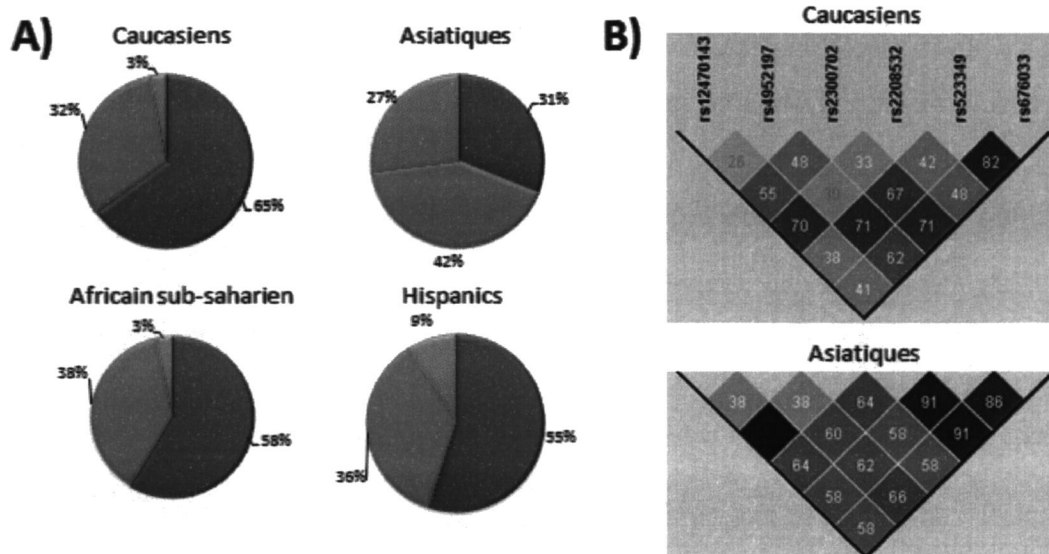


Figure 14. Il y a des différences génétiques du gène *SRD5A2* selon l'origine ethnique de l'individu. **A)** Fréquence des allèles V et L du variant V⁸⁹L (rs523349 du gène *SRD5A2*) chez différentes ethnies (bleu=VV, rouge=VL, vert=LL). Les fréquences des allèles rs523349 sont tirées des banques de données publiques du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). **B)** Différence des déséquilibres de liaison génétique entre six polymorphismes du gène *SRD5A2* entre Caucasiens et Asiatiques. Les données proviennent des données publiques du consortium *Hapmap* (build 28).

Ensuite, la modulation du signal androgénique par les enzymes UGT a été une cible d'intérêt dans la recherche de marqueurs génétiques pronostiques (Chapitre VI). Plusieurs études avaient déjà observé une association significative entre la délétion du gène *UGT2B17* et le risque de cancer de la prostate (Park et al. 2006; Park et al. 2007; Karypidis et al. 2008). Une récente méta-analyse de ce polymorphisme va aussi dans ce sens, et indique une susceptibilité accrue de 33% chez les porteurs de deux délétions ($p=0.05$) (Cai, Huang, et al. 2011), bien que certaines études n'aient pas observé une telle association (Gallagher et al. 2007; Olsson et al. 2008; Setlur et al. 2010). En plus de peut-être influencer la susceptibilité à cette maladie, nos résultats démontrent que la présence de ≥ 2 délétions au sein des gènes *UGT2B17* et *UGT2B28* double le risque de récurrence

biochimique suite à une prostatectomie radicale (Chapitre VI). Tout comme pour les polymorphismes SRD5A, l'association s'est montrée significative chez les patients d'origines caucasienne et asiatique, dans le contexte d'un cancer cliniquement localisé. Il est intéressant de noter qu'il y a une fréquence allélique des délétions *UGT2B17* bien supérieure chez les Asiatiques que chez les Caucasiens (73% contre 27%, respectivement).

En troisième lieu, plusieurs gènes de la famille des 17 β -HSD ont été criblés, notamment les gènes *HSD17B1*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, *HSD17B4*, *HSD17B5* et *HSD17B12* (Chapitre VII). Douze polymorphismes au sein de 3 de ces gènes sont associés à une récurrence biochimique. Trois de ces variations génétiques affectent le gène androgénique *HSD17B3* et trois autres, le gène œstrogénique *HSD17B12*. Les 6 autres variations génétiques se retrouvent au sein du gène *HSD17B2*, qui est associé à l'inactivation de la testostérone, de la DHT et de l'E₂. De plus, 4 SNP du gène *HSD17B2* se sont avérés associés à la progression et à la survie des Caucasiens atteints d'un cancer de la prostate localement avancé (HR :2,96-8,14; $p=0,004-0,00002$). L'altération génomique du locus *HSD17B2*, soit le tronquage génomique du gène, a aussi été associée au doublement du risque d'une récurrence biochimique (Locke et al. 2011), ce qui corrobore nos résultats. Qui plus est, le rs4243229 (*HSD17B2*) et le rs2257157 (*HSD17B3*) sont associés à un taux de mortalité plus élevé suite à un traitement à la TPA chez des patients asiatiques (Chapitre VIII). Ainsi, alors que les variations génétiques des gènes HSD17B, de même que les délétions UGT2B et les polymorphismes SRD5A, sont associés à une récurrence biochimique, nous avons démontré que les polymorphismes des gènes *HSD17B2* et *HSD17B3* sont les premiers à être associés en plus à la progression et à la mortalité du cancer de la prostate.

Enfin, chez la cohorte de 601 patients asiatiques traités à la TPA, nous avons observé que trois variations génétiques supplémentaires sont associées à la survie des patients, en plus du rs4243229 (*HSD17B2*) et du rs2257157 (*HSD17B3*; Chapitre VIII). L'une d'entre elles se retrouve au sein du gène *CYP17A1* (rs6162), tandis que les deux autres sont localisées respectivement dans le gène *CYP19A1* (rs1870050) et dans celui qui

encode l'ER α , soit l'*ESR1* (rs1062577). Le choix de ces polymorphismes a été basé sur les résultats positifs non publiés obtenus chez nos cohortes de 526 et de 213 patients caucasiens. De toute évidence, il est pertinent d'étudier d'autres gènes associés la stéroïdogénèse ou à l'AR, lesquels représentent des candidats d'intérêt dans la recherche de nouvelles variations génétiques pouvant influencer l'évolution d'un cancer de la prostate. Parmi ceux-ci, on peut mentionner d'autres membres de la famille des HSD17B, des SULT comme les *SULT1A1* et *SULT1E1* œstrogéniques, des transporteurs membranaires d'hormones stéroïdiennes (e.g. *SLCO1B3* et *SLCO2B1*), *SRD5A3*, les partenaires de l'AR, etc.

9.2.2 Effet des variations génétiques sur les niveaux hormonaux

L'hypothèse sous-jacente aux variations significativement associées à une récurrence et à une progression du cancer de la prostate est que les polymorphismes génétiques identifiés dans les Chapitres V à VIII modifieraient l'exposition des cellules tumorales aux hormones stéroïdiennes, favorisant ou bloquant leur prolifération ainsi que l'évolution du cancer. En effet, si un polymorphisme – ou une variation lui étant génétiquement liée – affecte l'activité d'un gène quelconque, ceci peut se traduire par une modification des niveaux d'hormones stéroïdiennes circulants ou tissulaires. Ce changement hormonal influencerait ensuite la prolifération et la survie des cellules tumorales, qui dépendent de ces hormones.

Le rs523349 (V⁸⁹L) est le SNP le plus étudié dans le cas du gène *SRD5A2*, et les données *in vitro* indiquent que son impact fonctionnel se traduit par une diminution de l'activité enzymatique de 40% (Makridakis et al. 2000), ce qui se répercute avec une diminution d'environ 25% des niveaux circulants des métabolites de la DHT, i.e. les 3 α -diol-G (Makridakis et al. 1997; Hsing et al. 2001). Ces résultats ne font toutefois pas consensus (Febbo et al. 1999; Allen et al. 2001) et soulignent l'importance de procéder à des dosages des niveaux circulants et tissulaires des métabolites glucuronides de la DHT avec des méthodes plus spécifiques que les méthodes immunologiques. L'allèle de faible activité L est associée à une augmentation de l'agressivité du cancer de la prostate (Shibata et al. 2002; Cicek et al. 2004; Salam et al. 2005; Cussenot, Azzouzi, Nicolaiew, Mangin, et al. 2007; Boger-Megiddo et al. 2008). On peut donc penser que si un cancer est plus

agressif à cause de cette variation, les porteurs de l'allèle L pourraient encourir un risque plus élevé de récurrence suite à une prostatectomie radicale, ce qui concorderait avec nos résultats (Chapitre V) et ceux de Shibata et coll. (Shibata et al. 2002). L'observation que la prise d'inhibiteurs des 5 α -réductases entraîne une diminution de 25% du risque de cancer de la prostate d'une part et, d'autre part, entraîne une augmentation de 25% des cancers de grades 8-10, fournit un autre argument en ce sens (Thompson et al. 2003; Hong et al. 2011; Theoret et al. 2011). On peut donc penser que l'allèle L du rs523349 dans *SRD5A2* entraînerait une diminution l'activité du gène dans la prostate saine, bien avant le développement d'une néoplasie. Dans ce contexte, un environnement avec des niveaux faibles de DHT représenterait probablement une barrière de sélection supplémentaire lors du développement tumoral. De plus, il a été décrit que l'expression de la 5 α -réductase de type 2, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, diminue lors de l'évolution du cancer de la prostate (Thomas, Lazier, et al. 2005; Titus et al. 2005; Stanbrough et al. 2006; Montgomery et al. 2008). Toutefois, cette hypothèse reste bien entendu à être validée.

Les autres variations génétiques du gène *SRD5A2* (rs12470143, rs2208532, rs4952197 et rs676033) significativement associées à une récurrence biochimique et présentées au Chapitre V n'ont pas encore été caractérisées au niveau fonctionnel. La plupart de ces SNP se retrouvent dans la région du promoteur ou dans l'intron 1, ce qui pourrait altérer l'expression ou l'épissage alternatif du gène *SRD5A2* (**Figure 15**). Il est aussi possible que des variations encore non répertoriées soient génétiquement liées aux htSNP génotypés, et le reséquençage du gène permettrait de les mettre en évidence. L'impact des polymorphismes au niveau du promoteur, que l'on peut évaluer par exemple à l'aide d'un système de gène-rapporteur à la luciférase, n'a pu être déterminé, car les lignées cellulaires dérivées de la prostate expriment très peu la 5 α -réductase de type 2 (données non présentées). Afin de pallier ce problème, il faudrait utiliser une lignée cellulaire exprimant fortement le gène d'intérêt, par exemple des lignées dérivées de la prostate saine ou d'un autre tissu, comme l'endomètre (Hevir, Vouk, et al. 2011). On pourrait aussi envisager d'induire la transcription du gène *SRD5A2* par différents traitements dans ces lignées. Par exemple, le TCDD induit l'expression de la 5 α -réductase

de type 2 chez la prostate de rat (Ohsako et al. 2001). Enfin, il reste aussi à élucider les polymorphismes situés dans les portions introniques. Ces variations génétiques pourraient affecter la synthèse de la DHT en affectant l'épissage alternatif ou l'expression des variants d'épissage. En effet, dans le cas de *SRD5A2*, plusieurs variants d'épissage ont été identifiés (**Figure 16**), et il pourrait en exister davantage. Toutefois, on peut s'attendre à ce que les variations génétiques qui augmentent le risque de récurrence biochimique aient le même impact physiologique que le V⁸⁹L et, qu'au contraire, la variation protectrice rs12470143 ait l'impact opposé sur l'activité du gène *SRD5A2*.

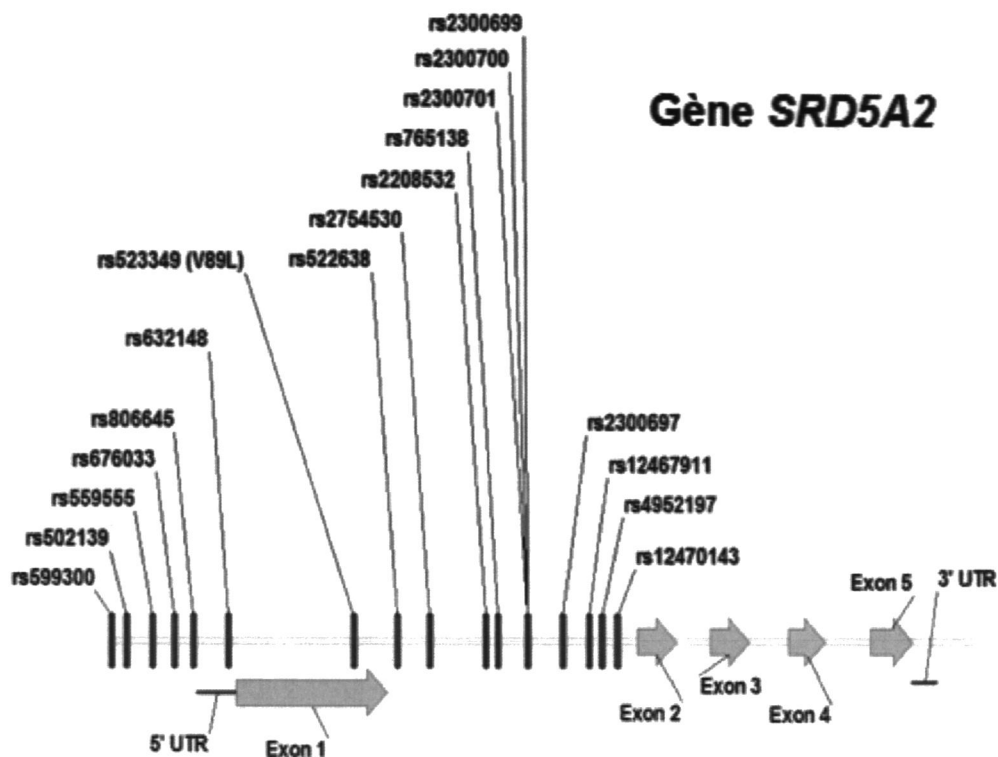


Figure 15. Localisation schématique des htSNP de *SRD5A2* associés à une récidence biochimique ainsi que leurs SNP liés. Les lignes verticales indiquent la localisation des SNP. UTR : régions transcrites non-traduites. Seul le rs523349 est situé dans la région codante du gène, i.e. dans l'exon 1.

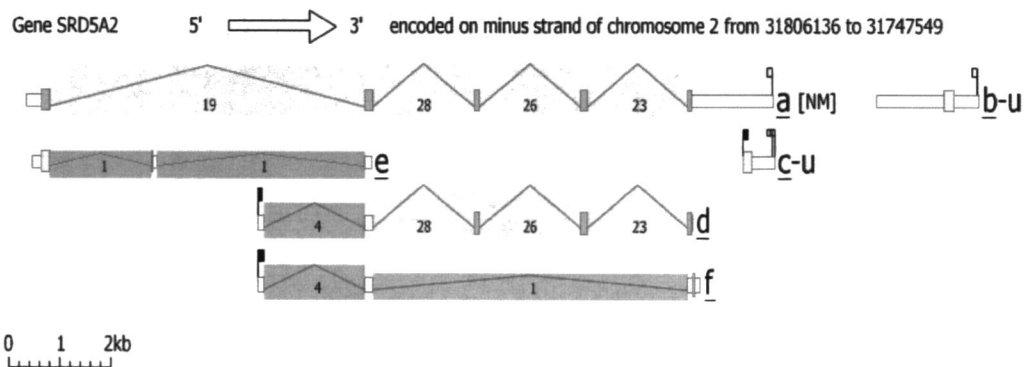


Figure 16. Variants d'épissage du gène *SRD5A2*. L'ARNm permettant la synthèse de la 5 α -réductase de type 2 est illustré en (a) tandis que les différents messagers alternatifs détectés dans les bases de données publiques sont schématisés en (b-f) (NCBI – *Aceview*). À noter que l'expression des transcrits (d) et (f) est probablement contrôlée par un deuxième promoteur situé dans l'intron 1 de *SRD5A2*.

Puisque l'expression de la 5 α -réductase de type 2 diminue lors de la progression tumorale et qu'au contraire celle de type 1 augmente, une variation génétique protectrice dans *SRD5A1* n'aura probablement pas le même effet sur la synthèse de la DHT qu'une variation protectrice de *SRD5A2*, et vice-versa. La 5 α -réductase de type 1 est inductible par la DHT chez des cellules dérivées du cancer de la prostate (LNCaP), au contraire de l'enzyme de type 2 qui n'est pas influencée par les androgènes dans ce contexte (Li et al. 2011). Dans une tumeur où l'AR est hyperactivé, on peut penser que ce dernier activera la transcription de la 5 α -réductase de type 1, mais non celle de type 2, ce qui pourrait expliquer en partie l'expression différentielle des 5 α -réductases durant l'évolution tumorale. De plus, l'expression de la 5 α -réductase de type 1 tant nucléaire qu'au niveau du réticulum endoplasmique est significativement plus élevée chez les tumeurs de grades et de stades élevés (Das et al. 2010). Ainsi, sa surexpression consécutive à l'activation de l'AR favoriserait une synthèse accrue de DHT et sa localisation intracellulaire permettrait une activation plus rapide de l'AR suite à la synthèse de la DHT dans le noyau. Parmi les htSNP significativement associés à une récurrence biochimique (rs166050 et rs518673), ou les SNP qui leur sont liés, seul le rs518673 n'est pas intronique et se situe à -3760 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Des résultats indiquent que l'allèle rs518673A protecteur diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur *SRD5A1* dans des cellules tumorales de prostate (**Figure 17**) et altère la formation de complexes ADN-protéine (**Figure 18**). Il s'agit ici de résultats obtenus *in vitro*, et il sera nécessaire de les valider au moyen d'autres approches. La quantification dans la prostate du transcrit par qPCR ou de la protéine par immunohistochimie pourrait permettre de déterminer si ce SNP diminue l'expression du gène dans le tissu sain et/ou tumoral. Ainsi, il semble que l'allèle A soit associé à une diminution de l'expression *in vitro* et probablement à une diminution de la synthèse de DHT dans les tissus tumoraux, ce qui expliquerait l'effet protecteur de cet allèle vis-à-vis une récurrence de la maladie. De plus, cette observation appuie notre hypothèse voulant que l'impact respectif des polymorphismes sur l'activité des gènes *SRD5A1* et *SRD5A2* soit de directions diamétralement opposées l'un par rapport à l'autre, puisque le rs518673A protecteur (type 1) diminue l'expression, alors que le variant de faible activité rs523349C (type 2) augmente au contraire le risque de récurrence.

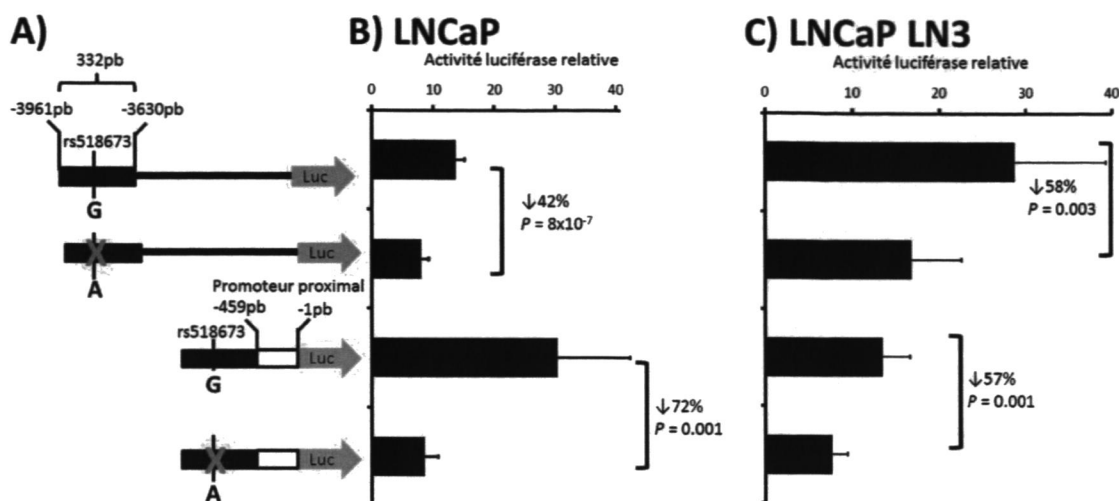


Figure 17. La variation rs518673A diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur *SRD5A1* (données non publiées). Le système utilisé consiste à utiliser un plasmide chez lequel le promoteur d'intérêt contrôle la transcription de la luciférase de luciole (*firefly*). La comparaison de l'activité luciférase des différentes constructions nous renseigne sur l'activité transcriptionnelle des promoteurs correspondants aux allèles majeur ou mineur. **A)** Schématisation des constructions luciférases utilisées. Dans la première paire de constructions, la mutation est située dans le contexte naturel du promoteur, c'est-à-dire à -3760 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Dans la deuxième paire de constructions, la portion distale du promoteur a été fusionnée avec la portion proximale. L'activité transcriptionnelle de ces constructions est illustrée en **(B)** pour les cellules LNCaP et en **(C)** pour les cellules LNCaP LN3. Les résultats ont été normalisés selon l'activité de la luciférase de méduse (*Renilla*) et mis à l'échelle par rapport au vecteur contrôle pGL3 (dépourvu du promoteur de *SRD5A1*). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata et les écarts types correspondants. Les valeurs de p ont été calculées par un test t de Student bilatéral sur deux échantillons de variances différentes.

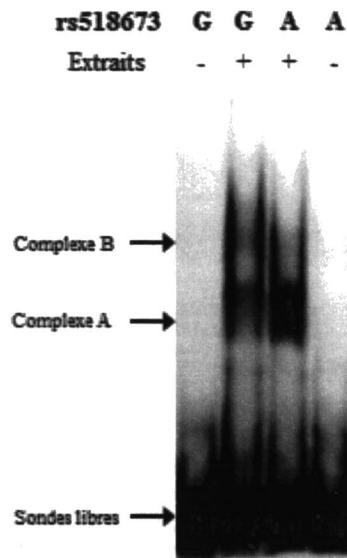


Figure 18. L'allèle rs518673A altère la formation de complexes ADN-protéine *in vitro* (données non publiées). Des extraits nucléaires de cellules LNCaP (5ug) ont été incubés en présence d'un oligonucléotide marqué contenant l'allèle G ou l'allèle A du rs518673 et ont été analysé par retard sur gel d'acrylamide. L'incubation de 30 minutes extraits-sondes a été effectuée à la température ambiante ($\approx 21^{\circ}\text{C}$) avant migration sur gel à 6% d'acrylamide (39:1) à 4°C pendant 4 heures.

La même difficulté d'étudier l'impact des polymorphismes des SRD5A s'applique aux SNP des autres gènes qui sont associés à une récurrence ou à la progression du cancer de la prostate (*HSD17B2*, *HSD17B3*, *HSD17B12*, *CYP17A1*, *CYP19A1* et *ESR1*; Chapitres VII et VIII). En effet, plus de 95% des polymorphismes identifiés sont localisés dans des régions non-codantes, principalement au sein des différents introns, et les effets biologiques potentiels de ces variations n'ont pas encore été élucidés. Les différents SNP identifiés pourraient notamment affecter des sites de reconnaissance des protéines impliquées dans l'épissage. Par exemple, le rs4243229 (*HSD17B2*) et les SNP introniques lui étant lié entraînent la modification d'une centaine de motifs putatifs associés avec les facteurs d'épissage selon le logiciel *Human Splicing Finder*. En fait, le changement d'une paire de bases est suffisant pour entraîner l'inclusion de nouveaux exons cryptiques et ainsi altérer, voir inactiver, la protéine encodée. Par exemple, un SNP dans le gène *RBI* situé à >2kb de chacun des exons flanquants entraîne l'insertion de 103pb intronique dans

l'ARNm correspondant, ce qui inactive la protéine RB et entraîne la maladie du rétinoblastome (Dehainault et al. 2007). Il est aussi possible que ces SNP affectent des éléments de régulation génique distaux. Par conséquent, l'impact des variations étudiées peut être majeur sur la ou les protéines encodées, que ce soit en affectant l'expression transcriptionnelle ou l'épissage. Des stratégies d'études similaires à celles proposées dans le cadre des polymorphismes SRD5A pourraient être utilisées pour élucider leur impact biologique. Tout comme pour les gènes SRD5A, on peut s'attendre à ce que les différents polymorphismes étudiés affectent la stéroïdogénèse. Par exemple, un changement dans l'activité des 17 β -HSD bouleversera l'équilibre d'activation/inactivation des stéroïdes sexuels dans les différents tissus où ces enzymes sont exprimées. La diminution de l'expression des enzymes de types 3 et 12 devrait entraîner une réduction de la synthèse de testostérone ainsi que de DHT, et de celle de l'E₂, respectivement, et vice-versa. Quant à elle, une diminution de l'activité de la 17 β -HSD de type 2 devrait faire augmenter la concentration des stéroïdes actifs (testostérone, DHT, E₂). Quant à l'effet des polymorphismes identifiés sur l'expression ou l'activité de ces gènes, on ne peut pour l'instant qu'y aller de conjectures. Ainsi, l'on sait que : 1) l'expression de l'ARNm de la 17 β -HSD de type 2 est diminuée dans le tissu tumoral comparativement au tissu sain ou hyperplasique (Elo et al. 1996; Koh et al. 2002); 2) la perte d'hétérozygotie au locus *HSD17B2*, phénotype de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur, est associée à une forme agressive du cancer de la prostate (Elo et al. 1997; Elo et al. 1999; Harkonen et al. 2005); 3) la perte d'expression de la 17 β -HSD de type 2 est associée à une transition de l'androgéno-dépendance à l'androgéno-indépendance cellulaires (Harkonen et al. 2003) et 4) la perte allélique au locus *HSD17B2* est associée à un risque doublés de récurrence biochimique (Locke et al. 2011). Puisque ces études supportent l'hypothèse d'une diminution de l'expression de la 17 β -HSD de type 2 lors de l'évolution du cancer de la prostate, on peut présumer que les SNP du gène *HSD17B2*, en augmentant le risque de progression, sont eux-aussi associés à une diminution de l'expression cette enzyme, ce qui entraînera probablement une augmentation des niveaux de DHT et de l'E₂ intra-tissulaires. Toutefois, le peu de données disponibles sur l'impact biologique des SNP identifiés aux Chapitres V, VII et VIII démontre bien la nécessité d'étudier leur(s) fonction(s) afin de

déterminer comment ils pourraient affecter l'environnement hormonal et de mieux comprendre le cancer de la prostate.

Associé à une mortalité accrue suite au traitement à la TPA, le rs6162 est une mutation synonyme dans l'exon 1 du gène *CYP17A1* (H⁴⁶H), qui est en déséquilibre de liaison génétique important avec le rs6163 (S⁶⁵S), avec 2 SNP au sein du promoteur (dont le rs743572), avec le rs4919683 (situé dans la région 3'UTR) et avec 3 SNP introniques (Chapitre VIII). Par contre, le rs743572 n'a pas été associé à la survie des patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique dans une étude de plus petite envergure que la nôtre (une centaine de patients) (Tsuchiya et al. 2006). Il apparaît donc clairement qu'une validation de nos résultats chez une cohorte indépendante soit nécessaire. L'inhibition de l'enzyme *CYP17A1* lors d'un traitement à l'acétate d'abiratéronne augmente la survie des patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique (de Bono et al. 2011). Donc, on pourrait s'attendre logiquement à ce qu'un allèle protecteur ait le même impact que ce traitement pharmacologique. Au contraire, un SNP qui diminue la survie (tel rs6162, HR=1,69, $p=0,037$) a probablement l'effet contraire, i.e. qu'il augmente l'activité de ce gène, soit au niveau tumoral, soit au niveau périphérique.

L'association significative entre les polymorphismes des gènes *CYP19A1* et *ESR1* et la survie lors d'un traitement à la TPA appuie l'hypothèse que les œstrogènes influencent l'évolution du cancer de la prostate (Chapitre VIII). Le SNP rs1870050 de *CYP19A1* a justement été associé à la réponse à la TPA par un autre groupe de recherche (Ross et al. 2008). De plus, un microsatellite retrouvé au sein de ce gène et qui est associé à une augmentation des niveaux circulants d'E₂ (Gennari et al. 2004) a été associé également à une augmentation de la mortalité chez des patients asiatiques atteints d'un cancer de la prostate métastatique (Tsuchiya et al. 2006). Ainsi, l'allèle mineur rs1870050C est protecteur et l'on peut penser qu'il pourrait entraîner une diminution de la synthèse d'E₂. Puisque l'aromatase est surexprimée dans le cancer de la prostate et dans les CRPC (Ellem et al. 2004; Montgomery et al. 2008), il est probable qu'il y ait une augmentation des niveaux d'œstrogènes intra-tumoraux, et donc, qu'une variation protectrice devrait entraîner le contraire, soit une diminution de l'activité de l'aromatase. Quant au SNP au

sein du gène *ESR1*, soit le rs1062577, qui est situé dans le 3'UTR du gène, des analyses bio-informatiques suggèrent qu'il affecte la liaison d'un microARN (miR-186) (Li, Dong, et al. 2010), ce qui pourrait altérer l'expression de l'ER α . On peut donc penser que toute variation génétique entraînant une diminution de l'activation de l'ER α par l'E₂ aura un effet protecteur vis-à-vis la progression, contrairement à un SNP causant une stimulation de cette activation, et qui augmentera l'agressivité de la maladie.

Contrairement aux SNP décrits dans les paragraphes précédents, l'effet d'une délétion génique est sans équivoque : il y a tout simplement une absence totale de transcrit et de la protéine correspondante. Ainsi, dans le cas de la délétion *UGT2B17*, on peut s'attendre à une diminution de son activité de glucuronidation chez l'humain. D'ailleurs, il a été rapporté que chez les hommes porteurs d'une délétion, on retrouve une diminution de 45% des niveaux intra-prostatiques de 3 α -diol-17G (Olsson et al. 2011). De plus, les niveaux urinaires des dérivés glucuronides de la testostérone et de la DHT sont diminués de plus de 90% et de 40%, respectivement, chez les hommes porteurs de deux délétions *UGT2B17* en comparaison des hommes sans délétion (Jakobsson et al. 2006; Swanson et al. 2007). Swanson et coll. ont démontré que les porteurs de deux délétions *UGT2B17* avaient des niveaux significativement plus bas de 20% de 3 α -diol-17G circulant comparativement aux hommes avec une ou aucune délétion, et aucune différence entre les niveaux circulants de testostérone, de DHT, d'ADT-G ou de 3 α -diol-3G, chez deux cohortes d'hommes sains (Swanson et al. 2007). Il est intéressant de voir que ces effets sont aussi détectables chez les patients atteints d'un cancer de la prostate, chez lesquels les niveaux circulants d'ADT augmentent de 25-40% alors que ceux du 3 α -diol-17G diminuent de 40% chez les porteurs de 2 délétions et plus *UGT2B* (Chapitre VI). Ces résultats semblent donc indiquer que la délétion du gène *UGT2B17* entraîne une diminution de l'inactivation et de l'élimination de la DHT, et donc probablement une augmentation des niveaux intra-tumoraux de DHT. Quant à l'*UGT2B28*, la caractérisation des paramètres enzymatiques en regard des substrats androgéniques et œstrogéniques reste à définir. La présence de délétions *UGT2B* augmente probablement la DHT intra-tumorale et la prolifération cellulaire, ce qui expliquerait son association avec un risque accru de récurrence

biochimique. Enfin, on ne peut exclure la possibilité que ce ne soit pas les délétions d'UGT2B qui soient directement responsables du phénotype observé, mais bien la conséquence d'un polymorphisme qui leur soit génétiquement lié. Par exemple, la délétion du gène *UGT2B28* est liée à l'allèle Y de la variation D⁸⁵Y du gène *UGT2B15*, aussi exprimé dans la prostate, avec un D' de 68 (Menard et al. 2009). L'enzyme encodée par l'allèle Y a été décrite comme utilisant plus activement les androgènes comme substrats que l'enzyme (allèle) de référence (Lévesque et al. 1997; Olsson et al. 2011), et moins active que cette dernière vis-à-vis des substrats exogènes (Court et al. 2004; Hanioka et al. 2011). Ces résultats suggèrent que des polymorphismes liés aux délétions des UGT2B peuvent affecter l'activité de certaines enzymes encodées au même locus et donc avoir un lien de causalité avec les phénotypes étudiés. Toutefois, étant donné le rôle déjà bien connu de l'UGT2B17 dans le catabolisme des androgènes, il est probable que sa délétion ait un effet direct sur l'exposition hormonale des cellules tumorales.

On ne peut exclure la possibilité que l'effet des polymorphismes identifiés dans le cadre des Chapitres V à VIII n'ait pas de lien direct avec la stéroïdogénèse. En effet, certains des polymorphismes touchant les gènes de la stéroïdogénèse pourraient affecter d'autres voies que celle de la stéroïdogénèse. Ainsi, le promoteur du gène *NSUN2* est situé sur le brin complémentaire du promoteur du gène *SRD5A1*. Par conséquent, un polymorphisme du promoteur de *SRD5A1* pourrait tout aussi bien affecter l'expression de *NSUN2*. En effet, on a démontré chez le rat que le promoteur de *SRD5A1* est bidirectionnel, avec une activité transcriptionnelle plus élevée dans l'orientation de *NSUN2* (Blanchard et al. 2007), ce qui reste à confirmer chez l'humain. Ce gène encode la méthyltransférase MISU et son expression est induite suite à l'activation de c-myc (Frye et al. 2006), un oncogène associé à plusieurs types de cancer, dont celui de la prostate. Ce gène pourrait donc très bien être affecté par le rs518673 et modifier le risque de récurrence biochimique. De plus, l'activité de certaines des enzymes de la stéroïdogénèse affecte des substrats appartenant à d'autres voies de synthèse et de métabolisme que celles qui sont associées aux hormones stéroïdiennes. Par exemple, on a démontré à l'aide de souris transgéniques que la 17 β -HSD de type 2 est impliquée non seulement dans le métabolisme

des hormones stéroïdiennes sexuelles, mais également dans celui de l'acide rétinoïque (Zhongyi et al. 2007; Shen et al. 2009). Il n'est donc pas exclu que son association avec la récurrence soit due à un rôle autre que celui qu'elle joue dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. Toutefois, le fait que la castration chimique, l'inactivation de l'AR et l'inactivation de la production de DHT et des précurseurs surrénaliens soient maintenant des pierres angulaires dans la prévention et le traitement du cancer de la prostate est la démonstration que la stéroïdogénèse est essentielle à l'évolution de cette maladie. Par conséquent, il est probable que la majorité des polymorphismes identifiés dans les Chapitres V à VIII soient associés à l'évolution du cancer de la prostate de par leur effet direct sur la stéroïdogénèse.

9.2.3 La génétique du patient, celle de la tumeur et la progression du cancer

Tous les cancers sont caractérisés par des défauts génétiques, que ce soit d'importantes translocations, qui entraînent le gain ou la perte de sections importantes de chromosomes ou, tout simplement, des substitutions nucléotidiques d'une ou de quelques paires de bases (Cahill et al. 1999; Vogelstein et al. 2004). En fait, certains auteurs qualifient même les cancers en général de maladies « génétiques », en ce sens que c'est l'accumulation d'altérations génétiques successives qui entraîne les cellules, initialement saines, sur le sentier de la maladie (Vogelstein et al. 2004). Non seulement plusieurs mutations et/ou altérations génomiques (épigénétiques ou autres) doivent survenir dans ce processus de transformation maligne, mais l'ordre dans lequel ces mutations-clés surviennent est somme toute assez strict, ce qui a été déjà décrit depuis près de 20 ans (Vogelstein et al. 1993).

Une telle séquence de mutations *de novo* conduisant à la transformation tumorale a été observée dans le contexte du cancer de la prostate (**Figure 19**) (Shen et al. 2010). En effet, le génome tumoral de la prostate est caractérisé par de nombreuses modifications, avec en moyenne près de 4000 substitutions nucléotidiques, dont une vingtaine sont des mutations non-synonymes, et une médiane de 90 réarrangements chromosomiaux par tumeur (Berger et al. 2011). L'altération du gène *NKX3.1* est l'un des premiers événements

nécessaires à la transformation maligne, puisque la perte d'hétérozygotie à ce locus est détectable chez près de 85% des *prostatic intraepithelial neoplasia* (PIN), précurseurs des tumeurs de la prostate (Bostwick et al. 1998; Shen et al. 2010). Un réarrangement chromosomal qui entraîne la fusion du promoteur androgéno-sensible *TMPRSS2* avec un membre de la famille de facteurs de transcription *ETS*, généralement *ERG* (Berger et al. 2011), est présent chez seulement 15% des PIN, mais chez jusqu'à 70% des cancers cliniquement localisés (Mehra et al. 2007; Clark et al. 2008; Mosquera et al. 2008; Albadine et al. 2009). Ces observations indiquent que cet événement survient après l'initiation tumorale, mais avant la progression vers un stade avancé de la maladie. À un stade métastatique, la délétions de certains gènes inhibant la voie PI3K/Akt, dont *PTEN*, a été observée chez 100% des métastases, mais chez seulement 42% des tumeurs primaires, ce qui suggère que la perte de copie de *PTEN* est un événement associé à la progression et à l'agressivité du cancer de la prostate (Taylor et al. 2010). Ainsi, au fur et à mesure que la tumeur se développe, le génome tumoral évolue.

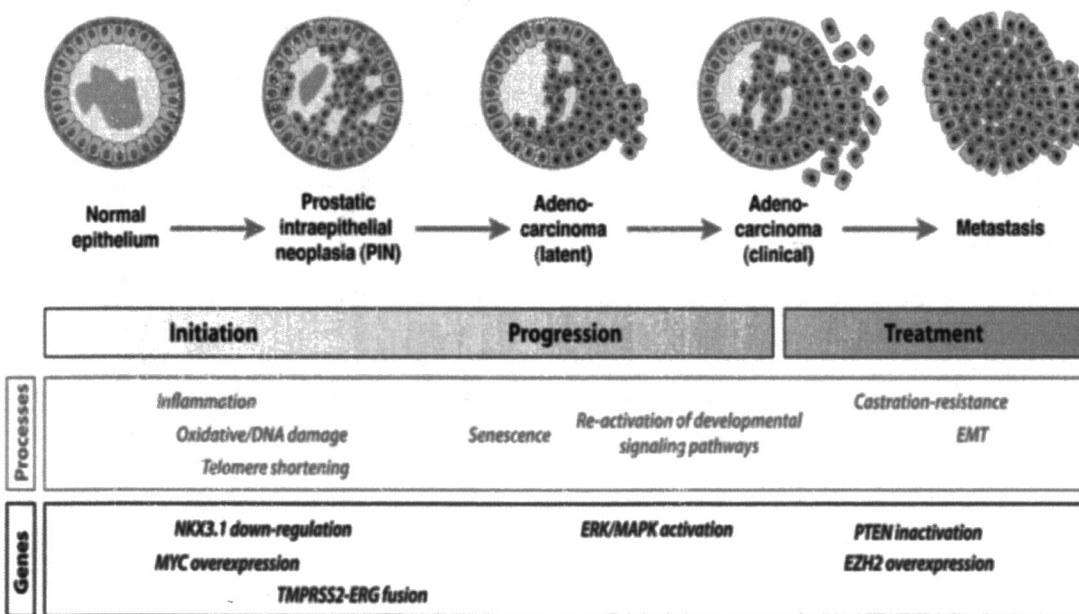


Figure 19. Étapes du développement du cancer de la prostate chez l'humain. Les stades de développement de la tumeur sont illustrés dans la section supérieure de la figure, tandis qu'en dessous sont illustrés les processus impliqués (rouge) ainsi que les altérations génétiques correspondantes (bleu). Tiré de Shen et Shen, 2010.

Au fil des associations génétiques décrites tout au long de ma thèse, il semble évident que les variations génétiques du patient influencent le développement de la tumeur, peut-être dans un ordre somme toute assez strict. En effet, tout comme certaines mutations *de novo* surviennent tôt dans le processus tumoral, certains polymorphismes génétiques sont associés principalement à la susceptibilité au cancer de la prostate (*8q24*, *RNASEL*, *ELAC2*, etc.). Une fois dépassé ce stade, l'effet de ces variations génétiques s'atténue, et même disparaît, et l'effet d'autres polymorphismes devient prépondérant. Ainsi, les polymorphismes du locus *8q24*, situés près de l'oncogène *MYC*, influencent les phases initiales de la maladie, lorsque la surexpression de c-myc est observée (Shen et al. 2010). La délétion de l'*UGT2B17* a aussi été associée à la susceptibilité au cancer de la prostate (Park et al. 2006; Park et al. 2007; Karypidis et al. 2008; Cai, Huang, et al. 2011). Toutefois, l'effet de cette délétion influence aussi le risque de récurrence après prostatectomie radicale (Chapitre VI), ce qui démontre peut-être qu'elle aurait un effet plus persistant dans l'évolution tumorale que des polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate comme ceux du locus *8q24*. Comme pour les délétions *UGT2B*, les polymorphismes *SRD5A*, dont certains sont associés à l'agressivité tumorale, influencent aussi la récurrence biochimique après prostatectomie radicale. On peut donc penser que la régulation fine des niveaux de DHT par les *SRD5A* et les *UGT2B* devient particulièrement critique à ce stade du cancer de la prostate, lorsque la tumeur est confinée à la prostate, ou au début du processus métastatique.

Les polymorphismes des gènes *HSD17B2* et *HSD17B3* sont associés à plusieurs étapes du cancer de la prostate, notamment la récurrence biochimique et la progression clinique suivant une prostatectomie radicale, ainsi que la survie des patients suite à un traitement à la TPA. *HSD17B2* est l'un des rares gènes où il y a présence de variations héréditaires affectant l'évolution du cancer ainsi que la présence de mutations tumorales *de novo* associées au développement du cancer de la prostate. Cloné il y a près de 20 ans (Wu et al. 1993) et situé au locus 16q24, ce gène est l'un des loci où on retrouve le plus fréquemment une perte d'hétérozygotie (ou *loss of heterozygosity*, LOH) dans le cancer de la prostate (Harkonen et al. 2005; Topping et al. 2007). On retrouve cette LOH avec une

fréquence plus élevée chez les tumeurs agressives ou métastatiques que chez les tumeurs moins agressives (Elo et al. 1997; Elo et al. 1999; Locke et al. 2011). La LOH est généralement associée à la perte de diversité génétique et à l'inactivation de gène(s) suppresseur(s) de tumeur. Chez un modèle *in vitro* de progression du cancer de la prostate, la progression est associée à une diminution de l'expression de l'ARNm du gène *HSD17B2* (Harkonen et al. 2003). L'expression de la 17 β -HSD de type 2 semble donc protéger du développement tumoral, et une perte de son activité semble nécessaire à la progression de la maladie. Il a même été démontré que l'hyperméthylation (inactivation) et la délétion du gène *HSD17B2* sont des événements fréquents dans le processus d'évolution vers le stade CRPC (Friedlander et al. 2011; Locke et al. 2011). L'activité des 17 β -HSD, particulièrement celle de la 17 β -HSD de type 2, semble critique après la transformation maligne et probablement durant la transformation tumorale vers un phénotype métastatique.

L'association des polymorphismes de gènes de la stéroïdogénèse à une récurrence biochimique et à la progression du cancer de la prostate, et non pas à la susceptibilité à celui-ci, s'explique peut-être par le rôle joué par les androgènes et les œstrogènes. En effet, les premières étapes de la transformation maligne semblent impliquer l'altération de gènes qui ne sont pas associés à la synthèse et au métabolisme des hormones stéroïdiennes, comme *NKX3.1* et *MYC*. Ainsi, les androgènes ne sont peut-être pas limitants lors des étapes initiales de la transformation maligne. L'absence de relation entre le cancer de la prostate et les niveaux d'androgènes circulants appuie d'ailleurs cette hypothèse. Toutefois, après un traitement comme la prostatectomie radicale, la croissance des cellules tumorales semble principalement basée sur la voie de l'AR, puisque la castration chimique permet de ralentir ou même de bloquer, temporairement, la maladie. Même après développement d'une résistance à la castration, les cellules tumorales restent sensibles aux agents ciblant la voie des hormones stéroïdiennes, comme l'acétate d'abiratérone ou le MDV3100, un antagoniste de l'AR de 2^e génération. Dans ce dernier contexte, il est possible que la variable génétique touchant à la stéroïdogénèse prenne plus d'importance dans l'évolution du cancer. En effet, puisque suivant la transformation maligne jusqu'au

CRPC les cellules tumorales sont dépendantes des androgènes, une variation génétique entraînant une modification de l'exposition hormonale pourrait influencer la prolifération et la survie de ces cellules.

9.2.4 Validité des polymorphismes génétiques en clinique

Plusieurs marqueurs génétiques pronostiques de la récurrence ou de la progression du cancer de la prostate ont été identifiés dans le cadre des travaux présentés aux Chapitres V à VIII et d'autres groupes de recherche ont aussi identifié de tels marqueurs parmi les gènes de la stéroïdogénèse, ainsi que d'autres gènes (Shibata et al. 2002; Lindstrom et al. 2007; Huang et al. 2009; Cheng et al. 2010; Gallagher et al. 2010; Huang et al. 2010; Ahn et al. 2011; Huang et al. 2011; Lin et al. 2011; Pomerantz et al. 2011). L'identification d'un marqueur génétique dans une population n'est pas une fin en soi, et plusieurs étapes sont en effet requises pour vérifier sa validité clinique et pour l'amener à une utilisation clinique efficace et simple. En fait, l'utilisation en pratique clinique du marqueur rs523349 (V⁸⁹L) de *SRD5A2* a été proposée dès le début des années 2000, mais, tel que décrit par Shibata et coll. : « *Lack of consistency between studies must be resolved before clinical utility of this marker [rs523349] is established.* » (Shibata et al. 2002). La transformation des découvertes scientifiques en outil concret pour la pratique clinique représente un défi majeur. Jusqu'à présent, il y a eu plus de 19 000 études sur des biomarqueurs potentiels du cancer de la prostate, alors que moins d'une demi-douzaine sont utilisés en pratique, notamment le PSA et le comptage des CTC (de Bono et al. 2008; Aly et al. 2011). Récemment, la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine a approuvé le test PROGENSA[®] PCA3, qui quantifie l'expression du gène *PCA3* dans l'urine, pour aider à déterminer si un patient a besoin de biopsies supplémentaires après une première biopsie négative (DiagnoCure 2012). Toutefois, il est important de souligner qu'aucun marqueur génétique n'est encore disponible en clinique afin de déterminer le risque de récurrence biochimique ou de progression du cancer de la prostate.

Parmi les étapes nécessaires à la validation des biomarqueurs, la réplication de notre étude à l'aide de diverses populations indépendantes et d'origine ethnique variée en constitue une première étape. Si nos conclusions sont confirmées, l'optimisation des

modèles de prédiction serait la seconde étape requise en vue de développer l'utilisation des marqueurs génétiques identifiés en pratique clinique. Une méthode simple et efficace serait l'utilisation d'un modèle prédictif, tel un nomogramme. Après la description du premier nomogramme visant à déterminer le risque de récurrence biochimique du cancer de la prostate après une prostatectomie radicale (Kattan et al. 1998), quelques équipes de recherche ont essayé d'incorporer des polymorphismes génétiques et l'expression génique dans des modèles de prédiction du cancer de la prostate et de sa récurrence (Nam et al. 2009; Talantov et al. 2010). Cependant, ces études exploratoires n'ont pas été validées chez des cohortes indépendantes, ce qui constitue une étape nécessaire pour démontrer l'utilité clinique d'un tel outil (Iasonos et al. 2008). Les différentes cohortes utilisées dans les travaux présentés dans cette thèse ne représentent pas des cohortes de validation indépendante. Toutefois, puisque certains marqueurs génétiques sont associés à l'évolution du cancer de la prostate chez plusieurs de ces cohortes, qui sont d'origines caucasienne ou asiatique, les polymorphismes qui ont été identifiés semblent avoir une validité clinique. Malgré tout, leur validation chez une cohorte indépendante et similaire à l'une des cohortes qui ont été étudiées est indispensable.

Pour établir le meilleur modèle de prédiction, il serait avantageux d'utiliser le maximum d'informations génétiques, donc d'inclure une combinaison de plusieurs polymorphismes, comme l'ont fait Nam et coll. qui ont développé un modèle de prédiction du cancer de la prostate à la biopsie en incluant le génotype de 4 SNP (Nam et al. 2009). En effet, ceci permettrait d'étudier des voies enzymatiques ou transcriptionnelles chez lesquelles plusieurs polymorphismes peuvent entraîner soit le même effet, soit des effets contraires. Ces effets peuvent être dominants, additifs ou synergiques et la combinaison de différents marqueurs pourrait établir un risque de récurrence ou de progression plus juste et plus précis. On peut penser qu'un polymorphisme qui entraîne une augmentation de la synthèse de la DHT sera contrebalancé par un autre qui va augmenter sa dégradation, et vice-versa. Ainsi, les polymorphismes protecteurs des gènes SRD5A ont un effet moins prononcé en absence de délétion d'UGT2B, tandis que l'absence de SNP protecteur en combinaison avec des délétions UGT2B augmente de façon dramatique le risque de

récidive biochimique (**Figure 20**). Dans ce dernier exemple, il y a accentuation de l'impact sur le risque de récidive biochimique chez les Caucasiens porteurs de délétions UGT2B et n'ayant aucun allèle protecteur pour les gènes SRD5A (rs518673 et rs12470143). De plus, certains polymorphismes peuvent n'être effectifs que lorsqu'un autre polymorphisme affectant un autre gène est absent ou, au contraire, est présent (*gene-gene interaction*). Aussi, une voie enzymatique particulière peut ne nécessiter qu'un polymorphisme dans un seul gène de cette voie, même si on est en présence de variations affectant deux gènes impliqués dans le même processus, ce que l'on observe avec les mutations *de novo* dans le cancer de la prostate (Taylor et al. 2010). Par conséquent, différentes combinaisons des variations génétiques présentées dans les Chapitres V à VIII devront être testées afin de développer le meilleur modèle de prédiction de récidive et/ou de progression du cancer de la prostate.

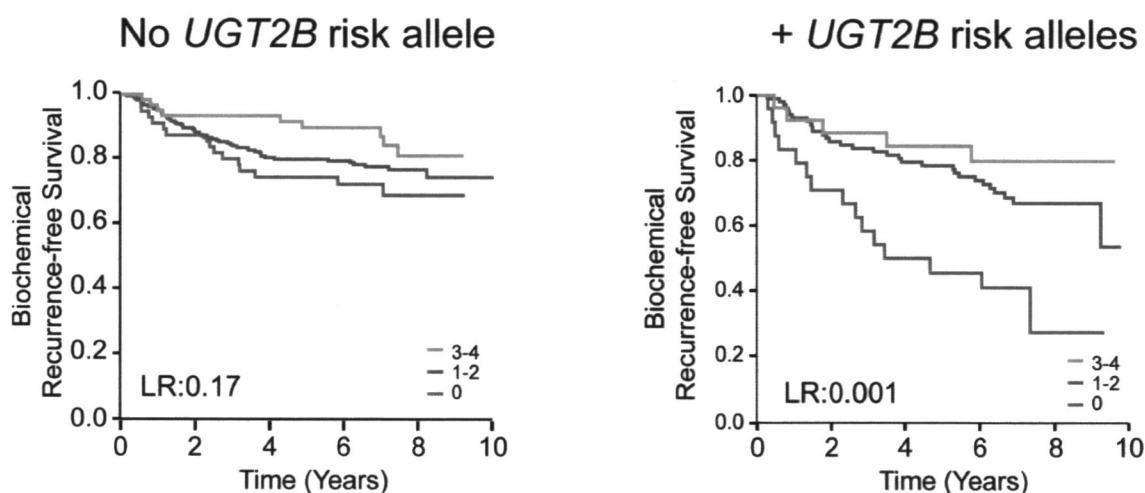


Figure 20. Cooccurrence des variations génétiques SRD5A et UGT2B et risque de récidive biochimique. L'effet combiné des allèles protecteurs rs518673T de *SRD5A1* et rs12470143A de *SRD5A2* est plus prononcé chez les patients porteurs de ≥ 2 délétions UGT2B. Ces résultats ont été obtenus chez la population de 526 Caucasiens traités par prostatectomie radicale. LR : valeur de p du test de log-rank; BCR : récidive biochimique.

Finalement, afin d'obtenir les meilleurs outils pronostiques, il serait pertinent d'inclure non seulement l'information génétique du patient, mais aussi celle concernant les mutations tumorales *de novo*. Par exemple, les polymorphismes du gène *PTEN* n'influencent pas la susceptibilité au cancer de la prostate (Xie et al. 2011), mais ce gène est parmi ceux qui sont le plus fréquemment altérés dans le génome tumoral (Sircar et al. 2009; Taylor et al. 2010; Berger et al. 2011). Inclure le statut génique tumoral de certains loci-clés impliqués dans l'évolution du cancer permettrait de maximiser la sensibilité et la spécificité des modèles prédictifs. Pareillement, si la tumeur acquiert des altérations génétiques au sein du gène *HSD17B2*, il est possible que les variations génétiques touchant ce gène n'aient plus d'impact ou, à l'inverse, aient un impact plus grand sur la récurrence et la progression de la maladie. L'inclusion de ces deux types d'informations génétiques, i.e. les variations génétiques du patient (hôte) et celles acquises *de novo* par la tumeur (parasite), se révèle d'autant plus importante que la tumeur primaire elle-même produit des facteurs et hormones qui vont influencer la progression des métastases (McAllister et al. 2010).

9.3 Les hormones stéroïdiennes : du diagnostic à la mort

En conclusion, dans le cadre des travaux présentés dans le cadre de cette thèse, il apparaît évident que les hormones stéroïdiennes sont essentielles à toutes les étapes des cancers hormonodépendants, du foyer tumoral initial (diagnostic) à l'évolution vers une tumeur agressive puis à la progression de la maladie suite à divers traitements et ce, tant chez la femme que chez l'homme. Il semble clair que les œstrogènes et les androgènes ont un rôle à jouer dans le développement et dans l'évolution de ces cancers. En plus de leur synthèse, leur métabolisme est également finement contrôlé dans le tissu sain, et devient désordonné dans les tumeurs, ce qui pourrait refléter une adaptation du métabolisme hormonal aux besoins des cellules tumorales.

Dans le cancer de l'endomètre, les œstrogènes sont ainsi associés aux phases initiales de la maladie. En effet, des niveaux élevés d'œstrogènes circulants prédisposent à ce cancer, et leur production est exacerbée chez les femmes qui en sont atteintes. En fait, la relation entre les œstrogènes et la tumeur est illustrée par l'association entre leurs niveaux

circulants et les caractéristiques clinico-pathologiques. Dans la tumeur, l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse est altérée, entraînant probablement une augmentation de la synthèse d'E₂ et une augmentation de l'inactivation du 2-MeOE₂ protecteur. L'étude approfondie des hormones stéroïdiennes pourrait permettre la mise en place de biomarqueurs indicateurs de l'agressivité tumorale, comme le CA 125, en se basant sur les niveaux circulants ou urinaires de certains stéroïdes. Par exemple, les travaux de Stener-Victorin et coll. ont démontré qu'en se basant sur les niveaux circulants de l'E₁ et de la testostérone, il était possible d'établir une limite pouvant séparer les femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques des femmes saines, avec une sensibilité et une spécificité variant entre 84 et 94% (Stener-Victorin et al. 2010). Des méthodes similaires pourraient très bien s'appliquer également au cancer de l'endomètre, au cancer du sein, et même au risque de récurrence de ces cancers. Nos travaux suggèrent aussi un rôle de la voie œstrogénique dans la récurrence du cancer de l'endomètre, ce qui renforce la pertinence d'essais cliniques des inhibiteurs de la sulfatase.

Dans le cadre du cancer de la prostate, l'existence de plusieurs polymorphismes de susceptibilité au cancer de la prostate avait déjà été démontrée. Toutefois, nos travaux démontrent que le bagage génétique du patient influence ce cancer à toutes les étapes de son évolution après un ou plusieurs traitements (chirurgical ou pharmacologique), et qu'il influence de plus les niveaux d'hormones circulantes. Enfin, il reste aussi à voir comment ces variations génétiques influenceront la réponse aux nouvelles molécules disponibles pour la prévention et/ou le traitement du cancer de la prostate. Ainsi, comment le SNP rs6162 du gène *CYP17A1* influence-t-il la réponse à l'acétate d'abiratéron, ou encore, comment les SNP situés au sein des gènes *SRD5A1* et *SRD5A2* influencent-ils la réponse au finastéride et au dutastéride? Finalement, même si la validation de ces variations génétiques doit être effectuée chez de nouvelles cohortes, on peut déjà songer à leur inclusion dans des outils pronostiques en vue de leur utilisation en clinique.

En conclusion, les hormones stéroïdiennes ont, de par leur rôle intrinsèque dans la biologie humaine, une part active à jouer dans le processus des cancers de l'endomètre et de la prostate. De par nos découvertes, il apparaît évident que de cette dépendance hormonale, nous pourrions tirer des informations vitales au développement d'une médecine personnalisée, en prenant en compte l'information génétique (i.e. hérédité) du patient, et peut-être aussi le profil hormonal circulant. Une telle approche devrait être en meilleure mesure de définir chaque cas de cancer afin d'adopter la stratégie thérapeutique la plus adéquate.

Bibliographie

- Aban, M., M. Arslan, E. Tok, S. Tekes, T. Budak and A. Altintas (2006). "CYP17 genetic polymorphism in patients with endometrial hyperplasia and cancer." Int J Gynecol Cancer **16 Suppl 1**: 448-451.
- Abraham, G. E. and G. B. Maroulis (1975). "Effect of exogenous estrogen on serum pregnenolone, cortisol, and androgens in postmenopausal women." Obstet Gynecol **45(3)**: 271-274.
- Adlercreutz, H. and T. Luukkainen (1970). "Identification and determination of oestrogens in various biological materials in pregnancy." Ann Clin Res **2(4)**: 365-380.
- Ahn, J., A. S. Kibel, J. Y. Park, T. R. Rebbeck, H. Rennert, J. L. Stanford, E. A. Ostrander, S. Chanock, M. H. Wang, R. D. Mittal, W. B. Isaacs, E. A. Platz and R. B. Hayes (2011). "Prostate Cancer Predisposition Loci and Risk of Metastatic Disease and Prostate Cancer Recurrence." Clin Cancer Res **17(5)**: 1075-1081.
- Aihara, M., T. M. Wheeler, M. Ohori and P. T. Scardino (1994). "Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens." Urology **43(1)**: 60-66; discussion 66-67.
- AJCC Cancer Staging Manual (2010). Springer New York, Inc.
- Akhmedkhanov, A., A. Zeleniuch-Jacquotte and P. Toniolo (2001). "Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives." Ann N Y Acad Sci **943**: 296-315.
- Al Olama, A. A., Z. Kote-Jarai, G. G. Giles, M. Guy, J. Morrison, G. Severi, D. A. Leongamornlert, M. Tymrakiewicz, S. Jhavar, E. Saunders, J. L. Hopper, M. C. Southey, K. R. Muir, D. R. English, D. P. Dearnaley, A. T. Ardern-Jones, A. L. Hall, L. T. O'Brien, R. A. Wilkinson, E. Sawyer, A. Lophatananon, A. Horwich, R. A. Huddart, V. S. Khoo, C. C. Parker, C. J. Woodhouse, A. Thompson, T. Christmas, C. Ogden, C. Cooper, J. L. Donovan, F. C. Hamdy, D. E. Neal, R. A. Eeles and D. F. Easton (2009). "Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility." Nat Genet **41(10)**: 1058-1060.
- Albadine, R., M. Latour, A. Toubaji, M. Haffner, W. B. Isaacs, A. P. E, A. K. Meeker, A. M. Demarzo, J. I. Epstein and G. J. Netto (2009). "TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma." Mod Pathol **22(11)**: 1415-1422.
- Albert, C., M. Vallee, G. Beaudry, A. Belanger and D. W. Hum (1999). "The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes." Endocrinology. **140(7)**: 3292-3302.
- Alberti, C. (2010). "Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features." Eur Rev Med Pharmacol Sci **14(1)**: 31-41.
- Ali, A., B. Furusato, P. O. Ts'o, Z. P. Lum, S. Elsamanoudi, A. Mohamed, S. Srivastava, J. W. Moul, S. A. Brassell, I. A. Sesterhenn and D. G. McLeod (2010). "Assessment of circulating tumor cells (CTCs) in prostate cancer patients with low-volume tumors." Pathol Int **60(10)**: 667-672.

- Allen, N. E., M. S. Forrest and T. J. Key (2001). "The association between polymorphisms in the CYP17 and 5alpha-reductase (SRD5A2) genes and serum androgen concentrations in men." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(3): 185-189.
- Allen, N. E., T. J. Key, L. Dossus, S. Rinaldi, A. Cust, A. Lukanova, P. H. Peeters, N. C. Onland-Moret, P. H. Lahmann, F. Berrino, S. Panico, N. Larranaga, G. Pera, M. J. Tormo, M. J. Sanchez, J. Ramon Quiros, E. Ardanaz, A. Tjonneland, A. Olsen, J. Chang-Claude, J. Linseisen, M. Schulz, H. Boeing, E. Lundin, D. Palli, K. Overvad, F. Clavel-Chapelon, M. C. Boutron-Ruault, S. Bingham, K. T. Khaw, H. Bas Bueno-de-Mesquita, A. Trichopoulou, D. Trichopoulos, A. Naska, R. Tumino, E. Riboli and R. Kaaks (2008). "Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." *Endocr Relat Cancer* **15**(2): 485-497.
- Allen, N. E., K. K. Tsilidis, T. J. Key, L. Dossus, R. Kaaks, E. Lund, K. Bakken, O. Gavrilyuk, K. Overvad, A. Tjonneland, A. Olsen, A. Fournier, A. Fabre, F. Clavel-Chapelon, N. Chabbert-Buffet, C. Sacerdote, V. Krogh, B. Bendinelli, R. Tumino, S. Panico, M. Bergmann, M. Schuetze, F. J. van Duijnhoven, H. B. Bueno-de-Mesquita, N. C. Onland-Moret, C. H. van Gils, P. Amiano, A. Barricarte, M. D. Chirlaque, M. E. Molina-Montes, M. L. Redondo, E. J. Duell, K. T. Khaw, N. Wareham, S. Rinaldi, V. Fedirko, T. Mouw, D. S. Michaud and E. Riboli (2010). "Menopausal hormone therapy and risk of endometrial carcinoma among postmenopausal women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition." *Am J Epidemiol* **172**(12): 1394-1403.
- Aly, M., F. Wiklund and H. Gronberg (2011). "Early detection of prostate cancer with emphasis on genetic markers." *Acta Oncol* **50 Suppl 1**: 18-23.
- Amling, C. L., E. J. Bergstralh, M. L. Blute, J. M. Slezak and H. Zincke (2001). "Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point?" *J Urol* **165**(4): 1146-1151.
- Amundadottir, L. T., P. Sulem, J. Gudmundsson, A. Helgason, A. Baker, B. A. Agnarsson, A. Sigurdsson, K. R. Benediktsdottir, J. B. Cazier, J. Sainz, M. Jakobsdottir, J. Kostic, D. N. Magnusdottir, S. Ghosh, K. Agnarsson, B. Birgisdottir, L. Le Roux, A. Olafsdottir, T. Blondal, M. Andresdottir, O. S. Gretarsdottir, J. T. Bergthorsson, D. Gudbjartsson, A. Gylfason, G. Thorleifsson, A. Manolescu, K. Kristjansson, G. Geirsson, H. Isaksson, J. Douglas, J. E. Johansson, K. Balter, F. Wiklund, J. E. Montie, X. Yu, B. K. Suarez, C. Ober, K. A. Cooney, H. Gronberg, W. J. Catalona, G. V. Einarsson, R. B. Barkardottir, J. R. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdottir and K. Stefansson (2006). "A common variant associated with prostate cancer in European and African populations." *Nat Genet* **38**(6): 652-658.
- Andersson, S. and D. W. Russell (1990). "Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(10): 3640-3644.
- Andriole, G. L., D. G. Bostwick, O. W. Brawley, L. G. Gomella, M. Marberger, F. Montorsi, C. A. Pettaway, T. L. Tammela, C. Teloken, D. J. Tindall, M. C. Somerville, T. H. Wilson, I. L. Fowler and R. S. Rittmaster (2010). "Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer." *N Engl J Med* **362**(13): 1192-1202.

- Ashton, K. A., A. Proietto, G. Otton, I. Symonds, M. McEvoy, J. Attia, M. Gilbert, U. Hamann and R. J. Scott (2010). "Polymorphisms in genes of the steroid hormone biosynthesis and metabolism pathways and endometrial cancer risk." Cancer Epidemiol **34**(3): 328-337.
- Askew, E. B., R. T. Gampe, Jr., T. B. Stanley, J. L. Faggart and E. M. Wilson (2007). "Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone." J Biol Chem **282**(35): 25801-25816.
- Attard, G., A. H. Reid, R. A'Hern, C. Parker, N. B. Oommen, E. Folkerd, C. Messiou, L. R. Molife, G. Maier, E. Thompson, D. Olmos, R. Sinha, G. Lee, M. Dowsett, S. B. Kaye, D. Dearnaley, T. Kheoh, A. Molina and J. S. de Bono (2009). "Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer." J Clin Oncol **27**(23): 3742-3748.
- Attard, G., J. Richards and J. S. de Bono (2011). "New strategies in metastatic prostate cancer: targeting the androgen receptor signaling pathway." Clin Cancer Res **17**(7): 1649-1657.
- Auchus, R. J. (2004). "The backdoor pathway to dihydrotestosterone." Trends Endocrinol Metab **15**(9): 432-438.
- Austin, H., J. M. Austin, Jr., E. E. Partridge, K. D. Hatch and H. M. Shingleton (1991). "Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution." Cancer Res **51**(2): 568-572.
- Baggett, B., R. I. Dorfman, L. L. Engel and K. Savard (1956). "The conversion of testosterone-3-C14 to C14-estradiol-17beta by human ovarian tissue." J Biol Chem **221**(2): 931-941.
- Baglietto, L., G. Severi, D. R. English, K. Krishnan, J. L. Hopper, C. McLean, H. A. Morris, W. D. Tilley and G. G. Giles (2012). "Circulating steroid hormone levels and risk of breast cancer for postmenopausal women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(2): 492-502.
- Bai, H. W., J. Y. Shim, J. Yu and B. T. Zhu (2007). "Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases." Chem Res Toxicol **20**(10): 1409-1425.
- Baron, S., M. Manin, C. Beaudoin, L. Leotoing, Y. Communal, G. Veysièrè and L. Morel (2004). "Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells." J Biol Chem **279**(15): 14579-14586.
- Barton, M. (2012). "Position paper: The membrane estrogen receptor GPER/GPR30: Clues and questions." Steroids.
- Beaulieu, M., E. Levesque, D. W. Hum and A. Belanger (1996). "Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids." J Biol Chem **271**(37): 22855-22862.
- Beaulieu, M., E. Levesque, A. Tchernof, B. G. Beatty, A. Belanger and D. W. Hum (1997). "Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme." DNA Cell Biol **16**(10): 1143-1154.

- Bélanger, A., M. Brochu and J. Cliche (1986). "Levels of plasma steroid glucuronides in intact and castrated men with prostatic cancer." J Clin Endocrinol Metab **62**(5): 812-815.
- Bélanger, A., B. Candas, A. Dupont, L. Cusan, P. Diamond, J. L. Gomez and F. Labrie (1994). "Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men." J Clin Endocrinol Metab **79**(4): 1086-1090.
- Bélanger, A., G. Pelletier, F. Labrie, O. Barbier and S. Chouinard (2003). "Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans." Trends Endocrinol Metab. **14**(10): 473-479.
- Bélanger, B., A. Belanger, F. Labrie, A. Dupont, L. Cusan and G. Monfette (1989). "Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men." J Steroid Biochem **32**(5): 695-698.
- Berg, F. D. and E. Kuss (1992). "Serum concentration and urinary excretion of "classical" estrogens, catecholestrogens and 2-methoxyestrogens in normal human pregnancy." Arch Gynecol Obstet **251**(1): 17-27.
- Berger, M. F., M. S. Lawrence, F. Demichelis, Y. Drier, K. Cibulskis, A. Y. Sivachenko, A. Sboner, R. Esgueva, D. Pflueger, C. Sougnez, R. Onofrio, S. L. Carter, K. Park, L. Habegger, L. Ambrogio, T. Fennell, M. Parkin, G. Saksena, D. Voet, A. H. Ramos, T. J. Pugh, J. Wilkinson, S. Fisher, W. Winckler, S. Mahan, K. Ardlie, J. Baldwin, J. W. Simons, N. Kitabayashi, T. Y. MacDonald, P. W. Kantoff, L. Chin, S. B. Gabriel, M. B. Gerstein, T. R. Golub, M. Meyerson, A. Tewari, E. S. Lander, G. Getz, M. A. Rubin and L. A. Garraway (2011). "The genomic complexity of primary human prostate cancer." Nature **470**(7333): 214-220.
- Bergstrom, A., P. Pisani, V. Tenet, A. Wolk and H. O. Adami (2001). "Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe." Int J Cancer **91**(3): 421-430.
- Berstein, L., T. Zimarina, E. Imyanitov, A. Kovalevskij, S. Maximov, P. Pujol and J. Thijssen (2006). "Hormonal imbalance in two types of endometrial cancer and genetic polymorphism of steroidogenic enzymes." Maturitas **54**(4): 352-355.
- Berstein, L., T. Zimarina, A. Kovalevskij, S. Maximov, O. Volkov and J. H. Thijssen (2005). "CYP19 gene expression and aromatase activity in endometrial cancer tissue: importance of the type of the disease." Neoplasma **52**(2): 115-118.
- Berstein, L. M., E. N. Imyanitov, A. J. Kovalevskij, S. J. Maximov, D. A. Vasilyev, K. G. Buslov, A. P. Sokolenko, A. G. Iyevleva, E. V. Chekmariova and J. H. Thijssen (2004). "CYP17 and CYP19 genetic polymorphisms in endometrial cancer: association with intratumoral aromatase activity." Cancer Lett **207**(2): 191-196.
- Berstein, L. M., E. N. Imyanitov, E. N. Suspitsin, M. Y. Grigoriev, E. P. Sokolov, A. Togo, K. P. Hanson, T. E. Poroshina, D. A. Vasiljev, A. Y. Kovalevskij and V. B. Gamajunova (2001). "CYP19 gene polymorphism in endometrial cancer patients." J Cancer Res Clin Oncol **127**(2): 135-138.
- Berstein, L. M., A. E. Tchernobrovkina, V. B. Gamajunova, A. J. Kovalevskij, D. A. Vasilyev, O. F. Chepik, E. A. Turkevitch, E. V. Tsyrlina, S. J. Maximov, L. A. Ashrafian and J. H. Thijssen (2003). "Tumor estrogen content and clinicomorphological and endocrine features of endometrial cancer." J Cancer Res Clin Oncol **129**(4): 245-249.

- Beuten, J., J. A. Gelfond, J. L. Franke, S. Shook, T. L. Johnson-Pais, I. M. Thompson and R. J. Leach (2010). "Single and Multivariate Associations of MSR1, ELAC2, and RNASEL with Prostate Cancer in an Ethnic Diverse Cohort of Men." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(2): 588-599.
- Bill-Axelsson, A., L. Holmberg, M. Ruutu, M. Haggman, S. O. Andersson, S. Bratell, A. Spangberg, C. Busch, S. Nordling, H. Garmo, J. Palmgren, H. O. Adami, B. J. Norlen and J. E. Johansson (2005). "Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer." N Engl J Med **352**(19): 1977-1984.
- Blanchard, Y., S. Seenundun and B. Robaire (2007). "The promoter of the rat 5alpha-reductase type 1 gene is bidirectional and Sp1-dependent." Mol Cell Endocrinol **264**(1-2): 171-183.
- Blouin, K., M. Nadeau, J. Mailloux, M. Daris, S. Lebel, V. Luu-The and A. Tchernof (2009). "Pathways of adipose tissue androgen metabolism in women: depot differences and modulation by adipogenesis." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(2): E244-255.
- Bogan, R. L., T. L. Davis and G. D. Niswender (2007). "Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." J Steroid Biochem Mol Biol **104**(1-2): 61-67.
- Boger-Megiddo, I., N. S. Weiss, M. J. Barnett, G. E. Goodman and C. Chen (2008). "V89L polymorphism of the 5alpha-reductase Type II gene (SRD5A2), endogenous sex hormones, and prostate cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(2): 286-291.
- Bokhman, J. V. (1983). "Two pathogenetic types of endometrial carcinoma." Gynecol Oncol **15**(1): 10-17.
- Bonkhoff, H. and R. Berges (2009). "The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer." Eur Urol **55**(3): 533-542.
- Bonkhoff, H., T. Fixemer, I. Hunsicker and K. Remberger (2001). "Progesterone receptor expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression." Prostate **48**(4): 285-291.
- Bonney, R. C., M. J. Scanlon, D. L. Jones, M. J. Reed, M. C. Anderson and V. H. James (1986). "The relationship between oestradiol metabolism and adrenal steroids in the endometrium of postmenopausal women with and without endometrial cancer." Eur J Cancer Clin Oncol **22**(8): 953-961.
- Boorjian, S. A., J. A. Eastham, M. Graefen, B. Guillonnet, R. J. Karnes, J. W. Moul, E. M. Schaeffer, C. Stief and K. C. Zorn (2012). "A Critical Analysis of the Long-Term Impact of Radical Prostatectomy on Cancer Control and Function Outcomes." Eur Urol.
- Boorjian, S. A., R. J. Karnes, L. J. Rangel, E. J. Bergstralh and M. L. Blute (2008). "Mayo Clinic validation of the D'amico risk group classification for predicting survival following radical prostatectomy." J Urol **179**(4): 1354-1360; discussion 1360-1351.
- Boruban, M. C., K. Altundag, G. S. Kilic and J. Blankstein (2008). "From endometrial hyperplasia to endometrial cancer: insight into the biology and possible medical preventive measures." Eur J Cancer Prev **17**(2): 133-138.

- Bosland, M. C., H. Ford and L. Horton (1995). "Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 beta or diethylstilbestrol." Carcinogenesis **16**(6): 1311-1317.
- Bosland, M. C. and A. M. Mahmoud (2011). "Hormones and prostate carcinogenesis: Androgens and estrogens." J Carcinog **10**: 33.
- Bostwick, D. G., A. Shan, J. Qian, M. Darson, N. J. Maihle, R. B. Jenkins and L. Cheng (1998). "Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma." Cancer **83**(9): 1995-2002.
- Bremond, A. G., B. Claustrat, R. C. Rudigoz, P. Seffert and J. Corniau (1982). "Estradiol, androstenedione, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate in the ovarian and peripheral blood of postmenopausal patients with and without endometrial cancer." Gynecol Oncol **14**(1): 119-124.
- Bukulmez, O., D. B. Hardy, B. R. Carr, R. J. Auchus, T. Toloubeydokhti, R. A. Word and C. R. Mendelson (2008). "Androstenedione up-regulation of endometrial aromatase expression via local conversion to estrogen: potential relevance to the pathogenesis of endometriosis." J Clin Endocrinol Metab **93**(9): 3471-3477.
- Bulun, S. E., Z. Lin, G. Imir, S. Amin, M. Demura, B. Yilmaz, R. Martin, H. Utsunomiya, S. Thung, B. Gurates, M. Tamura, D. Langoi and S. Deb (2005). "Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment." Pharmacol Rev **57**(3): 359-383.
- Buzdar, A. U. (2003). "Advances in endocrine treatments for postmenopausal women with metastatic and early breast cancer." Oncologist **8**(4): 335-341.
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, B. Vogelstein and C. Lengauer (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." Trends Cell Biol **9**(12): M57-60.
- Cai, C. and S. P. Balk (2011). "Intratumoral androgen biosynthesis in prostate cancer pathogenesis and response to therapy." Endocr Relat Cancer **18**(5): R175-182.
- Cai, C., S. Chen, P. Ng, G. J. Bubley, P. S. Nelson, E. A. Mostaghel, B. Marck, A. M. Matsumoto, N. I. Simon, H. Wang, S. Chen and S. P. Balk (2011). "Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors." Cancer Res **71**(20): 6503-6513.
- Cai, L., W. Huang and K. C. Chou (2011). "Prostate Cancer with Variants in CYP17 and UGT2B17 Genes: A Meta-Analysis." Protein Pept Lett.
- Caire, A. A., L. Sun, O. Ode, D. A. Stackhouse, K. Maloney, C. Donatucci, V. Mouraviev, T. J. Polascik, C. N. Robertson, D. M. Albala and J. W. Moul (2009). "Delayed prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy: how to identify and what are their clinical outcomes?" Urology **74**(3): 643-647.
- Cancel-Tassin, G. and O. Cussenot (2005). "Genetic susceptibility to prostate cancer." BJU Int **96**(9): 1380-1385.
- Carothers, A. M., S. A. Hughes, D. Ortega and M. M. Bertagnolli (2002). "2-Methoxyestradiol induces p53-associated apoptosis of colorectal cancer cells." Cancer Lett **187**(1-2): 77-86.
- Carpten, J., N. Nupponen, S. Isaacs, R. Sood, C. Robbins, J. Xu, M. Faruque, T. Moses, C. Ewing, E. Gillanders, P. Hu, P. Bujnovszky, I. Makalowska, A. Baffoe-Bonnie, D.

- Faith, J. Smith, D. Stephan, K. Wiley, M. Brownstein, D. Gildea, B. Kelly, R. Jenkins, G. Hostetter, M. Matikainen, J. Schleutker, K. Klinger, T. Connors, Y. Xiang, Z. Wang, A. De Marzo, N. Papadopoulos, O. P. Kallioniemi, R. Burk, D. Meyers, H. Gronberg, P. Meltzer, R. Silverman, J. Bailey-Wilson, P. Walsh, W. Isaacs and J. Trent (2002). "Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1." Nat Genet **30**(2): 181-184.
- Carter, B. S., G. S. Bova, T. H. Beaty, G. D. Steinberg, B. Childs, W. B. Isaacs and P. C. Walsh (1993). "Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features." J Urol **150**(3): 797-802.
- Casey, G., P. J. Neville, S. J. Plummer, Y. Xiang, L. M. Krumroy, E. A. Klein, W. J. Catalona, N. Nupponen, J. D. Carpten, J. M. Trent, R. H. Silverman and J. S. Witte (2002). "RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases." Nat Genet **32**(4): 581-583.
- Castro, E. and R. Eeles (2012). "The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer." Asian J Androl.
- Cauley, J. A., J. M. Zmuda, M. E. Danielson, B. M. Ljung, D. C. Bauer, S. R. Cummings and L. H. Kuller (2003). "Estrogen metabolites and the risk of breast cancer in older women." Epidemiology **14**(6): 740-744.
- Cavalieri, E., D. Chakravarti, J. Guttenplan, E. Hart, J. Ingle, R. Jankowiak, P. Muti, E. Rogan, J. Russo, R. Santen and T. Sutter (2006). "Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention." Biochim Biophys Acta **1766**(1): 63-78.
- Cavalieri, E., E. Rogan and D. Chakravarti (2004). "The role of endogenous catechol quinones in the initiation of cancer and neurodegenerative diseases." Methods Enzymol **382**: 293-319.
- Cavalieri, E. L. and E. G. Rogan (2011). "Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **125**(3-5): 169-180.
- Cavalieri, E. L., D. E. Stack, P. D. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S. L. Johansson, K. D. Patil, M. L. Gross, J. K. Gooden, R. Ramanathan, R. L. Cerny and E. G. Rogan (1997). "Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10937-10942.
- Chandrasena, R. E., P. D. Edirisinghe, J. L. Bolton and G. R. Thatcher (2008). "Problematic detoxification of estrogen quinones by NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferase." Chem Res Toxicol **21**(7): 1324-1329.
- Chang, K. H., R. Li, M. Papari-Zareei, L. Watumull, Y. D. Zhao, R. J. Auchus and N. Sharifi (2011). "Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13728-13733.
- Charn, T. H., E. T. Liu, E. C. Chang, Y. K. Lee, J. A. Katzenellenbogen and B. S. Katzenellenbogen (2010). "Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors alpha and beta: mutual restriction and competitive site selection." Mol Endocrinol **24**(1): 47-59.

- Chen, C., K. E. Malone, J. Prunty and J. R. Daling (1996). "Measurement of urinary estrogen metabolites using a monoclonal enzyme-linked immunoassay kit: assay performance and feasibility for epidemiological studies." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **5**(9): 727-732.
- Chen, H., K. Yang, S. Choi, J. H. Fischer and H. Jeong (2009). "Up-regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 by 17beta-estradiol: a potential mechanism of increased lamotrigine elimination in pregnancy." Drug Metab Dispos **37**(9): 1841-1847.
- Chen, Y. L., C. Y. Huang, T. Y. Chien, S. H. Huang, C. J. Wu and C. M. Ho (2011). "Value of pre-operative serum CA125 level for prediction of prognosis in patients with endometrial cancer." Aust N Z J Obstet Gynaecol **51**(5): 397-402.
- Chen, Z. H., H. K. Na, Y. J. Hurh and Y. J. Surh (2005). "4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF-kappaB and ERK/MAPK." Toxicol Appl Pharmacol **208**(1): 46-56.
- Cheng, I., S. J. Plummer, C. Neslund-Dudas, E. A. Klein, G. Casey, B. A. Rybicki and J. S. Witte (2010). "Prostate cancer susceptibility variants confer increased risk of disease progression." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(9): 2124-2132.
- Cheng, Z., A. Radominska-Pandya and T. R. Tephly (1999). "Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10." Drug Metab Dispos **27**(10): 1165-1170.
- Chetrite, G. S., J. Cortes-Prieto, J. C. Philippe, F. Wright and J. R. Pasqualini (2000). "Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues." J Steroid Biochem Mol Biol **72**(1-2): 23-27.
- Chou R, D. T., Bougatsos C, Fu R, Blazina I, Gleitsmann K, Ruggie JB (2011). Treatments for Localized Prostate Cancer: Systematic Review to Update the 2002 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. Rockville (MD), Oregon Evidence-based Practice Center.
- Chouinard, S., O. Barbier and A. Belanger (2007). "UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 enzymes are major determinants of the androgen response in prostate cancer LNCaP cells." J Biol Chem **282**(46): 33466-33474.
- Chouinard, S., M. F. Yueh, R. H. Tukey, F. Giton, J. Fiet, G. Pelletier, O. Barbier and A. Belanger (2008). "Inactivation by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: the end of androgen signaling." J Steroid Biochem Mol Biol **109**(3-5): 247-253.
- Chu, L. W., J. K. Reichardt and A. W. Hsing (2008). "Androgens and the molecular epidemiology of prostate cancer." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **15**(3): 261-270.
- Cicek, M. S., D. V. Conti, A. Curran, P. J. Neville, P. L. Paris, G. Casey and J. S. Witte (2004). "Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR." Prostate **59**(1): 69-76.
- Claessens, F., S. Denayer, N. Van Tilborgh, S. Kerckhofs, C. Helsen and A. Haelens (2008). "Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling." Nucl Recept Signal **6**: e008.

- Clark, J., G. Attard, S. Jhavar, P. Flohr, A. Reid, J. De-Bono, R. Eeles, P. Scardino, J. Cuzick, G. Fisher, M. D. Parker, C. S. Foster, D. Berney, G. Kovacs and C. S. Cooper (2008). "Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate." *Oncogene* **27**(14): 1993-2003.
- Coffman, B. L., C. D. King, G. R. Rios and T. R. Tephly (1998). "The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268)." *Drug Metab Dispos* **26**(1): 73-77.
- Cookson, M. S., G. Aus, A. L. Burnett, E. D. Canby-Hagino, A. V. D'Amico, R. R. Dmochowski, D. T. Eton, J. D. Forman, S. L. Goldenberg, J. Hernandez, C. S. Higano, S. R. Kraus, J. W. Moul, C. Tangen, J. B. Thrasher and I. Thompson (2007). "Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes." *J Urol* **177**(2): 540-545.
- Coombes, R. C., E. Hall, L. J. Gibson, R. Paridaens, J. Jassem, T. Delozier, S. E. Jones, I. Alvarez, G. Bertelli, O. Ortmann, A. S. Coates, E. Bajetta, D. Dodwell, R. E. Coleman, L. J. Fallowfield, E. Mickiewicz, J. Andersen, P. E. Lonning, G. Cocconi, A. Stewart, N. Stuart, C. F. Snowden, M. Carpentieri, G. Massimini, J. M. Bliss and C. van de Velde (2004). "A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer." *N Engl J Med* **350**(11): 1081-1092.
- Cooperberg, M. R., J. M. Broering, M. S. Litwin, D. P. Lubeck, S. S. Mehta, J. M. Henning and P. R. Carroll (2004). "The contemporary management of prostate cancer in the United States: lessons from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor (CapSURE), a national disease registry." *J Urol* **171**(4): 1393-1401.
- Cooperberg, M. R., D. J. Pasta, E. P. Elkin, M. S. Litwin, D. M. Latini, J. Du Chane and P. R. Carroll (2005). "The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy." *J Urol* **173**(6): 1938-1942.
- Cornel, K. M., R. F. Kruitwagen, B. Delvoux, L. Visconti, K. K. Van de Vijver, J. M. Day, T. Van Gorp, R. J. Hermans, G. A. Dunselman and A. Romano (2012). "Overexpression of 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Increases the Exposure of Endometrial Cancer to 17beta-Estradiol." *J Clin Endocrinol Metab*.
- Court, M. H., Q. Hao, S. Krishnaswamy, T. Bekaii-Saab, A. Al-Rohaimi, L. L. von Moltke and D. J. Greenblatt (2004). "UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver." *J Pharmacol Exp Ther* **310**(2): 656-665.
- Creasman, W. T. (1993). "Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer." *Cancer* **71**(4 Suppl): 1467-1470.
- Creemers, R., C. van Asperen, P. Kil, H. Vasen, T. Wiersma, I. van Oort and L. Kiemeny (2011). "Urologists' and GPs' knowledge of hereditary prostate cancer is suboptimal

- for prostate cancer counseling: a nation-wide survey in The Netherlands." Fam Cancer.
- Crosbie, E. J., M. Zwahlen, H. C. Kitchener, M. Egger and A. G. Renehan (2010). "Body mass index, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(12): 3119-3130.
- Cude, K. J., J. S. Montgomery, D. K. Price, S. C. Dixon, R. L. Kincaid, K. F. Kovacs, D. J. Venzon, D. J. Liewehr, M. E. Johnson, E. Reed and W. D. Figg (2002). "The role of an androgen receptor polymorphism in the clinical outcome of patients with metastatic prostate cancer." Urol Int **68**(1): 16-23.
- Cunningham, J. M., S. J. Hebring, S. K. McDonnell, M. S. Cicek, G. B. Christensen, L. Wang, S. J. Jacobsen, J. R. Cerhan, M. L. Blute, D. J. Schaid and S. N. Thibodeau (2007). "Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(5): 969-978.
- Cushman, M., H. M. He, J. A. Katzenellenbogen, C. M. Lin and E. Hamel (1995). "Synthesis, antitubulin and antimitotic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site." J Med Chem **38**(12): 2041-2049.
- Cussenot, O., A. R. Azzouzi, N. Nicolaiew, G. Fromont, P. Mangin, L. Cormier, G. Fournier, A. Valeri, S. Larre, F. Thibault, J. P. Giordanella, M. Pouchard, Y. Zheng, F. C. Hamdy, A. Cox and G. Cancel-Tassin (2007). "Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: the hidden face of estrogens." J Clin Oncol **25**(24): 3596-3602.
- Cussenot, O., A. R. Azzouzi, N. Nicolaiew, P. Mangin, L. Cormier, G. Fournier, A. Valeri and G. Cancel-Tassin (2007). "Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors." Eur Urol **52**(4): 1082-1087.
- D'Amato, R. J., C. M. Lin, E. Flynn, J. Folkman and E. Hamel (1994). "2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3964-3968.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, S. B. Malkowicz, D. Schultz, K. Blank, G. A. Broderick, J. E. Tomaszewski, A. A. Renshaw, I. Kaplan, C. J. Beard and A. Wein (1998). "Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer." Jama **280**(11): 969-974.
- Danforth, K. N., A. H. Eliassen, S. S. Tworoger, S. A. Missmer, R. L. Barbieri, B. A. Rosner, G. A. Colditz and S. E. Hankinson (2009). "The association of plasma androgen levels with breast, ovarian, and endometrial cancer risk factors among postmenopausal women." Int J Cancer.
- Das, K., P. D. Lorena, L. K. Ng, D. Lim, L. Shen, W. Y. Siow, M. Teh, J. K. Reichardt and M. Salto-Tellez (2010). "Differential expression of steroid 5alpha-reductase

- isozymes and association with disease severity and angiogenic genes predict their biological role in prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* **17**(3): 757-770.
- Dawling, S., D. L. Hachey, N. Roodi and F. F. Parl (2004). "In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol." *Chem Res Toxicol* **17**(9): 1258-1264.
- Dawling, S., N. Roodi, R. L. Mernaugh, X. Wang and F. F. Parl (2001). "Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms." *Cancer Res* **61**(18): 6716-6722.
- Dawling, S., N. Roodi and F. F. Parl (2003). "Methoxyestrogens exert feedback inhibition on cytochrome P450 1A1 and 1B1." *Cancer Res* **63**(12): 3127-3132.
- de Bono, J. S., C. J. Logothetis, A. Molina, K. Fizazi, S. North, L. Chu, K. N. Chi, R. J. Jones, O. B. Goodman, Jr., F. Saad, J. N. Staffurth, P. Mainwaring, S. Harland, T. W. Flaig, T. E. Hutson, T. Cheng, H. Patterson, J. D. Hainsworth, C. J. Ryan, C. N. Sternberg, S. L. Ellard, A. Flechon, M. Saleh, M. Scholz, E. Efstathiou, A. Zivi, D. Bianchini, Y. Loriot, N. Chieffo, T. Kheoh, C. M. Haqq and H. I. Scher (2011). "Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer." *N Engl J Med* **364**(21): 1995-2005.
- de Bono, J. S., H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V. Doyle, L. W. Terstappen, K. J. Pienta and D. Raghavan (2008). "Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer." *Clin Cancer Res* **14**(19): 6302-6309.
- Dehainault, C., D. Michaux, S. Pagès-Berhouet, V. Caux-Moncoutier, F. Doz, L. Desjardins, J. Couturier, P. Parent, D. Stoppa-Lyonnet, M. Gauthier-Villars and C. Houdayer (2007). "A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation." *Eur J Hum Genet* **15**: 473-477.
- Deming, S. L., W. Zheng, W. H. Xu, Q. Cai, Z. Ruan, Y. B. Xiang and X. O. Shu (2008). "UGT1A1 genetic polymorphisms, endogenous estrogen exposure, soy food intake, and endometrial cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(3): 563-570.
- DiagnoCure (2012). "FDA APPROVES PROGENSA® PCA3 ASSAY." *DiagnoCure Press Release*.
- Diver, M. J. (2006). "Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men." *Ann Clin Biochem* **43**(Pt 1): 3-12.
- Dodwell, D., A. Wardley and S. Johnston (2006). "Postmenopausal advanced breast cancer: options for therapy after tamoxifen and aromatase inhibitors." *Breast* **15**(5): 584-594.
- Dotters, D. J. (2000). "Preoperative CA 125 in endometrial cancer: is it useful?" *Am J Obstet Gynecol* **182**(6): 1328-1334.
- Dubois, S. G., M. Beaulieu, E. Levesque, D. W. Hum and A. Belanger (1999). "Alteration of human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B17 regio-specificity by a single amino acid substitution." *J Mol Biol* **289**(1): 29-39.
- Duguay, Y., M. McGrath, J. Lepine, J. F. Gagne, S. E. Hankinson, G. A. Colditz, D. J. Hunter, M. Plante, B. Tetu, A. Belanger, C. Guillemette and I. De Vivo (2004). "The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk." *Cancer Res* **64**(3): 1202-1207.

- Edwards, J., N. S. Krishna, K. M. Grigor and J. M. Bartlett (2003). "Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer." *Br J Cancer* **89**(3): 552-556.
- Edwards, S. M., M. D. Badzioch, R. Minter, R. Hamoudi, N. Collins, A. Ardern-Jones, A. Dowe, S. Osborne, J. Kelly, R. Shearer, D. F. Easton, G. F. Saunders, D. P. Dearnaley and R. A. Eeles (1999). "Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival." *Int J Cancer* **84**(5): 458-465.
- Eeles, R. A., Z. Kote-Jarai, A. A. Al Olama, G. G. Giles, M. Guy, G. Severi, K. Muir, J. L. Hopper, B. E. Henderson, C. A. Haiman, J. Schleutker, F. C. Hamdy, D. E. Neal, J. L. Donovan, J. L. Stanford, E. A. Ostrander, S. A. Ingles, E. M. John, S. N. Thibodeau, D. Schaid, J. Y. Park, A. Spurdle, J. Clements, J. L. Dickinson, C. Maier, W. Vogel, T. Dork, T. R. Rebbeck, K. A. Cooney, L. Cannon-Albright, P. O. Chappuis, P. Hutter, M. Zeegers, R. Kaneva, H. W. Zhang, Y. J. Lu, W. D. Foulkes, D. R. English, D. A. Leongamornlert, M. Tymrakiewicz, J. Morrison, A. T. Ardern-Jones, A. L. Hall, L. T. O'Brien, R. A. Wilkinson, E. J. Saunders, E. C. Page, E. J. Sawyer, S. M. Edwards, D. P. Dearnaley, A. Horwich, R. A. Huddart, V. S. Khoo, C. C. Parker, N. Van As, C. J. Woodhouse, A. Thompson, T. Christmas, C. Ogden, C. S. Cooper, M. C. Southey, A. Lophatananon, J. F. Liu, L. N. Kolonel, L. Le Marchand, T. Wahlfors, T. L. Tammela, A. Auvinen, S. J. Lewis, A. Cox, L. M. FitzGerald, J. S. Koopmeiners, D. M. Karyadi, E. M. Kwon, M. C. Stern, R. Corral, A. D. Joshi, A. Shahabi, S. K. McDonnell, T. A. Sellers, J. Pow-Sang, S. Chambers, J. Aitken, R. A. Gardiner, J. Batra, M. A. Kedda, F. Lose, A. Polanowski, B. Patterson, J. Serth, A. Meyer, M. Luedeke, K. Stefflova, A. M. Ray, E. M. Lange, J. Farnham, H. Khan, C. Slavov, A. Mitkova, G. Cao and D. F. Easton (2009). "Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study." *Nat Genet* **41**(10): 1116-1121.
- Eeles, R. A., Z. Kote-Jarai, G. G. Giles, A. A. Olama, M. Guy, S. K. Jugurnauth, S. Mulholland, D. A. Leongamornlert, S. M. Edwards, J. Morrison, H. I. Field, M. C. Southey, G. Severi, J. L. Donovan, F. C. Hamdy, D. P. Dearnaley, K. R. Muir, C. Smith, M. Bagnato, A. T. Ardern-Jones, A. L. Hall, L. T. O'Brien, B. N. Gehr-Swain, R. A. Wilkinson, A. Cox, S. Lewis, P. M. Brown, S. G. Jhavar, M. Tymrakiewicz, A. Lophatananon, S. L. Bryant, A. Horwich, R. A. Huddart, V. S. Khoo, C. C. Parker, C. J. Woodhouse, A. Thompson, T. Christmas, C. Ogden, C. Fisher, C. Jamieson, C. S. Cooper, D. R. English, J. L. Hopper, D. E. Neal and D. F. Easton (2008). "Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility." *Nat Genet* **40**(3): 316-321.
- Eliassen, A. H. and S. E. Hankinson (2008). "Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies." *Adv Exp Med Biol* **630**: 148-165.
- Eliassen, A. H., S. A. Missmer, S. S. Tworoger, D. Spiegelman, R. L. Barbieri, M. Dowsett and S. E. Hankinson (2006). "Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **98**(19): 1406-1415.
- Eliassen, A. H., D. Spiegelman, X. Xu, L. K. Keifer, T. D. Veenstra, R. L. Barbieri, W. C. Willett, S. E. Hankinson and R. G. Ziegler (2012). "Urinary Estrogens and Estrogen

- Metabolites and Subsequent Risk of Breast Cancer among Premenopausal Women." *Cancer Res* **72**(3): 696-706.
- Ellem, S. J., J. F. Schmitt, J. S. Pedersen, M. Frydenberg and G. P. Risbridger (2004). "Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(5): 2434-2441.
- Elo, J. P., L. A. Akinola, M. Poutanen, P. Vihko, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen and R. Vihko (1996). "Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzyme expression in benign and malignant human prostate." *Int J Cancer* **66**(1): 37-41.
- Elo, J. P., P. Harkonen, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen, M. Poutanen, R. Vihko and P. Vihko (1997). "Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behavior of prostate cancer." *Cancer Res* **57**(16): 3356-3359.
- Elo, J. P., P. Harkonen, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen and P. Vihko (1999). "Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient." *Br J Cancer* **79**(1): 156-160.
- Engelsen, I. B., L. A. Akslen and H. B. Salvesen (2009). "Biologic markers in endometrial cancer treatment." *Apmis* **117**(10): 693-707.
- Ewing, C. M., A. M. Ray, E. M. Lange, K. A. Zuhlke, C. M. Robbins, W. D. Tembe, K. E. Wiley, S. D. Isaacs, D. Johng, Y. Wang, C. Bizon, G. Yan, M. Gielzak, A. W. Partin, V. Shanmugam, T. Izatt, S. Sinari, D. W. Craig, S. L. Zheng, P. C. Walsh, J. E. Montie, J. Xu, J. D. Carpten, W. B. Isaacs and K. A. Cooney (2012). "Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk." *N Engl J Med* **366**(2): 141-149.
- Fabrini, M. G., A. Gadducci, F. Perrone, L. A. L. C, S. Cosio, S. Moda, M. E. Guerrieri, A. Grandinetti and C. Greco (2012). "Relationship between Interval from Surgery to Radiotherapy and Local Recurrence Rate in Patients with Endometrioid-type Endometrial Cancer: a Retrospective Mono-institutional Italian Study." *Anticancer Res* **32**(1): 169-173.
- Falk, R. T., M. H. Gail, T. R. Fears, S. C. Rossi, F. Stanczyk, H. Adlercreutz, P. Kiura, K. Wahala, J. L. Donaldson, J. B. Vaught, C. M. Fillmore, R. N. Hoover and R. G. Ziegler (1999). "Reproducibility and validity of radioimmunoassays for urinary hormones and metabolites in pre- and postmenopausal women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(6): 567-577.
- Falk, R. T., X. Xu, L. Keefer, T. D. Veenstra and R. G. Ziegler (2008). "A liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous measurement of 15 urinary estrogens and estrogen metabolites: assay reproducibility and interindividual variability." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(12): 3411-3418.
- Farquhar, J. W. (1971). "Amniotic, urinary and serum hormones in fetal diagnosis." *Can Med Assoc J* **105**(2): 174-176 passim.
- Faucher, F., L. Lacoste, I. Dufort and V. Luu-The (2001). "High metabolism of catecholestrogens by type 1 estrogen sulfotransferase (hEST1)." *J Steroid Biochem Mol Biol* **77**(1): 83-86.

- Faupel-Badger, J. M., B. J. Fuhrman, X. Xu, R. T. Falk, L. K. Keefer, T. D. Veenstra, R. N. Hoover and R. G. Ziegler (2010). "Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(1): 292-300.
- Febbo, P. G., P. W. Kantoff, E. A. Platz, D. Casey, S. Batter, E. Giovannucci, C. H. Hennekens and M. J. Stampfer (1999). "The V89L polymorphism in the 5 α -reductase type 2 gene and risk of prostate cancer." *Cancer Res* **59**(23): 5878-5881.
- Feldman, B. J. and D. Feldman (2001). "The development of androgen-independent prostate cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(1): 34-45.
- Fernandez, S. V., I. H. Russo and J. Russo (2006). "Estradiol and its metabolites 4-hydroxyestradiol and 2-hydroxyestradiol induce mutations in human breast epithelial cells." *Int J Cancer* **118**(8): 1862-1868.
- Fogle, R. H., F. Z. Stanczyk, X. Zhang and R. J. Paulson (2007). "Ovarian androgen production in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(8): 3040-3043.
- Fortunati, N. (1999). "Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner?" *J Endocrinol Invest* **22**(3): 223-234.
- Fortunati, N., M. G. Catalano, G. Boccuzzi and R. Frairia (2010). "Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), estradiol and breast cancer." *Mol Cell Endocrinol* **316**(1): 86-92.
- Foster, P. A., M. J. Reed and A. Purohit (2008). "Recent developments of steroid sulfatase inhibitors as anti-cancer agents." *Anticancer Agents Med Chem* **8**(7): 732-738.
- Foster, P. A., L. W. Woo, B. V. Potter, M. J. Reed and A. Purohit (2008). "The use of steroid sulfatase inhibitors as a novel therapeutic strategy against hormone-dependent endometrial cancer." *Endocrinology* **149**(8): 4035-4042.
- Fournier, M. A. and D. Poirier (2009). "Estrogen formation in endometrial and cervix cancer cell lines: involvement of aromatase, steroid sulfatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 5, 7 and 12)." *Mol Cell Endocrinol* **301**(1-2): 142-145.
- Friedlander, T. W., R. Roy, S. A. Tomlins, V. T. Ngo, Y. Kobayashi, A. Azameera, M. A. Rubin, K. J. Pienta, A. M. Chinnaiyan, M. M. Ittmann, C. J. Ryan and P. L. Paris (2011). "Common Structural and Epigenetic Changes in the Genome of Castration Resistant Prostate Cancer." *Cancer Res*.
- Frye, M. and F. M. Watt (2006). "The RNA methyltransferase Misu (NSun2) mediates Myc-induced proliferation and is upregulated in tumors." *Curr Biol* **16**(10): 971-981.
- Fuhrman, B. J., C. Schairer, M. H. Gail, J. Boyd-Morin, X. Xu, L. Y. Sue, S. S. Buys, C. Isaacs, L. K. Keefer, T. D. Veenstra, C. D. Berg, R. N. Hoover and R. G. Ziegler (2012). "Estrogen Metabolism and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women." *J Natl Cancer Inst*.
- Fussell, K. C., R. G. Udasin, P. J. Smith, M. A. Gallo and J. D. Laskin (2011). "Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells." *Carcinogenesis* **32**(8): 1285-1293.
- Gadducci, A., S. Cosio, M. G. Fabrini, A. Fanucchi, C. Barsotti, R. Cristofani, C. Greco and A. R. Genazzani (2011). "Patterns of failures in endometrial cancer: clinicopathological variables predictive of the risk of local, distant and retroperitoneal failure." *Anticancer Res* **31**(10): 3483-3488.

- Gaikwad, N. W., E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (2007). "Evidence from ESI-MS for NQO1-catalyzed reduction of estrogen ortho-quinones." Free Radic Biol Med **43**(9): 1289-1298.
- Gaikwad, N. W., L. Yang, S. Pruthi, J. N. Ingle, N. Sandhu, E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (2009). "Urine biomarkers of risk in the molecular etiology of breast cancer." Breast Cancer (Auckl) **3**: 1-8.
- Gaikwad, N. W., L. Yang, E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (2009). "Evidence for NQO2-mediated reduction of the carcinogenic estrogen ortho-quinones." Free Radic Biol Med **46**(2): 253-262.
- Gallagher, C. J., F. F. Kadlubar, J. E. Muscat, C. B. Ambrosone, N. P. Lang and P. Lazarus (2007). "The UGT2B17 gene deletion polymorphism and risk of prostate cancer. A case-control study in Caucasians." Cancer Detect Prev **31**(4): 310-315.
- Gallagher, D. J., J. Vijai, A. M. Cronin, J. Bhatia, A. J. Vickers, M. M. Gaudet, S. Fine, V. Reuter, H. I. Scher, C. Hallden, A. Dutra-Clarke, R. J. Klein, P. T. Scardino, J. A. Eastham, H. Lilja, T. Kirchhoff and K. Offit (2010). "Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality." Clin Cancer Res **16**(10): 2819-2832.
- Gallup, D. G. and R. J. Stock (1984). "Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger." Obstet Gynecol **64**(3): 417-420.
- Gambrell, R. D., Jr. (1977). "Estrogens, progestogens and endometrial cancer." J Reprod Med **18**(6): 301-306.
- Gaudet, M. M., J. V. Lacey, Jr., J. Lissowska, B. Peplonska, L. A. Brinton, S. Chanock and M. Garcia-Closas (2008). "Genetic variation in CYP17 and endometrial cancer risk." Hum Genet **123**(2): 155-162.
- Geller, J., J. Albert, D. Loza, S. Geller, W. Stoeltzing and D. de la Vega (1978). "DHT Concentrations in Human Prostate Cancer Tissue." J Clin Endocrinol Metab **46**(3): 440-444.
- Gennari, L., L. Masi, D. Merlotti, L. Picariello, A. Falchetti, A. Tanini, C. Mavilia, F. Del Monte, S. Gonnelli, B. Lucani, C. Gennari and M. L. Brandi (2004). "A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2803-2810.
- Gerstner, S., D. Glasemann, E. Pfeiffer and M. Metzler (2008). "The influence of metabolism on the genotoxicity of catechol estrogens in three cultured cell lines." Mol Nutr Food Res **52**(7): 823-829.
- Giton, F., A. de la Taille, Y. Allory, H. Galons, F. Vacherot, P. Soyeux, C. C. Abbou, S. Loric, O. Cussenot, J. P. Raynaud and J. Fiet (2008). "Estrone sulfate (E1S), a prognosis marker for tumor aggressiveness in prostate cancer (PCa)." J Steroid Biochem Mol Biol **109**(1-2): 158-167.
- Giton, F., J. Fiet, J. N. Cornu, O. Cussenot, A. Belanger, S. Urien, A. Oliva, P. Blanchet and L. Multigner (2011). "Serum sex steroids measured in middle-aged European and African-Caribbean men by gas chromatography-mass spectrometry." Eur J Endocrinol **165**(6): 917-924.
- Gleave, M., J. Qian, C. Andreou, P. Pommerville, J. Chin, R. Casey, G. Steinhoff, N. Fleshner, D. Bostwick, L. Thomas and R. Rittmaster (2006). "The effects of the

- dual 5alpha-reductase inhibitor dutasteride on localized prostate cancer--results from a 4-month pre-radical prostatectomy study." *Prostate* **66**(15): 1674-1685.
- Goderie-Plomp, H. W., M. van der Klift, W. de Ronde, A. Hofman, F. H. de Jong and H. A. Pols (2004). "Endogenous sex hormones, sex hormone-binding globulin, and the risk of incident vertebral fractures in elderly men and women: the Rotterdam Study." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(7): 3261-3269.
- Goodman, O. B., Jr., L. M. Fink, J. T. Symanowski, B. Wong, B. Grobaski, D. Pomerantz, Y. Ma, D. C. Ward and N. J. Vogelzang (2009). "Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(6): 1904-1913.
- Goodwin, T. M. (1999). "A role for estriol in human labor, term and preterm." *Am J Obstet Gynecol* **180**(1 Pt 3): S208-213.
- Grady, D., T. Gebretsadik, K. Kerlikowske, V. Ernster and D. Petitti (1995). "Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis." *Obstet Gynecol* **85**(2): 304-313.
- Grube, M., K. Kock, S. Karner, S. Reuther, C. A. Ritter, G. Jedlitschky and H. K. Kroemer (2006). "Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones." *Mol Pharmacol* **70**(5): 1735-1741.
- Gu, M., X. Dong, X. Zhang and W. Niu (2012). "The CAG repeat polymorphism of androgen receptor gene and prostate cancer: a meta-analysis." *Mol Biol Rep* **39**(3): 2615-2624.
- Gudmundsson, J., P. Sulem, D. F. Gudbjartsson, T. Blondal, A. Gylfason, B. A. Agnarsson, K. R. Benediktsdottir, D. N. Magnusdottir, G. Orlygsdottir, M. Jakobsdottir, S. N. Stacey, A. Sigurdsson, T. Wahlfors, T. Tammela, J. P. Breyer, K. M. McReynolds, K. M. Bradley, B. Saez, J. Godino, S. Navarrete, F. Fuertes, L. Murillo, E. Polo, K. K. Aben, I. M. van Oort, B. K. Suarez, B. T. Helfand, D. Kan, C. Zanon, M. L. Frigge, K. Kristjansson, J. R. Gulcher, G. V. Einarsson, E. Jonsson, W. J. Catalona, J. I. Mayordomo, L. A. Kiemeny, J. R. Smith, J. Schleutker, R. B. Barkardottir, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, T. Rafnar and K. Stefansson (2009). "Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility." *Nat Genet* **41**(10): 1122-1126.
- Gudmundsson, J., P. Sulem, A. Manolescu, L. T. Amundadottir, D. Gudbjartsson, A. Helgason, T. Rafnar, J. T. Bergthorsson, B. A. Agnarsson, A. Baker, A. Sigurdsson, K. R. Benediktsdottir, M. Jakobsdottir, J. Xu, T. Blondal, J. Kostic, J. Sun, S. Ghosh, S. N. Stacey, M. Mouy, J. Saemundsdottir, V. M. Backman, K. Kristjansson, A. Tres, A. W. Partin, M. T. Albers-Akkers, J. Godino-Ivan Marcos, P. C. Walsh, D. W. Swinkels, S. Navarrete, S. D. Isaacs, K. K. Aben, T. Graif, J. Cashy, M. Ruiz-Echarri, K. E. Wiley, B. K. Suarez, J. A. Witjes, M. Frigge, C. Ober, E. Jonsson, G. V. Einarsson, J. I. Mayordomo, L. A. Kiemeny, W. B. Isaacs, W. J. Catalona, R. B. Barkardottir, J. R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong and K. Stefansson (2007). "Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24." *Nat Genet* **39**(5): 631-637.
- Gudmundsson, J., P. Sulem, T. Rafnar, J. T. Bergthorsson, A. Manolescu, D. Gudbjartsson, B. A. Agnarsson, A. Sigurdsson, K. R. Benediktsdottir, T. Blondal, M.

- Jakobsdottir, S. N. Stacey, J. Kostic, K. T. Kristinsson, B. Birgisdottir, S. Ghosh, D. N. Magnusdottir, S. Thorlacius, G. Thorleifsson, S. L. Zheng, J. Sun, B. L. Chang, J. B. Elmore, J. P. Breyer, K. M. McReynolds, K. M. Bradley, B. L. Yaspán, F. Wiklund, P. Stattin, S. Lindstrom, H. O. Adami, S. K. McDonnell, D. J. Schaid, J. M. Cunningham, L. Wang, J. R. Cerhan, J. L. St Sauver, S. D. Isaacs, K. E. Wiley, A. W. Partin, P. C. Walsh, S. Polo, M. Ruiz-Echarri, S. Navarrete, F. Fuertes, B. Saez, J. Godino, P. C. Weijerman, D. W. Swinkels, K. K. Aben, J. A. Witjes, B. K. Suarez, B. T. Helfand, M. L. Frigge, K. Kristjansson, C. Ober, E. Jonsson, G. V. Einarsson, J. Xu, H. Gronberg, J. R. Smith, S. N. Thibodeau, W. B. Isaacs, W. J. Catalona, J. I. Mayordomo, L. A. Kiemeny, R. B. Barkardottir, J. R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong and K. Stefansson (2008). "Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer." *Nat Genet* **40**(3): 281-283.
- Gudmundsson, J., P. Sulem, V. Steinthorsdottir, J. T. Bergthorsson, G. Thorleifsson, A. Manolescu, T. Rafnar, D. Gudbjartsson, B. A. Agnarsson, A. Baker, A. Sigurdsson, K. R. Benediktsdottir, M. Jakobsdottir, T. Blondal, S. N. Stacey, A. Helgason, S. Gunnarsdottir, A. Olafsdottir, K. T. Kristinsson, B. Birgisdottir, S. Ghosh, S. Thorlacius, D. Magnusdottir, G. Stefansdottir, K. Kristjansson, Y. Bagger, R. L. Wilensky, M. P. Reilly, A. D. Morris, C. H. Kimber, A. Adeyemo, Y. Chen, J. Zhou, W. Y. So, P. C. Tong, M. C. Ng, T. Hansen, G. Andersen, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, A. Tres, F. Fuertes, M. Ruiz-Echarri, L. Asin, B. Saez, E. van Boven, S. Klaver, D. W. Swinkels, K. K. Aben, T. Graif, J. Cashy, B. K. Suarez, O. van Vierssen Trip, M. L. Frigge, C. Ober, M. H. Hofker, C. Wijmenga, C. Christiansen, D. J. Rader, C. N. Palmer, C. Rotimi, J. C. Chan, O. Pedersen, G. Sigurdsson, R. Benediktsson, E. Jonsson, G. V. Einarsson, J. I. Mayordomo, W. J. Catalona, L. A. Kiemeny, R. B. Barkardottir, J. R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong and K. Stefansson (2007). "Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes." *Nat Genet* **39**(8): 977-983.
- Guillemette, C., A. Belanger and J. Lepine (2004). "Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview." *Breast Cancer Res* **6**(6): 246-254.
- Guillemette, C., E. Levesque, M. Beaulieu, D. Turgeon, D. W. Hum and A. Belanger (1997). "Differential regulation of two uridine diphospho-glucuronosyltransferases, UGT2B15 and UGT2B17, in human prostate LNCaP cells." *Endocrinology* **138**(7): 2998-3005.
- Haiman, C. A., S. E. Hankinson, G. A. Colditz, D. J. Hunter and I. De Vivo (2001). "A polymorphism in CYP17 and endometrial cancer risk." *Cancer Res* **61**(10): 3955-3960.
- Haiman, C. A., N. Patterson, M. L. Freedman, S. R. Myers, M. C. Pike, A. Waliszewska, J. Neubauer, A. Tandon, C. Schirmer, G. J. McDonald, S. C. Greenway, D. O. Stram, L. Le Marchand, L. N. Kolonel, M. Frasco, D. Wong, L. C. Pooler, K. Ardlie, I. Oakley-Girvan, A. S. Whittemore, K. A. Cooney, E. M. John, S. A. Ingles, D. Altshuler, B. E. Henderson and D. Reich (2007). "Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer." *Nat Genet* **39**(5): 638-644.

- Hakkola, J., M. Pasanen, O. Pelkonen, J. Hukkanen, S. Evisalmi, S. Anttila, A. Rane, M. Mantyla, R. Purkunen, S. Saarikoski, M. Tooming and H. Raunio (1997). "Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells." *Carcinogenesis* **18**(2): 391-397.
- Hamada, A., T. Sissung, D. K. Price, R. Danesi, C. H. Chau, N. Sharifi, D. Venzon, K. Maeda, K. Nagao, A. Sparreboom, H. Mitsuya, W. L. Dahut and W. D. Figg (2008). "Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer." *Clin Cancer Res* **14**(11): 3312-3318.
- Handschin, C. and U. A. Meyer (2003). "Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors." *Pharmacol Rev* **55**(4): 649-673.
- Hanioka, N., H. Oka, K. Nagaoka, S. Ikushiro and S. Narimatsu (2011). "Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation." *Arch Toxicol* **85**(11): 1373-1381.
- Hankinson, S. E. (2005). "Endogenous hormones and risk of breast cancer in postmenopausal women." *Breast Dis* **24**: 3-15.
- Hankinson, S. E., W. C. Willett, J. E. Manson, G. A. Colditz, D. J. Hunter, D. Spiegelman, R. L. Barbieri and F. E. Speizer (1998). "Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **90**(17): 1292-1299.
- Harkonen, P., A. P. Kyllonen, S. Nordling and P. Vihko (2005). "Loss of heterozygosity in chromosomal region 16q24.3 associated with progression of prostate cancer." *Prostate* **62**(3): 267-274.
- Harkonen, P., S. Torn, R. Kurkela, K. Porvari, A. Pulkka, A. Lindfors, V. Isomaa and P. Vihko (2003). "Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(2): 705-712.
- Harrington, W. R., S. Sengupta and B. S. Katzenellenbogen (2006). "Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells." *Endocrinology* **147**(8): 3843-3850.
- Harris, W. P., E. A. Mostaghel, P. S. Nelson and B. Montgomery (2009). "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion." *Nat Clin Pract Urol* **6**(2): 76-85.
- Hartman, J., A. Strom and J. A. Gustafsson (2009). "Estrogen receptor beta in breast cancer--diagnostic and therapeutic implications." *Steroids* **74**(8): 635-641.
- Hauet, T., J. Liu, H. Li, M. Gazouli, M. Culty and V. Papadopoulos (2002). "PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells." *Endocr Res* **28**(4): 395-401.
- Hayes, L. D., G. F. Bickerstaff and J. S. Baker (2010). "Interactions of cortisol, testosterone, and resistance training: influence of circadian rhythms." *Chronobiol Int* **27**(4): 675-705.
- Heidenreich, A., G. Aus, M. Bolla, S. Joniau, V. B. Matveev, H. P. Schmid and F. Zattoni (2008). "EAU guidelines on prostate cancer." *Eur Urol* **53**(1): 68-80.
- Hempel, N., N. Gamage, J. L. Martin and M. E. McManus (2007). "Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(4): 685-689.

- Henderson, B. E. and H. S. Feigelson (2000). "Hormonal carcinogenesis." Carcinogenesis **21**(3): 427-433.
- Hevir, N., J. Sinkovec and T. L. Rizner (2011). "Disturbed expression of phase I and phase II estrogen-metabolizing enzymes in endometrial cancer: lower levels of CYP1B1 and increased expression of S-COMT." Mol Cell Endocrinol **331**(1): 158-167.
- Hevir, N., K. Vouk, J. Sinkovec, M. Ribic-Pucelj and T. L. Rizner (2011). "Aldo-keto reductases AKR1C1, AKR1C2 and AKR1C3 may enhance progesterone metabolism in ovarian endometriosis." Chem Biol Interact **191**(1-3): 217-226.
- Hong, S. K., J. J. Oh, S. Lee, H. M. Lee, S. S. Byun, G. Choe and S. E. Lee (2011). "Association of 5alpha-reductase inhibitor use and pathological features of prostate cancer in men undergoing radical prostatectomy." Prostate.
- Horwitz, E. M. (2009). "Prostate cancer: Optimizing the duration of androgen deprivation therapy." Nat Rev Urol **6**(10): 527-529.
- Hsing, A. W., C. Chen, A. P. Chokkalingam, Y. T. Gao, D. A. Dightman, H. T. Nguyen, J. Deng, J. Cheng, I. A. Sesterhenn, F. K. Mostofi, F. Z. Stanczyk and J. K. Reichardt (2001). "Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(10): 1077-1082.
- Hu, D. G. and P. I. Mackenzie (2009). "Estrogen receptor alpha, fos-related antigen-2, and c-Jun coordinately regulate human UDP glucuronosyltransferase 2B15 and 2B17 expression in response to 17beta-estradiol in MCF-7 cells." Mol Pharmacol **76**(2): 425-439.
- Huang, C. N., S. P. Huang, J. B. Pao, T. Y. Chang, Y. H. Lan, T. L. Lu, H. Z. Lee, S. H. Juang, P. P. Wu, Y. S. Pu, C. J. Hsieh and B. Y. Bao (2011). "Genetic polymorphisms in androgen receptor-binding sites predict survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy." Ann Oncol.
- Huang, J., J. Sun, Y. Chen, Y. Song, L. Dong, Q. Zhan, R. Zhang and Z. Abliz (2012). "Analysis of multiplex endogenous estrogen metabolites in human urine using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A case study for breast cancer." Anal Chim Acta **711**: 60-68.
- Huang, S. P., L. C. Huang, W. C. Ting, L. M. Chen, T. Y. Chang, T. L. Lu, Y. H. Lan, C. C. Liu, W. H. Yang, H. Z. Lee, C. J. Hsieh and B. Y. Bao (2009). "Prognostic significance of prostate cancer susceptibility variants on prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 3068-3074.
- Huang, S. P., W. C. Ting, L. M. Chen, L. C. Huang, C. C. Liu, C. W. Chen, C. J. Hsieh, W. H. Yang, T. Y. Chang, H. Z. Lee and B. Y. Bao (2010). "Association analysis of Wnt pathway genes on prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy." Ann Surg Oncol **17**(1): 312-322.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (1941). "Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate." Cancer Research **1**: 293-297.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (2002). "Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941." J Urol **168**(1): 9-12.

- Iasonos, A., D. Schrag, G. V. Raj and K. S. Panageas (2008). "How to build and interpret a nomogram for cancer prognosis." *J Clin Oncol* **26**(8): 1364-1370.
- "The International HapMap Project." (2003). *Nature* **426**(6968): 789-796.
- Iwai, M., H. Kanno, M. Hashino, J. Suzuki, T. Yanaihara, T. Nakayama and H. Mori (1981). "Determination of serum unconjugated estrone, estradiol-17 beta and estriol during pregnancy by selected ion monitoring." *J Chromatogr* **225**(2): 275-282.
- Jacobs, S. C. (1983). "Spread of prostatic cancer to bone." *Urology* **21**(4): 337-344.
- Jakobsson, J., L. Ekstrom, N. Inotsume, M. Garle, M. Lorentzon, C. Ohlsson, H. K. Roh, K. Carlstrom and A. Rane (2006). "Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism." *J Clin Endocrinol Metab.* **91**(2): 687-693. Epub 2005 Dec 2006.
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward (2011). "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* **60**(5): 277-300.
- Jenkins, E. P., C. L. Hsieh, A. Milatovich, K. Normington, D. M. Berman, U. Francke and D. W. Russell (1991). "Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 alpha-reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue." *Genomics* **11**(4): 1102-1112.
- Jeon, Y. T., I. A. Park, Y. B. Kim, J. W. Kim, N. H. Park, S. B. Kang, H. P. Lee and Y. S. Song (2006). "Steroid receptor expressions in endometrial cancer: clinical significance and epidemiological implication." *Cancer Lett* **239**(2): 198-204.
- Jeon, Y. T., S. Y. Park, Y. B. Kim, J. W. Kim, N. H. Park, S. B. Kang, H. P. Lee and Y. S. Song (2007). "Aromatase expression was not detected by immunohistochemistry in endometrial cancer." *Ann N Y Acad Sci* **1095**: 70-75.
- Jordan, V. C. (2006). "The science of selective estrogen receptor modulators: concept to clinical practice." *Clin Cancer Res* **12**(17): 5010-5013.
- Kaaks, R., A. Lukanova and M. S. Kurzer (2002). "Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(12): 1531-1543.
- Karageorgi, S., M. McGrath, I. M. Lee, J. Buring, P. Kraft and I. De Vivo (2011). "Polymorphisms in genes hydroxysteroid-dehydrogenase-17b type 2 and type 4 and endometrial cancer risk." *Gynecol Oncol* **121**(1): 54-58.
- Karypidis, A. H., M. Olsson, S. O. Andersson, A. Rane and L. Ekstrom (2008). "Deletion polymorphism of the UGT2B17 gene is associated with increased risk for prostate cancer and correlated to gene expression in the prostate." *Pharmacogenomics J* **8**(2): 147-151.
- Kastner, P., A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer and P. Chambon (1990). "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." *EMBO J* **9**(5): 1603-1614.
- Kato, S., A. Sadarangani, S. Lange, M. Villalon, J. Branes, J. J. Brosens, G. I. Owen and M. Cuello (2007). "The oestrogen metabolite 2-methoxyestradiol alone or in combination with tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediates apoptosis in cancerous but not healthy cells of the human endometrium." *Endocr Relat Cancer* **14**(2): 351-368.

- Kattan, M. W., J. A. Eastham, A. M. Stapleton, T. M. Wheeler and P. T. Scardino (1998). "A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **90**(10): 766-771.
- Kattan, M. W., A. J. Vickers, C. Yu, F. J. Bianco, A. M. Cronin, J. A. Eastham, E. A. Klein, A. M. Reuther, J. Edson Pontes and P. T. Scardino (2009). "Preoperative and postoperative nomograms incorporating surgeon experience for clinically localized prostate cancer." *Cancer* **115**(5): 1005-1010.
- Katzenellenbogen, B. S. (1984). "Biology and receptor interactions of estriol and estriol derivatives in vitro and in vivo." *J Steroid Biochem* **20**(4B): 1033-1037.
- Key, T., P. Appleby, I. Barnes and G. Reeves (2002). "Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies." *J Natl Cancer Inst* **94**(8): 606-616.
- Key, T. J., P. N. Appleby, G. K. Reeves, A. Roddam, J. F. Dorgan, C. Longcope, F. Z. Stanczyk, H. E. Stephenson, Jr., R. T. Falk, R. Miller, A. Schatzkin, D. S. Allen, I. S. Fentiman, T. J. Key, D. Y. Wang, M. Dowsett, H. V. Thomas, S. E. Hankinson, P. Toniolo, A. Akhmedkhanov, K. Koenig, R. E. Shore, A. Zeleniuch-Jacquotte, F. Berrino, P. Muti, A. Micheli, V. Krogh, S. Sieri, V. Pala, E. Venturelli, G. Secreto, E. Barrett-Connor, G. A. Laughlin, M. Kabuto, S. Akiba, R. G. Stevens, K. Neriishi, C. E. Land, J. A. Cauley, L. H. Kuller, S. R. Cummings, K. J. Helzlsouer, A. J. Alberg, T. L. Bush, G. W. Comstock, G. B. Gordon, S. R. Miller and C. Longcope (2003). "Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **95**(16): 1218-1226.
- Key, T. J., P. N. Appleby, G. K. Reeves, A. W. Roddam, K. J. Helzlsouer, A. J. Alberg, D. E. Rollison, J. F. Dorgan, L. A. Brinton, K. Overvad, R. Kaaks, A. Trichopoulou, F. Clavel-Chapelon, S. Panico, E. J. Duell, P. H. Peeters, S. Rinaldi, I. S. Fentiman, M. Dowsett, J. Manjer, P. Lenner, G. Hallmans, L. Baglietto, D. R. English, G. G. Giles, J. L. Hopper, G. Severi, H. A. Morris, S. E. Hankinson, S. S. Tworoger, K. Koenig, A. Zeleniuch-Jacquotte, A. A. Arslan, P. Toniolo, R. E. Shore, V. Krogh, A. Micheli, F. Berrino, E. Barrett-Connor, G. A. Laughlin, M. Kabuto, S. Akiba, R. G. Stevens, K. Neriishi, C. E. Land, J. A. Cauley, L. Y. Lui, S. R. Cummings, M. J. Gunter, T. E. Rohan and H. D. Strickler (2011). "Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies." *Br J Cancer* **105**(5): 709-722.
- Kirby, M., C. Hirst and E. D. Crawford (2011). "Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review." *Int J Clin Pract* **65**(11): 1180-1192.
- Kistner, R. W. (1976). "Estrogen controversy updated." *Female patient* **1**(9): 25-27.
- Klug, T. L., H. L. Bradlow and D. W. Sepkovic (1994). "Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for simultaneous quantitation of 2- and 16 alpha-hydroxyestrone in urine." *Steroids* **59**(11): 648-655.
- Koh, E., T. Noda, J. Kanaya and M. Namiki (2002). "Differential expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozyme genes in prostate cancer and noncancer tissues." *Prostate* **53**(2): 154-159.
- Koivisto, P., J. Kononen, C. Palmberg, T. Tammela, E. Hyytinen, J. Isola, J. Trapman, K. Cleutjens, A. Noordzij, T. Visakorpi and O. P. Kallioniemi (1997). "Androgen

- receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer." *Cancer Res* **57**(2): 314-319.
- Koochekpour, S. (2010). "Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer." *Asian J Androl* **12**(5): 639-657.
- Korets, R., P. Motamedinia, O. Yeshchina, M. Desai and J. M. McKiernan (2011). "Accuracy of the Kattan nomogram across prostate cancer risk-groups." *BJU Int* **108**(1): 56-60.
- Kounelis, S., N. Kapranos, E. Kouri, D. Coppola, H. Papadaki and M. W. Jones (2000). "Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature." *Mod Pathol* **13**(4): 379-388.
- Kraft, P., S. Wacholder, M. C. Cornelis, F. B. Hu, R. B. Hayes, G. Thomas, R. Hoover, D. J. Hunter and S. Chanock (2009). "Beyond odds ratios--communicating disease risk based on genetic profiles." *Nat Rev Genet* **10**(4): 264-269.
- Kumar, J. K., R. Y. Ping, H. F. Teong, S. Goh and M. V. Clement (2011). "Activation of a non-genomic Pim-1/Bad-Pser75 module is required for an efficient pro-survival effect of Bcl-xL induced by androgen in LNCaP cells." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(4): 594-603.
- Labrie, F. (1991). "Intracrinology." *Mol Cell Endocrinol* **78**(3): C113-118.
- Labrie, F. (2011). "Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment." *Nat Rev Urol* **8**(2): 73-85.
- Labrie, F., A. Belanger, P. Belanger, R. Berube, C. Martel, L. Cusan, J. Gomez, B. Candas, I. Castiel, V. Chaussade, C. Deloche and J. Leclaire (2006). "Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women." *J Steroid Biochem Mol Biol* **99**(4-5): 182-188.
- Labrie, F., A. Belanger, P. Belanger, R. Berube, C. Martel, L. Cusan, J. Gomez, B. Candas, V. Chaussade, I. Castiel, C. Deloche and J. Leclaire (2007). "Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration." *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**(2): 178-188.
- Labrie, F., A. Belanger, L. Cusan, J. L. Gomez and B. Candas (1997). "Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(8): 2396-2402.
- Labrie, F., A. Belanger, A. Dupont, V. Luu-The, J. Simard and C. Labrie (1993). "Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy." *Clin Invest Med* **16**(6): 475-492.
- Labrie, F., L. Cusan, J. L. Gomez, C. Martel, R. Berube, P. Belanger, A. Belanger, L. Vandemput, D. Mellstrom and C. Ohlsson (2009). "Comparable amounts of sex steroids are made outside the gonads in men and women: strong lesson for hormone therapy of prostate and breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **113**(1-2): 52-56.
- Labrie, F., V. Luu-The, A. Belanger, S. X. Lin, J. Simard, G. Pelletier and C. Labrie (2005). "Is dehydroepiandrosterone a hormone?" *J Endocrinol* **187**(2): 169-196.
- Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie and J. Simard (2001). "DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology." *Front Neuroendocrinol* **22**(3): 185-212.

- Labrie, F., Y. Sugimoto, V. Luu-The, J. Simard, Y. Lachance, D. Bachvarov, G. Leblanc, F. Durocher and N. Paquet (1992). "Structure of human type II 5 alpha-reductase gene." *Endocrinology* **131**(3): 1571-1573.
- Latil, A. G., R. Azzouzi, G. S. Cancel, E. C. Guillaume, B. Cochran-Priollet, P. L. Berthon and O. Cussenot (2001). "Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways." *Cancer* **92**(5): 1130-1137.
- Laughlin, G. A., E. Barrett-Connor, D. Kritz-Silverstein and D. von Muhlen (2000). "Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo Study." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(2): 645-651.
- LaVallee, T. M., X. H. Zhan, C. J. Herbstritt, E. C. Kough, S. J. Green and V. S. Pribluda (2002). "2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta." *Cancer Res* **62**(13): 3691-3697.
- Lee, A. J., M. X. Cai, P. E. Thomas, A. H. Conney and B. T. Zhu (2003). "Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms." *Endocrinology* **144**(8): 3382-3398.
- Lee, A. J., A. H. Conney and B. T. Zhu (2003). "Human cytochrome P450 3A7 has a distinct high catalytic activity for the 16alpha-hydroxylation of estrone but not 17beta-estradiol." *Cancer Res* **63**(19): 6532-6536.
- Lee, J. S., B. Ettinger, F. Z. Stanczyk, E. Vittinghoff, V. Hanes, J. A. Cauley, W. Chandler, J. Settlage, M. S. Beattie, E. Folklerd, M. Dowsett, D. Grady and S. R. Cummings (2006). "Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(10): 3791-3797.
- Leitman, D. C., S. Paruthiyil, O. I. Vivar, E. F. Saunier, C. B. Herber, I. Cohen, M. Tagliaferri and T. P. Speed (2010). "Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists." *Curr Opin Pharmacol* **10**(6): 629-636.
- Lépine, J., O. Bernard, M. Plante, B. Tetu, G. Pelletier, F. Labrie, A. Bélanger and C. Guillemette (2004). "Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(10): 5222-5232.
- Leung, Y. S., K. Dees, R. Cyr, I. Schloegel and P. C. Kao (1997). "Falsely increased serum estradiol results reported in direct estradiol assays." *Clin Chem* **43**(7): 1250-1251.
- Lévesque, E., M. Beaulieu, M. D. Green, T. R. Tephly, A. Bélanger and D. W. Hum (1997). "Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene." *Pharmacogenetics* **7**(4): 317-325.
- Lévesque, E., D. Turgeon, J. S. Carrier, V. Montminy, M. Beaulieu and A. Bélanger (2001). "Isolation and characterization of the UGT2B28 cDNA encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase." *Biochemistry* **40**(13): 3869-3881.

- Levin, E. R. (2009). "Plasma membrane estrogen receptors." Trends Endocrinol Metab **20**(10): 477-482.
- Li, J. and F. Al-Azzawi (2009). "Mechanism of androgen receptor action." Maturitas **63**(2): 142-148.
- Li, J., R. J. Coates, M. Gwinn and M. J. Khoury (2010). "Steroid 5- α -reductase Type 2 (SRD5a2) gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a HuGE review." Am J Epidemiol **171**(1): 1-13.
- Li, J., Z. Ding, Z. Wang, J. F. Lu, S. N. Maity, N. M. Navone, C. J. Logothetis, G. B. Mills and J. Kim (2011). "Androgen regulation of 5 α -reductase isoenzymes in prostate cancer: implications for prostate cancer prevention." PLoS One **6**(12): e28840.
- Li, L., M. S. Cicek, G. Casey and J. S. Witte (2004). "No association between a tetranucleotide repeat polymorphism of CYP19 and prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(12): 2280-2281.
- Li, L., N. E. Heldin, J. Grawe, U. Ulmsten and X. Fu (2004). "Induction of apoptosis or necrosis in human endometrial carcinoma cells by 2-methoxyestradiol." Anticancer Res **24**(6): 3983-3990.
- Li, N., J. Dong, Z. Hu, H. Shen and M. Dai (2010). "Potentially functional polymorphisms in ESR1 and breast cancer risk: a meta-analysis." Breast Cancer Res Treat **121**(1): 177-184.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe and K. Hemminki (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.
- Lin, B., C. Ferguson, J. T. White, S. Wang, R. Vessella, L. D. True, L. Hood and P. S. Nelson (1999). "Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2." Cancer Res **59**(17): 4180-4184.
- Lin, D. W., L. M. FitzGerald, R. Fu, E. M. Kwon, S. L. Zheng, S. Kolb, F. Wiklund, P. Stattin, W. B. Isaacs, J. Xu, E. A. Ostrander, Z. Feng, H. Gronberg and J. L. Stanford (2011). "Genetic variants in the LEPR, CRY1, RNASEL, IL4, and ARVCF genes are prognostic markers of prostate cancer-specific mortality." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **20**(9): 1928-1936.
- Lindstrom, S., H. O. Adami, K. A. Balter, J. Xu, S. L. Zheng, P. Stattin, H. Gronberg and F. Wiklund (2007). "Inherited variation in hormone-regulating genes and prostate cancer survival." Clin Cancer Res **13**(17): 5156-5161.
- Linja, M. J., K. J. Savinainen, O. R. Saramaki, T. L. Tammela, R. L. Vessella and T. Visakorpi (2001). "Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer." Cancer Res **61**(9): 3550-3555.
- Lippman, M., M. E. Monaco and G. Bolan (1977). "Effects of estrone, estradiol, and estriol on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture." Cancer Res **37**(6): 1901-1907.
- Liu, F. S. (2007). "Molecular carcinogenesis of endometrial cancer." Taiwan J Obstet Gynecol **46**(1): 26-32.
- Liu, H., B. Wang and C. Han (2011). "Meta-analysis of genome-wide and replication association studies on prostate cancer." Prostate **71**(2): 209-224.

- Liu, Z. J., W. J. Lee and B. T. Zhu (2005). "Selective insensitivity of ZR-75-1 human breast cancer cells to 2-methoxyestradiol: evidence for type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase as the underlying cause." *Cancer Res* **65**(13): 5802-5811.
- Locke, J. A., G. Zafarana, C. A. Malloff, W. L. Lam, J. Sykes, M. Pintilie, V. R. Ramnarine, A. Meng, O. Ahmed, I. Jurisica, E. T. Guns, T. van der Kwast, M. Milosevic and R. G. Bristow (2011). "Allelic loss of the loci containing the androgen synthesis gene, StAR, is prognostic for relapse in intermediate-risk prostate cancer." *Prostate*.
- Long, J., W. Zheng, Y. B. Xiang, F. Lose, D. Thompson, I. Tomlinson, H. Yu, N. Wentzensen, D. Lambrechts, T. Dork, N. Dubrowinskaja, M. T. Goodman, H. B. Salvesen, P. A. Fasching, R. J. Scott, R. Delahanty, Y. Zheng, T. O'Mara, C. S. Healey, S. Hodgson, H. Risch, H. P. Yang, F. Amant, N. Turmanov, A. Schwake, G. Lurie, J. Trovik, M. W. Beckmann, K. Ashton, B. T. Ji, P. P. Bao, K. Howarth, L. Lu, J. Lissowska, L. Coenegrachts, D. Kaidarova, M. Durst, P. J. Thompson, C. Krakstad, A. B. Ekici, G. Otton, J. Shi, B. Zhang, M. Gorman, L. Brinton, A. Coosemans, R. K. Matsuno, M. K. Halle, A. Hein, A. Proietto, H. Cai, W. Lu, A. Dunning, D. Easton, Y. T. Gao, Q. Cai, A. B. Spurdle and X. O. Shu (2012). "Genome-Wide Association Study Identifies a Possible Susceptibility Locus for Endometrial Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
- Lu, K. H. and R. R. Broaddus (2005). "Gynecologic Cancers in Lynch Syndrome/HNPCC." *Fam Cancer* **4**(3): 249-254.
- Lubik, A. A., J. H. Gunter, S. C. Hendy, J. A. Locke, H. H. Adomat, V. Thompson, A. Herington, M. E. Gleave, M. Pollak and C. C. Nelson (2011). "Insulin increases de novo steroidogenesis in prostate cancer cells." *Cancer Res* **71**(17): 5754-5764.
- Lughezzani, G., L. Budaus, H. Isbarn, M. Sun, P. Perrotte, A. Haese, F. K. Chun, T. Schlomm, T. Steuber, H. Heinzer, H. Huland, F. Montorsi, M. Graefen and P. I. Karakiewicz (2010). "Head-to-head comparison of the three most commonly used preoperative models for prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy." *Eur Urol* **57**(4): 562-568.
- Lukanova, A., E. Lundin, A. Micheli, A. Arslan, P. Ferrari, S. Rinaldi, V. Krogh, P. Lenner, R. E. Shore, C. Biessy, P. Muti, E. Riboli, K. L. Koenig, M. Levitz, P. Stattin, F. Berrino, G. Hallmans, R. Kaaks, P. Toniolo and A. Zeleniuch-Jacquotte (2004). "Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women." *Int J Cancer* **108**(3): 425-432.
- Luu-The, V. (2001). "Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *J Steroid Biochem Mol Biol* **76**(1-5): 143-151.
- Luu-The, V., A. Belanger and F. Labrie (2008). "Androgen biosynthetic pathways in the human prostate." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22**(2): 207-221.
- Luu-The, V. and F. Labrie (2010). "The intracrine sex steroid biosynthesis pathways." *Prog Brain Res* **181**: 177-192.
- Luu-The, V., P. Tremblay and F. Labrie (2006). "Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women." *Mol Endocrinol* **20**(2): 437-443.

- Macintosh, C. A., M. Stower, N. Reid and N. J. Maitland (1998). "Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity." Cancer Res **58**(1): 23-28.
- Mahendroo, M. S., G. D. Means, C. R. Mendelson and E. R. Simpson (1991). "Tissue-specific expression of human P-450AROM. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta." J Biol Chem **266**(17): 11276-11281.
- Mahendroo, M. S., C. R. Mendelson and E. R. Simpson (1993). "Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue." J Biol Chem **268**(26): 19463-19470.
- Makridakis, N., R. K. Ross, M. C. Pike, L. Chang, F. Z. Stanczyk, L. N. Kolonel, C. Y. Shi, M. C. Yu, B. E. Henderson and J. K. Reichardt (1997). "A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase." Cancer Res **57**(6): 1020-1022.
- Makridakis, N. M., E. di Salle and J. K. Reichardt (2000). "Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 α -reductase type II." Pharmacogenetics **10**(5): 407-413.
- Marcus, D. M., M. Goodman, A. B. Jani, A. O. Osunkoya and P. J. Rossi (2012). "A comprehensive review of incidence and survival in patients with rare histological variants of prostate cancer in the United States from 1973 to 2008." Prostate Cancer Prostatic Dis.
- Markushin, Y., N. Gaikwad, H. Zhang, P. Kapke, E. G. Rogan, E. L. Cavalieri, B. J. Trock, C. Pavlovich and R. Jankowiak (2006). "Potential biomarker for early risk assessment of prostate cancer." Prostate **66**(14): 1565-1571.
- Maroulis, G. B. and G. E. Abraham (1976). "Ovarian and adrenal contributions to peripheral steroid levels in postmenopausal women." Obstet Gynecol **48**(2): 150-154.
- Matlaga, B. R., L. A. Eskew and D. L. McCullough (2003). "Prostate Biopsy: Indications and Technique." J Urol **169**.
- McAllister, S. S. and R. A. Weinberg (2010). "Tumor-host interactions: a far-reaching relationship." J Clin Oncol **28**(26): 4022-4028.
- McGrath, M., S. E. Hankinson and I. De Vivo (2007). "Cytochrome P450 1A1, cigarette smoking, and risk of endometrial cancer (United States)." Cancer Causes Control **18**(10): 1123-1130.
- McGrath, M., J. Lepine, I. M. Lee, L. Villeneuve, J. Buring, C. Guillemette and I. De Vivo (2009). "Genetic variations in UGT1A1 and UGT2B7 and endometrial cancer risk." Pharmacogenet Genomics **19**(3): 239-243.
- McGregor, J. A., G. M. Jackson, G. C. Lachelin, T. M. Goodwin, R. Artal, C. Hastings and V. Dullien (1995). "Salivary estriol as risk assessment for preterm labor: a prospective trial." Am J Obstet Gynecol **173**(4): 1337-1342.
- McPherson, S. J., S. Hussain, P. Balanathan, S. L. Hedwards, B. Niranjana, M. Grant, U. P. Chandrasiri, R. Toivanen, Y. Wang, R. A. Taylor and G. P. Risbridger (2010). "Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNF α mediated." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3123-3128.

- McPherson, S. J., H. Wang, M. E. Jones, J. Pedersen, T. P. Iismaa, N. Wreford, E. R. Simpson and G. P. Risbridger (2001). "Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland." *Endocrinology* **142**(6): 2458-2467.
- Mehra, R., B. Han, S. A. Tomlins, L. Wang, A. Menon, M. J. Wasco, R. Shen, J. E. Montie, A. M. Chinnaiyan and R. B. Shah (2007). "Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases." *Cancer Res* **67**(17): 7991-7995.
- Meilahn, E. N., B. De Stavola, D. S. Allen, I. Fentiman, H. L. Bradlow, D. W. Sepkovic and L. H. Kuller (1998). "Do urinary oestrogen metabolites predict breast cancer? Guernsey III cohort follow-up." *Br J Cancer* **78**(9): 1250-1255.
- Melamed, M., E. Castano, A. C. Notides and S. Sasson (1997). "Molecular and kinetic basis for the mixed agonist/antagonist activity of estriol." *Mol Endocrinol* **11**(12): 1868-1878.
- Mellstrom, D., L. Vandenput, H. Mallmin, A. H. Holmberg, M. Lorentzon, A. Oden, H. Johansson, E. S. Orwoll, F. Labrie, M. K. Karlsson, O. Ljunggren and C. Ohlsson (2008). "Older men with low serum estradiol and high serum SHBG have an increased risk of fractures." *J Bone Miner Res* **23**(10): 1552-1560.
- Menard, V., O. Eap, M. Harvey, C. Guillemette and E. Levesque (2009). "Copy-number variations (CNVs) of the human sex steroid metabolizing genes UGT2B17 and UGT2B28 and their associations with a UGT2B15 functional polymorphism." *Hum Mutat* **30**(9): 1310-1319.
- Mendel, C. M. (1989). "The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model." *Endocr Rev* **10**(3): 232-274.
- Merriam, G. R., N. J. MacLusky, M. K. Picard and F. Naftolin (1980). "Comparative properties of the catechol estrogens, I: methylation by catechol-O-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors." *Steroids* **36**(1): 1-11.
- Meyer, M. S., K. L. Penney, J. R. Stark, F. R. Schumacher, H. D. Sesso, M. Loda, M. Fiorentino, S. Finn, R. J. Flavin, T. Kurth, A. L. Price, E. L. Giovannucci, K. Fall, M. J. Stampfer, J. Ma and L. A. Mucci (2010). "Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression." *Carcinogenesis* **31**(9): 1597-1603.
- Midzak, A., M. Rone, Y. Aghazadeh, M. Culty and V. Papadopoulos (2011). "Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria." *Mol Cell Endocrinol* **336**(1-2): 70-79.
- Miocinovic, R., R. K. Berglund, A. J. Stephenson, J. S. Jones, A. Fergany, J. Kaouk and E. A. Klein (2011). "Avoiding androgen deprivation therapy in men with high-risk prostate cancer: the role of radical prostatectomy as initial treatment." *Urology* **77**(4): 946-950.
- Missmer, S. A., A. H. Eliassen, R. L. Barbieri and S. E. Hankinson (2004). "Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **96**(24): 1856-1865.
- Mo, Z., Y. Gao, Y. Cao, F. Gao and L. Jian (2009). "An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review." *Prostate* **69**(6): 662-688.

- Moehren, U., M. Papaioannou, C. A. Reeb, A. Grasselli, S. Nanni, M. Asim, D. Roell, I. Prade, A. Farsetti and A. Baniahmad (2008). "Wild-type but not mutant androgen receptor inhibits expression of the hTERT telomerase subunit: a novel role of AR mutation for prostate cancer development." *Faseb J* **22**(4): 1258-1267.
- Mohler, J. L., M. A. Titus, S. Bai, B. J. Kennerley, F. B. Lih, K. B. Tomer and E. M. Wilson (2011). "Activation of the androgen receptor by intratumoral bioconversion of androstenediol to dihydrotestosterone in prostate cancer." *Cancer Res* **71**(4): 1486-1496.
- Mohler, J. L., M. A. Titus and E. M. Wilson (2011). "Potential prostate cancer drug target: bioactivation of androstenediol by conversion to dihydrotestosterone." *Clin Cancer Res* **17**(18): 5844-5849.
- Montgomery, R. B., E. A. Mostaghel, R. Vessella, D. L. Hess, T. F. Kalhorn, C. S. Higano, L. D. True and P. S. Nelson (2008). "Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth." *Cancer Res* **68**(11): 4447-4454.
- Morgan, T. M., P. H. Lange, M. P. Porter, D. W. Lin, W. J. Ellis, I. S. Gallaher and R. L. Vessella (2009). "Disseminated tumor cells in prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts biochemical recurrence." *Clin Cancer Res* **15**(2): 677-683.
- Morito, K., T. Hirose, J. Kinjo, T. Hirakawa, M. Okawa, T. Nohara, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu and Y. Masamune (2001). "Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta." *Biol Pharm Bull* **24**(4): 351-356.
- Mosquera, J. M., S. Perner, E. M. Genega, M. Sanda, M. D. Hofer, K. D. Mertz, P. L. Paris, J. Simko, T. A. Bismar, G. Ayala, R. B. Shah, M. Loda and M. A. Rubin (2008). "Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications." *Clin Cancer Res* **14**(11): 3380-3385.
- Mosselman, S., J. Polman and R. Dijkema (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." *FEBS Lett* **392**(1): 49-53.
- Moulder, S. and G. N. Hortobagyi (2008). "Advances in the treatment of breast cancer." *Clin Pharmacol Ther* **83**(1): 26-36.
- Mouridsen, H., A. Giobbie-Hurder, A. Goldhirsch, B. Thurlimann, R. Paridaens, I. Smith, L. Mauriac, J. F. Forbes, K. N. Price, M. M. Regan, R. D. Gelber and A. S. Coates (2009). "Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer." *N Engl J Med* **361**(8): 766-776.
- Muti, P., H. L. Bradlow, A. Micheli, V. Krogh, J. L. Freudenheim, H. J. Schunemann, M. Stanulla, J. Yang, D. W. Sepkovic, M. Trevisan and F. Berrino (2000). "Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women." *Epidemiology* **11**(6): 635-640.
- Nadji, M., C. Gomez-Fernandez, P. Ganjei-Azar and A. R. Morales (2005). "Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers." *Am J Clin Pathol* **123**(1): 21-27.

- Nagamani, M., E. V. Hannigan, E. A. Dillard, Jr. and T. Van Dinh (1986). "Ovarian steroid secretion in postmenopausal women with and without endometrial cancer." J Clin Endocrinol Metab **62**(3): 508-512.
- Nam, R. K., Y. Elhaji, M. D. Krahn, J. Hakimi, M. Ho, W. Chu, J. Sweet, J. Trachtenberg, M. A. Jewett and S. A. Narod (2000). "Significance of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene in prostate cancer progression." J Urol **164**(2): 567-572.
- Nam, R. K., W. W. Zhang, J. Trachtenberg, A. Seth, L. H. Klotz, A. Stanimirovic, S. Punnen, V. Venkateswaran, A. Toi, D. A. Loblaw, L. Sugar, K. A. Siminovitch and S. A. Narod (2009). "Utility of incorporating genetic variants for the early detection of prostate cancer." Clin Cancer Res **15**(5): 1787-1793.
- NCBI. (2012, 12 Décembre 2009). "Aceview." Retrieved February, 2011, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>.
- NCI. (2012). "Endometrial Cancer Treatment." Retrieved April, 2012, from <https://http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/endometrial/>.
- Nielsen, M. E. and A. W. Partin (2007). "The impact of definitions of failure on the interpretation of biochemical recurrence following treatment of clinically localized prostate cancer." Rev Urol **9**(2): 57-62.
- Niloff, J. M., T. L. Klug, E. Schaetzl, V. R. Zurawski, Jr., R. C. Knapp and R. C. Bast, Jr. (1984). "Elevation of serum CA125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium, and endocervix." Am J Obstet Gynecol **148**(8): 1057-1058.
- Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2011). "Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes." Clin Pharmacol Ther **89**(1): 44-55.
- Nilsson, S., K. F. Koehler and J. A. Gustafsson (2011). "Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics." Nat Rev Drug Discov **10**(10): 778-792.
- Ntais, C., A. Polycarpou and J. P. Ioannidis (2003a). "Association of the CYP17 gene polymorphism with the risk of prostate cancer: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(2): 120-126.
- Ntais, C., A. Polycarpou and J. P. Ioannidis (2003b). "SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(7): 618-624.
- "Nuclear Receptors Nomenclature Committee." (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell **97**(2): 161-163.
- Nyholm, H. C., A. L. Nielsen, J. Lyndrup, A. Dreisler, C. Hagen and E. Haug (1993). "Plasma oestrogens in postmenopausal women with endometrial cancer." Br J Obstet Gynaecol **100**(12): 1115-1119.
- Ohsako, S., Y. Miyabara, N. Nishimura, S. Kurosawa, M. Sakaue, R. Ishimura, M. Sato, K. Takeda, Y. Aoki, H. Sone, C. Tohyama and J. Yonemoto (2001). "Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5alpha-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate." Toxicol Sci **60**(1): 132-143.
- Olschwang, S., C. Bonaiti-Pellie, J. Feingold, T. Frebourg, S. Grandjouan, C. Lasset, P. Laurent-Puig, F. Lecuru, B. Millat, H. Sobol, G. Thomas and F. Eisinger (2006). "[Identification and management of HNPPC syndrome (hereditary non polyposis

- colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas]." Pathol Biol (Paris) **54**(4): 215-229.
- Olson, S. H., I. Orlow, S. Bayuga, C. Sima, E. V. Bandera, K. Pulick, S. Faulkner, D. Tommasi, D. Egan, P. Roy, H. Wilcox, A. Asya, I. Modica, H. Asad, R. Soslow and A. G. Zauber (2008). "Variants in hormone biosynthesis genes and risk of endometrial cancer." Cancer Causes Control **19**(9): 955-963.
- Olsson, M., L. Ekstrom, C. Guillemette, A. Belanger, A. Rane and O. Gustafsson (2011). "Correlation between circulatory, local prostatic, and intra-prostatic androgen levels." Prostate.
- Olsson, M., S. Lindstrom, B. Haggkvist, H. O. Adami, K. Balter, P. Stattin, B. Ask, A. Rane, L. Ekstrom and H. Gronberg (2008). "The UGT2B17 gene deletion is not associated with prostate cancer risk." Prostate **68**(5): 571-575.
- Otto, C., I. Fuchs, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, P. Andreasen, G. Schwarz, H. Altmann, M. Klewer, M. Schoor, R. Vonk and K. H. Fritzemeier (2009). "GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice." Biol Reprod **80**(1): 34-41.
- Park, J., L. Chen, L. Ratnashinge, T. A. Sellers, J. P. Tanner, J. H. Lee, N. Dossett, N. Lang, F. F. Kadlubar, C. B. Ambrosone, B. Zachariah, R. V. Heysek, S. Patterson and J. Pow-Sang (2006). "Deletion polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 and risk of prostate cancer in African American and Caucasian men." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **15**(8): 1473-1478.
- Park, J. Y., J. P. Tanner, T. A. Sellers, Y. Huang, C. K. Stevens, N. Dossett, R. A. Shankar, B. Zachariah, R. Heysek and J. Pow-Sang (2007). "Association between polymorphisms in HSD3B1 and UGT2B17 and prostate cancer risk." Urology. **70**(2): 374-379.
- Paruthiyil, S., H. Parmar, V. Kerekatte, G. R. Cunha, G. L. Firestone and D. C. Leitman (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." Cancer Res **64**(1): 423-428.
- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, C. Blacker, M. C. Feinstein, L. Delalonde, M. Talbi and C. Maloche (1996). "Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients." J Clin Endocrinol Metab **81**(4): 1460-1464.
- Paynter, R. A., S. E. Hankinson, G. A. Colditz, P. Kraft, D. J. Hunter and I. De Vivo (2005). "CYP19 (aromatase) haplotypes and endometrial cancer risk." Int J Cancer **116**(2): 267-274.
- Pedram, A., M. Razandi, M. Aitkenhead, C. C. Hughes and E. R. Levin (2002). "Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology." J Biol Chem **277**(52): 50768-50775.
- Peltoketo, H., P. Nokelainen, Y. S. Piao, R. Vihko and P. Vihko (1999). "Two 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7." J Steroid Biochem Mol Biol **69**(1-6): 431-439.
- Peng, S. H., J. Segura, M. Farre and X. de la Torre (2000). "Oral testosterone administration detected by testosterone glucuronidation measured in blood spots dried on filter paper." Clin Chem **46**(4): 515-522.

- Peng, S. H., J. Segura, M. Farre, J. C. Gonzalez and X. de la Torre (2002). "Plasma and urinary markers of oral testosterone undecanoate misuse." *Steroids* **67**(1): 39-50.
- Penning, T. M. (2011). "New frontiers in androgen biosynthesis and metabolism." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **17**(3): 233-239.
- Phipps, A. I., K. E. Malone, P. L. Porter, J. R. Daling and C. I. Li (2008). "Reproductive and hormonal risk factors for postmenopausal luminal, HER-2-overexpressing, and triple-negative breast cancer." *Cancer* **113**(7): 1521-1526.
- Pienta, K. J. and D. Bradley (2006). "Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer." *Clin Cancer Res* **12**(6): 1665-1671.
- Pizzagalli, F., Z. Varga, R. D. Huber, G. Folkers, P. J. Meier and M. V. St-Pierre (2003). "Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8): 3902-3912.
- Plymate, S. R., J. S. Tenover and W. J. Bremner (1989). "Circadian variation in testosterone, sex hormone-binding globulin, and calculated non-sex hormone-binding globulin bound testosterone in healthy young and elderly men." *J Androl* **10**(5): 366-371.
- Pomerantz, M. M. and M. L. Freedman (2010). "Genetics of prostate cancer risk." *Mt Sinai J Med* **77**(6): 643-654.
- Pomerantz, M. M., L. Werner, W. Xie, M. M. Regan, G. S. Lee, T. Sun, C. Evan, G. Petrozziello, M. Nakabayashi, W. K. Oh, P. W. Kantoff and M. L. Freedman (2011). "Association of prostate cancer risk Loci with disease aggressiveness and prostate cancer-specific mortality." *Cancer Prev Res (Phila)* **4**(5): 719-728.
- Potischman, N., R. N. Hoover, L. A. Brinton, P. Siiteri, J. F. Dorgan, C. A. Swanson, M. L. Berman, R. Mortel, L. B. Twiggs, R. J. Barrett, G. D. Wilbanks, V. Persky and J. R. Lurain (1996). "Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer." *J Natl Cancer Inst* **88**(16): 1127-1135.
- Powles, T. J. (2002). "Anti-oestrogenic prevention of breast cancer--the make or break point." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 787-794.
- Purohit, A., L. W. Woo and B. V. Potter (2011). "Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism." *Mol Cell Endocrinol* **340**(2): 154-160.
- Qin, F., Y. Y. Zhao, M. B. Sawyer and X. F. Li (2008). "Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of estrogen conjugates in human urine." *Anal Chem* **80**(9): 3404-3411.
- Rayter, Z. and Mansi (2008). History of breast cancer therapy. *Medical Therapy of Breast Cancer*. I. C. U. Press: 1-10.
- Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." *Science* **307**(5715): 1625-1630.
- Rheaume, E., Y. Lachance, H. F. Zhao, N. Breton, M. Dumont, Y. de Launoit, C. Trudel, V. Luu-The, J. Simard and F. Labrie (1991). "Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads." *Mol Endocrinol* **5**(8): 1147-1157.

- Rheume, E., J. Simard, Y. Morel, F. Mebarki, M. Zachmann, M. G. Forest, M. I. New and F. Labrie (1992). "Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene." *Nat Genet* **1**(4): 239-245.
- Riegman, P. H., R. J. Vlietstra, J. A. van der Korput, A. O. Brinkmann and J. Trapman (1991). "The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element." *Mol Endocrinol* **5**(12): 1921-1930.
- Rinaldi, S., H. Dechaud, C. Biessy, V. Morin-Raverot, P. Toniolo, A. Zeleniuch-Jacquotte, A. Akhmedkhanov, R. E. Shore, G. Secreto, A. Ciampi, E. Riboli and R. Kaaks (2001). "Reliability and validity of commercially available, direct radioimmunoassays for measurement of blood androgens and estrogens in postmenopausal women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(7): 757-765.
- Robbins, C. M., W. Hernandez, C. Ahaghotu, J. Bennett, G. Hoke, T. Mason, C. A. Pettaway, S. Vijayakumar, S. Weinrich, P. Furbert-Harris, G. Dunston, I. J. Powell, J. D. Carpten and R. A. Kittles (2008). "Association of HPC2/ELAC2 and RNASEL non-synonymous variants with prostate cancer risk in African American familial and sporadic cases." *Prostate* **68**(16): 1790-1797.
- Rock, C. L., S. W. Flatt, G. A. Laughlin, E. B. Gold, C. A. Thomson, L. Natarajan, L. A. Jones, B. J. Caan, M. L. Stefanick, R. A. Hajek, W. K. Al-Delaimy, F. Z. Stanczyk and J. P. Pierce (2008). "Reproductive steroid hormones and recurrence-free survival in women with a history of breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(3): 614-620.
- Roddam, A. W., N. E. Allen, P. Appleby and T. J. Key (2008). "Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies." *J Natl Cancer Inst* **100**(3): 170-183.
- Rogan, E. G., A. F. Badawi, P. D. Devanesan, J. L. Meza, J. A. Edney, W. W. West, S. M. Higginbotham and E. L. Cavalieri (2003). "Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer." *Carcinogenesis* **24**(4): 697-702.
- Rose, P. G. (1996). "Endometrial carcinoma." *N Engl J Med* **335**(9): 640-649.
- Rosner, W., R. J. Auchus, R. Azziz, P. M. Sluss and H. Raff (2007). "Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(2): 405-413.
- Ross, R. W., W. K. Oh, W. Xie, M. Pomerantz, M. Nakabayashi, O. Sartor, M. E. Taplin, M. M. Regan, P. W. Kantoff and M. Freedman (2008). "Inherited variation in the androgen pathway is associated with the efficacy of androgen-deprivation therapy in men with prostate cancer." *J Clin Oncol* **26**(6): 842-847.
- Roupret, M., V. Hupertan, E. Comperat, S. J. Drouin, V. Phe, E. Xylinas, D. Demanse, M. Sibony, F. Richard and O. Cussenot (2009). "Cross-cultural validation of a prognostic tool: example of the Kattan preoperative nomogram as a predictor of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy." *BJU Int* **104**(6): 813-817; discussion 817-818.
- Ryan, A. J., B. Susil, T. W. Jobling and M. K. Oehler (2005). "Endometrial cancer." *Cell Tissue Res* **322**(1): 53-61.
- Salam, M. T., G. Ursin, E. C. Skinner, T. Dessissa and J. K. Reichardt (2005). "Associations between polymorphisms in the steroid 5-alpha reductase type II

- (SRD5A2) gene and benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." *Urol Oncol* **23**(4): 246-253.
- Salama, S. A., M. Kamel, M. Awad, A. H. Nasser, A. Al-Hendy, S. Botting and C. Arrastia (2008). "Catecholestrogens induce oxidative stress and malignant transformation in human endometrial glandular cells: protective effect of catechol-O-methyltransferase." *Int J Cancer* **123**(6): 1246-1254.
- Salih, S. M., S. A. Salama, A. A. Fadl, M. Nagamani and A. Al-Hendy (2008). "Expression and cyclic variations of catechol-O-methyl transferase in human endometrial stroma." *Fertil Steril* **90**(3): 789-797.
- Salonia, A., A. Gallina, A. Briganti, N. Suardi, U. Capitanio, F. Abdollah, R. Bertini, M. Freschi, P. Rigatti and F. Montorsi (2011). "Circulating estradiol, but not testosterone, is a significant predictor of high-grade prostate cancer in patients undergoing radical prostatectomy." *Cancer* **117**(22): 5029-5038.
- Sarkar, M. A., V. Vadlamuri, S. Ghosh and D. D. Glover (2003). "Expression and cyclic variability of CYP3A4 and CYP3A7 isoforms in human endometrium and cervix during the menstrual cycle." *Drug Metab Dispos* **31**(1): 1-6.
- Sartori, E., B. Pasinetti, F. Chiudinelli, A. Gadducci, F. Landoni, T. Maggino, E. Piovano and P. Zola (2010). "Surveillance procedures for patients treated for endometrial cancer: a review of the literature." *Int J Gynecol Cancer* **20**(6): 985-992.
- Sasaki, M., M. Kaneuchi, N. Sakuragi and R. Dahiya (2003). "Multiple promoters of catechol-O-methyltransferase gene are selectively inactivated by CpG hypermethylation in endometrial cancer." *Cancer Res* **63**(12): 3101-3106.
- Sasaki, M., H. Suzuki, K. Ito, T. Abe and Y. Sugiyama (2002). "Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2)." *J Biol Chem* **277**(8): 6497-6503.
- Schiewer, M. J., M. A. Augello and K. E. Knudsen (2012). "The AR dependent cell cycle: Mechanisms and cancer relevance." *Mol Cell Endocrinol* **16**(352): 34-45.
- Schutze, N., G. Vollmer, I. Tiemann, M. Geiger and R. Knuppen (1993). "Catecholestrogens are MCF-7 cell estrogen receptor agonists." *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**(6): 781-789.
- Schutze, N., G. Vollmer, W. Wunsche, A. Grote, B. Feit and R. Knuppen (1994). "Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to the estrogen receptor of MCF-7 cells in cytosolic extracts and in nuclei of intact cells." *Exp Clin Endocrinol* **102**(5): 399-408.
- Scosyrev, E., E. M. Messing, S. Mohile, D. Golijanin and G. Wu (2011). "Prostate cancer in the elderly: Frequency of advanced disease at presentation and disease-specific mortality." *Cancer*.
- Sebastianelli, A., M. C. Renaud, J. Gregoire, M. Roy and M. Plante (2010). "Preoperative CA 125 tumour marker in endometrial cancer: correlation with advanced stage disease." *J Obstet Gynaecol Can* **32**(9): 856-860.
- Setiawan, V. W., F. R. Schumacher, C. A. Haiman, D. O. Stram, D. Albanes, D. Altshuler, G. Berglund, J. Buring, E. E. Calle, F. Clavel-Chapelon, D. G. Cox, J. M. Gaziano, S. E. Hankinson, R. B. Hayes, B. E. Henderson, J. Hirschhorn, R. Hoover, D. J.

- Hunter, R. Kaaks, L. N. Kolonel, P. Kraft, J. Ma, L. Le Marchand, J. Linseisen, E. Lund, C. Navarro, K. Overvad, D. Palli, P. H. Peeters, M. C. Pike, E. Riboli, M. J. Stampfer, M. J. Thun, R. Travis, D. Trichopoulos, M. Yeager, R. G. Ziegler, H. Spencer Feigelson and S. J. Chanock (2007). "CYP17 genetic variation and risk of breast and prostate cancer from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3)." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(11): 2237-2246.
- Setlur, S. R., C. X. Chen, R. R. Hossain, J. S. Ha, V. E. Van Doren, B. Stenzel, E. Steiner, D. Oldridge, N. Kitabayashi, S. Banerjee, J. Y. Chen, G. Schafer, W. Horninger, C. Lee, M. A. Rubin, H. Klocker and F. Demichelis (2010). "Genetic variation of genes involved in dihydrotestosterone metabolism and the risk of prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 229-239.
- Shabani, N., C. Kuhn, S. Kunze, S. Schulze, D. Mayr, D. Dian, A. Gingelmaier, C. Schindlbeck, F. Willgeroth, H. Sommer, U. Jeschke, K. Friese and I. Mylonas (2007). "Prognostic significance of oestrogen receptor alpha (ERalpha) and beta (ERbeta), progesterone receptor A (PR-A) and B (PR-B) in endometrial carcinomas." Eur J Cancer **43**(16): 2434-2444.
- Shang, Y. and M. Brown (2002). "Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs." Science **295**(5564): 2465-2468.
- Sharifi, N., J. L. Gulley and W. L. Dahut (2010). "An update on androgen deprivation therapy for prostate cancer." Endocr Relat Cancer **17**(4): R305-315.
- Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." Genes Dev **24**(18): 1967-2000.
- Shen, Z., T. Saloniemi, A. Ronnblad, P. Jarvensivu, P. Pakarinen and M. Poutanen (2009). "Sex steroid-dependent and -independent action of hydroxysteroid (17beta) Dehydrogenase 2: evidence from transgenic female mice." Endocrinology **150**(11): 4941-4949.
- Sherman, M. E. (2000). "Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach." Mod Pathol **13**(3): 295-308.
- Sherman, M. E., S. Sturgeon, L. A. Brinton, N. Potischman, R. J. Kurman, M. L. Berman, R. Mortel, L. B. Twiggs, R. J. Barrett and G. D. Wilbanks (1997). "Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas." Mod Pathol **10**(10): 963-968.
- Shibata, A., M. I. Garcia, I. Cheng, T. A. Stamey, J. E. McNeal, J. D. Brooks, S. Henderson, C. E. Yemoto and D. M. Peehl (2002). "Polymorphisms in the androgen receptor and type II 5 alpha-reductase genes and prostate cancer prognosis." Prostate **52**(4): 269-278.
- Shiota, M., A. Yokomizo and S. Naito (2011). "Increased androgen receptor transcription: a cause of castration-resistant prostate cancer and a possible therapeutic target." J Mol Endocrinol **47**(1): R25-41.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **62**(1): 10-29.
- Siegel, R., E. Ward, O. Brawley and A. Jemal (2011). "Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths." CA Cancer J Clin **61**(4): 212-236.

- Simard, J., M. L. Ricketts, A. M. Moisan, V. Tardy, M. Peter, G. Van Vliet and Y. Morel (2000). "A new insight into the molecular basis of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency." *Endocr Res* **26**(4): 761-770.
- Singh, M. N., H. F. Stringfellow, M. J. Walsh, K. M. Ashton, E. Paraskevaïdis, K. R. Abdo, P. L. Martin-Hirsch, D. H. Phillips and F. L. Martin (2008). "Quantifiable mRNA transcripts for tamoxifen-metabolising enzymes in human endometrium." *Toxicology* **249**(1): 85-90.
- Singh, S., D. Chakravarti, J. A. Edney, R. R. Hollins, P. J. Johnson, W. W. West, S. M. Higginbotham, E. L. Cavalieri and E. G. Rogan (2005). "Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma." *Oncol Rep* **14**(4): 1091-1096.
- Sinicco, A., R. Raiteri, A. Rossati, A. Savarino and G. Di Perri (2000). "Efavirenz interference in estradiol ELISA assay." *Clin Chem* **46**(5): 734-735.
- Sinnesael, M., S. Boonen, F. Claessens, E. Gielen and D. Vanderschueren (2011). "Testosterone and the male skeleton: a dual mode of action." *J Osteoporos* **2011**: 240328.
- Sircar, K., M. Yoshimoto, F. A. Monzon, I. H. Koumakpayi, R. L. Katz, A. Khanna, K. Alvarez, G. Chen, A. D. Darnel, A. G. Aprikian, F. Saad, T. A. Bismar and J. A. Squire (2009). "PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer." *J Pathol* **218**(4): 505-513.
- Sivridis, E. and A. Giatromanolaki (2001). "Prognostic aspects on endometrial hyperplasia and neoplasia." *Virchows Arch* **439**(2): 118-126.
- Sivridis, E. and A. Giatromanolaki (2011). "The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures." *J Clin Pathol* **64**(7): 553-560.
- Sivridis, E., A. Giatromanolaki, M. Koukourakis and P. Anastasiadis (2001). "Endometrial carcinoma: association of steroid hormone receptor expression with low angiogenesis and bcl-2 expression." *Virchows Arch* **438**(5): 470-477.
- Sjoberg, B., B. de la Torre, M. Hedman, G. Falkay and E. Diczfalusy (1979). "Circadian variation in systemic hormone levels in healthy men." *J Endocrinol Invest* **2**(2): 131-137.
- Sluijmer, A. V., M. J. Heineman, F. H. De Jong and J. L. Evers (1995). "Endocrine activity of the postmenopausal ovary: the effects of pituitary down-regulation and oophorectomy." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(7): 2163-2167.
- Smith, H. O., K. K. Leslie, M. Singh, C. R. Qualls, C. M. Revankar, N. E. Joste and E. R. Prossnitz (2007). "GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma." *Am J Obstet Gynecol* **196**(4): 386 e381-389; discussion 386 e389-311.
- Smith, J. R., D. Freije, J. D. Carpten, H. Gronberg, J. Xu, S. D. Isaacs, M. J. Brownstein, G. S. Bova, H. Guo, P. Bujnovszky, D. R. Nusskern, J. E. Damber, A. Bergh, M. Emanuelsson, O. P. Kallioniemi, J. Walker-Daniels, J. E. Bailey-Wilson, T. H. Beaty, D. A. Meyers, P. C. Walsh, F. S. Collins, J. M. Trent and W. B. Isaacs (1996). "Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search." *Science* **274**(5291): 1371-1374.
- Société canadienne du cancer* (2011).
- Spurdle, A. B., D. J. Thompson, S. Ahmed, K. Ferguson, C. S. Healey, T. O'Mara, L. C. Walker, S. B. Montgomery, E. T. Dermitzakis, P. Fahey, G. W. Montgomery, P. M.

- Webb, P. A. Fasching, M. W. Beckmann, A. B. Ekici, A. Hein, D. Lambrechts, L. Coenegrachts, I. Vergote, F. Amant, H. B. Salvesen, J. Trovik, T. S. Njolstad, H. Helland, R. J. Scott, K. Ashton, T. Proietto, G. Otton, I. Tomlinson, M. Gorman, K. Howarth, S. Hodgson, M. Garcia-Closas, N. Wentzensen, H. Yang, S. Chanock, P. Hall, K. Czene, J. Liu, J. Li, X. O. Shu, W. Zheng, J. Long, Y. B. Xiang, M. Shah, J. Morrison, K. Michailidou, P. D. Pharoah, A. M. Dunning and D. F. Easton (2011). "Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer." Nat Genet **43**(5): 451-454.
- Stamey, T. A., N. Yang, A. R. Hay, J. E. McNeal, F. S. Freiha and E. Redwine (1987). "Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate." N Engl J Med **317**(15): 909-916.
- Stanbrough, M., G. J. Bubley, K. Ross, T. R. Golub, M. A. Rubin, T. M. Penning, P. G. Febbo and S. P. Balk (2006). "Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer." Cancer Res. **66**(5): 2815-2825.
- Stanczyk, F. Z., J. S. Lee and R. J. Santen (2007). "Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1713-1719.
- Stanczyk, F. Z., I. Miyakawa and U. Goebelsmann (1980). "Direct radioimmunoassay of urinary estrogen and pregnanediol glucuronides during the menstrual cycle." Am J Obstet Gynecol **137**(4): 443-450.
- Starlard-Davenport, A., B. Lyn-Cook and A. Radomska-Pandya (2008). "Identification of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 in non-malignant and malignant human breast tissues." Steroids **73**(6): 611-620.
- Starlard-Davenport, A., Y. Xiong, S. Bratton, A. Gallus-Zawada, M. Finel and A. Radomska-Pandya (2007). "Phenylalanine(90) and phenylalanine(93) are crucial amino acids within the estrogen binding site of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A10." Steroids **72**(1): 85-94.
- Sten, T., I. Bichlmaier, T. Kuuranne, A. Leinonen, J. Yli-Kauhaluoma and M. Finel (2009). "UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and UGT2B17 display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly." Drug Metab Dispos **37**(2): 417-423.
- Sten, T., M. Kurkela, T. Kuuranne, A. Leinonen and M. Finel (2009). "UDP-glucuronosyltransferases in conjugation of 5alpha- and 5beta-androstane steroids." Drug Metab Dispos **37**(11): 2221-2227.
- Stener-Victorin, E., G. Holm, F. Labrie, L. Nilsson, P. O. Janson and C. Ohlsson (2010). "Are there any sensitive and specific sex steroid markers for polycystic ovary syndrome?" J Clin Endocrinol Metab **95**(2): 810-819.
- Stephens, M., N. J. Smith and P. Donnelly (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." Am J Hum Genet. **68**(4): 978-989.
- Stephenson, A. J., P. T. Scardino, J. A. Eastham, F. J. Bianco, Jr., Z. A. Dotan, C. J. DiBlasio, A. Reuther, E. A. Klein and M. W. Kattan (2005). "Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy." J Clin Oncol **23**(28): 7005-7012.

- Stephenson, A. J., P. T. Scardino, J. A. Eastham, F. J. Bianco, Jr., Z. A. Dotan, P. A. Fearn and M. W. Kattan (2006). "Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy." J Natl Cancer Inst **98**(10): 715-717.
- Strom, S. S., Y. Gu, H. Zhang, P. Troncoso, R. J. Babaian, C. A. Pettaway, S. Shete, M. R. Spitz and C. J. Logothetis (2004). "Androgen receptor polymorphisms and risk of biochemical failure among prostatectomy patients." Prostate **60**(4): 343-351.
- Strope, S. A. and G. L. Andriole (2010). "Prostate cancer screening: current status and future perspectives." Nat Rev Urol **7**(9): 487-493.
- Sugimoto, Y., I. Lopez-Solache, F. Labrie and V. Luu-The (1995). "Cations inhibit specifically type I 5 alpha-reductase found in human skin." J Invest Dermatol **104**(5): 775-778.
- Sun, J., S. L. Zheng, F. Wiklund, S. D. Isaacs, L. D. Purcell, Z. Gao, F. C. Hsu, S. T. Kim, W. Liu, Y. Zhu, P. Stattin, H. O. Adami, K. E. Wiley, L. Dimitrov, T. Li, A. R. Turner, T. S. Adams, J. Adolfsson, J. E. Johansson, J. Lowey, B. J. Trock, A. W. Partin, P. C. Walsh, J. M. Trent, D. Duggan, J. Carpten, B. L. Chang, H. Gronberg, W. B. Isaacs and J. Xu (2008). "Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12." Nat Genet **40**(10): 1153-1155.
- Sun, T., W. K. Oh, S. Jacobus, M. Regan, M. Pomerantz, M. L. Freedman, G. S. Lee and P. W. Kantoff (2011). "The impact of common genetic variations in genes of the sex hormone metabolic pathways on steroid hormone levels and prostate cancer aggressiveness." Cancer Prev Res (Phila) **4**(12): 2044-2050.
- Suzuki, K., H. Nakazato, H. Matsui, H. Koike, H. Okugi, N. Ohtake, T. Takei, S. Nakata, M. Hasumi and H. Yamanaka (2003). "Association of the genetic polymorphism of the CYP19 intron 4[TTTA]_n repeat with familial prostate cancer risk in a Japanese population." Anticancer Res **23**(6D): 4941-4946.
- Suzuki, M., H. Suzuki, Y. Sugimoto and Y. Sugiyama (2003). "ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics." J Biol Chem **278**(25): 22644-22649.
- Suzuki, T., Y. Miki, Y. Nakamura, K. Ito and H. Sasano (2011). "Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas." Mol Cell Endocrinol **340**(2): 148-153.
- Swaneck, G. E. and J. Fishman (1988). "Covalent binding of the endogenous estrogen 16 alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 7831-7835.
- Swanson, C., D. Mellstrom, M. Lorentzon, L. Vandenput, J. Jakobsson, A. Rane, M. Karlsson, O. Ljunggren, U. Smith, A. L. Eriksson, A. Belanger, F. Labrie and C. Ohlsson (2007). "The uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B15 D85Y and 2B17 deletion polymorphisms predict the glucuronidation pattern of androgens and fat mass in men." J Clin Endocrinol Metab **92**(12): 4878-4882.
- Swanson, G. P., C. Yu, M. W. Kattan and M. R. Hermans (2011). "Validation of Postoperative Nomograms in Prostate Cancer Patients with Long-term Follow-up." Urology.

- Szulkin, R., E. Holmberg, P. Stattin, J. Xu, S. Zheng, J. Palmgren, H. Gronberg and F. Wiklund (2012). "Prostate cancer risk variants are not associated with disease progression." *Prostate* **72**(1): 30-39.
- Szylo, K., B. Smolarz, H. Romanowicz-Makowska and A. Kulig (2006). "The polymorphisms of the CYP17 and CYP19 genes in endometrial cancer patients." *Pol J Pathol* **57**(1): 35-40.
- Szymczak, J., A. Milewicz, J. H. Thijssen, M. A. Blankenstein and J. Daroszewski (1998). "Concentration of sex steroids in adipose tissue after menopause." *Steroids* **63**(5-6): 319-321.
- Takahashi, M., T. Shimomoto, K. Miyajima, M. Yoshida, S. Katashima, F. Uematsu, A. Maekawa and D. Nakae (2004). "Effects of estrogens and metabolites on endometrial carcinogenesis in young adult mice initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine." *Cancer Lett* **211**(1): 1-9.
- Talantov, D., T. A. Jatkoe, M. Bohm, Y. Zhang, A. M. Ferguson, P. D. Stricker, M. W. Kattan, R. L. Sutherland, J. G. Kench, Y. Wang and S. M. Henshall (2010). "Gene based prediction of clinically localized prostate cancer progression after radical prostatectomy." *J Urol* **184**(4): 1521-1528.
- Tamimi, R. M., C. Byrne, G. A. Colditz and S. E. Hankinson (2007). "Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **99**(15): 1178-1187.
- Tan, J., Y. Sharief, K. G. Hamil, C. W. Gregory, D. Y. Zang, M. Sar, P. H. Gumerlock, R. W. deVere White, T. G. Pretlow, S. E. Harris, E. M. Wilson, J. L. Mohler and F. S. French (1997). "Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells." *Mol Endocrinol* **11**(4): 450-459.
- Tavtigian, S. V., J. Simard, D. H. Teng, V. Abtin, M. Baumgard, A. Beck, N. J. Camp, A. R. Carillo, Y. Chen, P. Dayananth, M. Desrochers, M. Dumont, J. M. Farnham, D. Frank, C. Frye, S. Ghaffari, J. S. Gupte, R. Hu, D. Iliev, T. Janecki, E. N. Kort, K. E. Laity, A. Leavitt, G. Leblanc, J. McArthur-Morrison, A. Pederson, B. Penn, K. T. Peterson, J. E. Reid, S. Richards, M. Schroeder, R. Smith, S. C. Snyder, B. Swedlund, J. Swensen, A. Thomas, M. Tranchant, A. M. Woodland, F. Labrie, M. H. Skolnick, S. Neuhausen, J. Rommens and L. A. Cannon-Albright (2001). "A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p." *Nat Genet* **27**(2): 172-180.
- Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers and W. L. Gerald (2010). "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." *Cancer Cell* **18**(1): 11-22.
- Tee, M. K., I. Rogatsky, C. Tzagarakis-Foster, A. Cvorov, J. An, R. J. Christy, K. R. Yamamoto and D. C. Leitman (2004). "Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta." *Mol Biol Cell* **15**(3): 1262-1272.

- Telang, N. T., A. Suto, G. Y. Wong, M. P. Osborne and H. L. Bradlow (1992). "Induction by estrogen metabolite 16 alpha-hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells." J Natl Cancer Inst **84**(8): 634-638.
- Teng, C. T., Y. Liu, N. Yang, D. Walmer and T. Panella (1992). "Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse." Mol Endocrinol **6**(11): 1969-1981.
- Terry, K., M. McGrath, I. M. Lee, J. Buring and I. De Vivo (2010). "Genetic variation in CYP11A1 and StAR in relation to endometrial cancer risk." Gynecol Oncol **117**(2): 255-259.
- Theoret, M. R., Y. M. Ning, J. J. Zhang, R. Justice, P. Keegan and R. Pazdur (2011). "The risks and benefits of 5alpha-reductase inhibitors for prostate-cancer prevention." N Engl J Med **365**(2): 97-99.
- Thibaudeau, J., J. Lepine, J. Tojcic, Y. Duguay, G. Pelletier, M. Plante, J. Brisson, B. Tetu, S. Jacob, L. Perusse, A. Belanger and C. Guillemette (2006). "Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone." Cancer Res **66**(1): 125-133.
- Thin, T. H., L. Wang, E. Kim, L. L. Collins, R. Basavappa and C. Chang (2003). "Isolation and characterization of androgen receptor mutant, AR(M749L), with hypersensitivity to 17-beta estradiol treatment." J Biol Chem **278**(9): 7699-7708.
- Thomas, G., K. B. Jacobs, M. Yeager, P. Kraft, S. Wacholder, N. Orr, K. Yu, N. Chatterjee, R. Welch, A. Hutchinson, A. Crenshaw, G. Cancel-Tassin, B. J. Staats, Z. Wang, J. Gonzalez-Bosquet, J. Fang, X. Deng, S. I. Berndt, E. E. Calle, H. S. Feigelson, M. J. Thun, C. Rodriguez, D. Albanes, J. Virtamo, S. Weinstein, F. R. Schumacher, E. Giovannucci, W. C. Willett, O. Cussenot, A. Valeri, G. L. Andriole, E. D. Crawford, M. Tucker, D. S. Gerhard, J. F. Fraumeni, Jr., R. Hoover, R. B. Hayes, D. J. Hunter and S. J. Chanock (2008). "Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer." Nat Genet **40**(3): 310-315.
- Thomas, L. N., C. B. Lazier, R. Gupta, R. W. Norman, D. A. Troyer, S. P. O'Brien and R. S. Rittmaster (2005). "Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer." Prostate **63**(3): 231-239.
- Thomas, M. A., D. M. Preece and J. M. Bentel (2010). "Androgen regulation of the prostatic tumour suppressor NKX3.1 is mediated by its 3' untranslated region." Biochem J **425**(3): 575-583.
- Thomas, P., Y. Pang, E. J. Filardo and J. Dong (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." Endocrinology **146**(2): 624-632.
- Thompson, E. A., Jr. and P. K. Siiteri (1974a). "The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization." J Biol Chem **249**(17): 5373-5378.
- Thompson, E. A., Jr. and P. K. Siiteri (1974b). "Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione." J Biol Chem **249**(17): 5364-5372.

- Thompson, I., J. B. Thrasher, G. Aus, A. L. Burnett, E. D. Canby-Hagino, M. S. Cookson, A. V. D'Amico, R. R. Dmochowski, D. T. Eton, J. D. Forman, S. L. Goldenberg, J. Hernandez, C. S. Higano, S. R. Kraus, J. W. Moul and C. M. Tangen (2007). "Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update." *J Urol* **177**(6): 2106-2131.
- Thompson, I. M., P. J. Goodman, C. M. Tangen, M. S. Lucia, G. J. Miller, L. G. Ford, M. M. Lieber, R. D. Cespedes, J. N. Atkins, S. M. Lippman, S. M. Carlin, A. Ryan, C. M. Szczepanek, J. J. Crowley and C. A. Coltman, Jr. (2003). "The influence of finasteride on the development of prostate cancer." *N Engl J Med* **349**(3): 215-224.
- Thorisson, G. A., A. V. Smith, L. Krishnan and L. D. Stein (2005). "The International HapMap Project Web site." *Genome Res* **15**(11): 1592-1593.
- Thurlimann, B., A. Keshaviah, A. S. Coates, H. Mouridsen, L. Mauriac, J. F. Forbes, R. Paridaens, M. Castiglione-Gertsch, R. D. Gelber, M. Rabaglio, I. Smith, A. Wardley, K. N. Price and A. Goldhirsch (2005). "A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer." *N Engl J Med* **353**(26): 2747-2757.
- Tilson-Mallett, N., S. J. Santner, P. D. Feil and R. J. Santen (1983). "Biological significance of aromatase activity in human breast tumors." *J Clin Endocrinol Metab* **57**(6): 1125-1128.
- Titus, M. A., C. W. Gregory, O. H. Ford, 3rd, M. J. Schell, S. J. Maygarden and J. L. Mohler (2005). "Steroid 5alpha-reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer." *Clin Cancer Res* **11**(12): 4365-4371.
- Toft, D. and J. Gorski (1966). "A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(6): 1574-1581.
- Tok, E. C., D. Ertunc, U. Oz, H. Camdeviren, G. Ozdemir and S. Dilek (2004). "The effect of circulating androgens on bone mineral density in postmenopausal women." *Maturitas* **48**(3): 235-242.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X. W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan (2005). "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." *Science* **310**(5748): 644-648.
- Torring, N., M. Borre, K. D. Sorensen, C. L. Andersen, C. Wiuf and T. F. Orntoft (2007). "Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array." *Br J Cancer* **96**(3): 499-506.
- Tsuchiya, N., L. Wang, H. Suzuki, T. Segawa, H. Fukuda, S. Narita, M. Shimbo, T. Kamoto, K. Mitsumori, T. Ichikawa, O. Ogawa, A. Nakamura and T. Habuchi (2006). "Impact of IGF-I and CYP19 gene polymorphisms on the survival of patients with metastatic prostate cancer." *J Clin Oncol* **24**(13): 1982-1989.
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, S. Kyo, T. Kanaya, M. Inoue and T. Yokoi (2004). "Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor." *Cancer Res* **64**(9): 3119-3125.
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima and T. Yokoi (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." *Cancer Lett* **227**(2): 115-124.

- Turgeon, D., J. S. Carrier, S. Chouinard and A. Belanger (2003). "Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics." *Drug Metab Dispos* **31**(5): 670-676.
- Tworoger, S. S., B. A. Rosner, W. C. Willett and S. E. Hankinson (2011). "The combined influence of multiple sex and growth hormones on risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study." *Breast Cancer Res* **13**(5): R99.
- UpToDate®. (2012). "Prostate biopsy." Retrieved 15 mars 2012, from http://www.uptodate.com/contents/prostate-biopsy?source=search_result&search=prostate+zone&selectedTitle=6~150.
- Ursin, G., S. London, F. Z. Stanczyk, E. Gentschein, A. Paganini-Hill, R. K. Ross and M. C. Pike (1999). "Urinary 2-hydroxyestrone/16alpha-hydroxyestrone ratio and risk of breast cancer in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **91**(12): 1067-1072.
- Uzan, C., S. Gouy, P. Pautier, C. Lhomme, P. Duvillard, C. Haie-Meder and P. Morice (2012). "French recommendations for endometrial cancer 2010: clinical use and questions still debated." *Bull Cancer*.
- Vaclavikova, R., M. Hubackova, J. Stribrna-Sarmanova, R. Kodet, M. Mrhalova, J. Novotny, I. Gut and P. Soucek (2007). "RNA expression of cytochrome P450 in breast cancer patients." *Anticancer Res* **27**(6C): 4443-4450.
- Vadlamuri, S. V., D. D. Glover, T. Turner and M. A. Sarkar (1998). "Regiospecific expression of cytochrome P4501A1 and 1B1 in human uterine tissue." *Cancer Lett* **122**(1-2): 143-150.
- van der Sluis, T. M., A. N. Vis, R. J. van Moorselaar, H. N. Bui, M. A. Blankenstein, E. J. Meuleman and A. C. Heijboer (2011). "Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part I: concentrations and methods of determination in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." *BJU Int*.
- van Hanegem, N., M. C. Breijer, B. C. Opmeer, B. W. Mol and A. Timmermans (2012). "Prediction models in women with postmenopausal bleeding: a systematic review." *Womens Health (Lond Engl)* **8**(3): 251-262.
- Vandenput, L., F. Labrie, D. Mellstrom, C. Swanson, T. Knutsson, R. Pecker, O. Ljunggren, E. Orwoll, A. L. Eriksson, J. E. Damber and C. Ohlsson (2007). "Serum levels of specific glucuronidated androgen metabolites predict BMD and prostate volume in elderly men." *J Bone Miner Res* **22**(2): 220-227.
- Vandenput, L., D. Mellstrom, M. K. Karlsson, E. Orwoll, F. Labrie, O. Ljunggren and C. Ohlsson (2010). "Serum estradiol is associated with lean mass in elderly Swedish men." *Eur J Endocrinol* **162**(4): 737-745.
- Vandenput, L., D. Mellstrom, M. Lorentzon, C. Swanson, M. K. Karlsson, J. Brandberg, L. Lonn, E. Orwoll, U. Smith, F. Labrie, O. Ljunggren, A. Tivesten and C. Ohlsson (2007). "Androgens and glucuronidated androgen metabolites are associated with metabolic risk factors in men." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(11): 4130-4137.
- Vermeulen-Meiners, C., L. J. Jaszmann, A. A. Haspels, J. Poortman and J. H. Thijssen (1984). "The endogenous concentration of estradiol and estrone in normal human postmenopausal endometrium." *J Steroid Biochem* **21**(5): 607-612.
- Vermeulen-Meiners, C., J. Poortman, A. A. Haspels and J. H. Thijssen (1986). "The endogenous concentration of estradiol and estrone in pathological human postmenopausal endometrium." *J Steroid Biochem* **24**(5): 1073-1078.

- Vermeulen, A., J. M. Kaufman, S. Goemaere and I. van Pottelberg (2002). "Estradiol in elderly men." *Aging Male* **5**(2): 98-102.
- Vermeulen, A., L. Verdonck and J. M. Kaufman (1999). "A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(10): 3666-3672.
- Verreault, M., J. Kaeding, P. Caron, J. Trottier, L. Grosse, E. Houssin, S. Paquet, M. Perreault and O. Barbier (2010). "Regulation of endobiotics glucuronidation by ligand-activated transcription factors: physiological function and therapeutic potential." *Drug Metab Rev* **42**(1): 110-122.
- Vihko, P., A. Herrala, P. Harkonen, V. Isomaa, H. Kaija, R. Kurkela and A. Pulkka (2006). "Control of cell proliferation by steroids: the role of 17HSDs." *Mol Cell Endocrinol* **248**(1-2): 141-148.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." *Trends Genet* **9**(4): 138-141.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med* **10**(8): 789-799.
- Voigt, L. F., N. S. Weiss, J. Chu, J. R. Daling, B. McKnight and G. van Belle (1991). "Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer." *Lancet* **338**(8762): 274-277.
- Walton, M. J., R. A. Anderson, A. T. Kicman, R. A. Elton, K. Ossowska and D. T. Baird (2007). "A diurnal variation in testicular hormone production is maintained following gonadotrophin suppression in normal men." *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**(1): 123-129.
- Wang, F. B., X. Q. Yang, S. Yang, B. C. Wang, M. H. Feng and J. C. Tu (2011). "A Higher Number of Circulating Tumor Cells (CTC) in Peripheral Blood Indicates Poor Prognosis in Prostate Cancer Patients - A Meta-analysis." *Asian Pac J Cancer Prev* **12**(10): 2629-2635.
- Wang, X. W., Y. L. Chen, Y. L. Luo and Q. Y. Liu (2011). "No association between the CYP1B1 C4326G polymorphism and endometrial cancer risk: a meta-analysis." *Asian Pac J Cancer Prev* **12**(9): 2343-2348.
- Wang, Y., T. Romigh, X. He, M. H. Tan, M. S. Orloff, R. H. Silverman, W. D. Heston and C. Eng (2011). "Differential regulation of PTEN expression by androgen receptor in prostate and breast cancers." *Oncogene* **30**(42): 4327-4338.
- Watson, P. A., Y. F. Chen, M. D. Balbas, J. Wongvipat, N. D. Socci, A. Viale, K. Kim and C. L. Sawyers (2010). "Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(39): 16759-16765.
- Weckermann, D., B. Polzer, T. Ragg, A. Blana, G. Schlimok, H. Arnholdt, S. Bertz, R. Harzmann and C. A. Klein (2009). "Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer." *J Clin Oncol* **27**(10): 1549-1556.
- Weiderpass, E., H. O. Adami, J. A. Baron, C. Magnusson, R. Bergstrom, A. Lindgren, N. Correia and I. Persson (1999). "Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins." *J Natl Cancer Inst* **91**(13): 1131-1137.

- Weiss, J. M., W. Y. Huang, S. Rinaldi, T. R. Fears, N. Chatterjee, A. W. Hsing, E. D. Crawford, G. L. Andriole, R. Kaaks and R. B. Hayes (2008). "Endogenous sex hormones and the risk of prostate cancer: a prospective study." Int J Cancer **122**(10): 2345-2350.
- Welch, H. G. and W. C. Black (2010). "Overdiagnosis in cancer." J Natl Cancer Inst **102**(9): 605-613.
- Wen, W., Z. Ren, X. O. Shu, Q. Cai, C. Ye, Y. T. Gao and W. Zheng (2007). "Expression of cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase in breast tissue and their associations with breast cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(5): 917-920.
- Westerlind, K. C., K. J. Gibson, P. Malone, G. L. Evans and R. T. Turner (1998). "Differential effects of estrogen metabolites on bone and reproductive tissues of ovariectomized rats." J Bone Miner Res **13**(6): 1023-1031.
- Whitman, E. J., M. Pomerantz, Y. Chen, M. M. Chamberlin, B. Furusato, C. Gao, A. Ali, L. Ravindranath, A. Dobi, I. A. Sesterhenn, D. G. McLeod, S. Srivastava, M. Freedman and G. Petrovics (2010). "Prostate cancer risk allele specific for African descent associates with pathologic stage at prostatectomy." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 1-8.
- Wiklund, F. E., H. O. Adami, S. L. Zheng, P. Stattin, W. B. Isaacs, H. Gronberg and J. Xu (2009). "Established prostate cancer susceptibility variants are not associated with disease outcome." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(5): 1659-1662.
- Wolf, A. M., R. C. Wender, R. B. Etzioni, I. M. Thompson, A. V. D'Amico, R. J. Volk, D. D. Brooks, C. Dash, I. Guessous, K. Andrews, C. DeSantis and R. A. Smith (2010). "American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010." CA Cancer J Clin **60**(2): 70-98.
- Wright, J. L., E. M. Kwon, D. W. Lin, S. Kolb, J. S. Koopmeiners, Z. Feng, E. A. Ostrander and J. L. Stanford (2010). "CYP17 polymorphisms and prostate cancer outcomes." Prostate **70**(10): 1094-1101.
- Wright, J. L., E. M. Kwon, E. A. Ostrander, R. B. Montgomery, D. W. Lin, R. Vessella, J. L. Stanford and E. A. Mostaghel (2011). "Expression of SLCO transport genes in castration-resistant prostate cancer and impact of genetic variation in SLCO1B3 and SLCO2B1 on prostate cancer outcomes." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **20**(4): 619-627.
- Wu, L., M. Einstein, W. M. Geissler, H. K. Chan, K. O. Elliston and S. Andersson (1993). "Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity." J Biol Chem **268**(17): 12964-12969.
- Xie, C. C., L. Lu, J. Sun, S. L. Zheng, W. B. Isaacs, H. Gronberg and J. Xu (2011). "Germline sequence variants of PTEN do not have an important role in hereditary and non-hereditary prostate cancer susceptibility." J Hum Genet **56**(7): 496-502.
- Xu, B., N. Tong, J. M. Li, Z. D. Zhang and H. F. Wu (2010). "ELAC2 polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis based on 18 case-control studies." Prostate Cancer Prostatic Dis **13**(3): 270-277.
- Xu, J., S. L. Zheng, A. Komiya, J. C. Mychaleckyj, S. D. Isaacs, J. J. Hu, D. Sterling, E. M. Lange, G. A. Hawkins, A. Turner, C. M. Ewing, D. A. Faith, J. R. Johnson, H.

- Suzuki, P. Bujnovszky, K. E. Wiley, A. M. DeMarzo, G. S. Bova, B. Chang, M. C. Hall, D. L. McCullough, A. W. Partin, V. S. Kassabian, J. D. Carpten, J. E. Bailey-Wilson, J. M. Trent, J. Ohar, E. R. Bleecker, P. C. Walsh, W. B. Isaacs and D. A. Meyers (2002). "Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk." Nat Genet **32**(2): 321-325.
- Xu, X., A. M. Duncan, B. E. Merz-Demlow, W. R. Phipps and M. S. Kurzer (1999). "Menstrual cycle effects on urinary estrogen metabolites." J Clin Endocrinol Metab **84**(11): 3914-3918.
- Xu, X., J. M. Roman, H. J. Issaq, L. K. Keefer, T. D. Veenstra and R. G. Ziegler (2007). "Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Anal Chem **79**(20): 7813-7821.
- Xu, X., T. D. Veenstra, S. D. Fox, J. M. Roman, H. J. Issaq, R. Falk, J. E. Saavedra, L. K. Keefer and R. G. Ziegler (2005). "Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry." Anal Chem **77**(20): 6646-6654.
- Yang, L., N. W. Gaikwad, J. Meza, E. L. Cavalieri, P. Muti, B. Trock and E. G. Rogan (2009). "Novel biomarkers for risk of prostate cancer: results from a case-control study." Prostate **69**(1): 41-48.
- Yang, M., W. Xie, E. Mostaghel, M. Nakabayashi, L. Werner, T. Sun, M. Pomerantz, M. Freedman, R. Ross, M. Regan, N. Sharifi, W. D. Figg, S. Balk, M. Brown, M. E. Taplin, W. K. Oh, G. S. Lee and P. W. Kantoff (2011). "SLCO2B1 and SLCO1B3 may determine time to progression for patients receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer." J Clin Oncol **29**(18): 2565-2573.
- Yap, T. A., A. Zivi, A. Omlin and J. S. de Bono (2011). "The changing therapeutic landscape of castration-resistant prostate cancer." Nat Rev Clin Oncol **8**(10): 597-610.
- Yeager, M., N. Chatterjee, J. Ciampa, K. B. Jacobs, J. Gonzalez-Bosquet, R. B. Hayes, P. Kraft, S. Wacholder, N. Orr, S. Berndt, K. Yu, A. Hutchinson, Z. Wang, L. Amundadottir, H. S. Feigelson, M. J. Thun, W. R. Diver, D. Albanes, J. Virtamo, S. Weinstein, F. R. Schumacher, G. Cancel-Tassin, O. Cussenot, A. Valeri, G. L. Andriole, E. D. Crawford, C. A. Haiman, B. Henderson, L. Kolonel, L. Le Marchand, A. Siddiq, E. Riboli, T. J. Key, R. Kaaks, W. Isaacs, S. Isaacs, K. E. Wiley, H. Gronberg, F. Wiklund, P. Stattin, J. Xu, S. L. Zheng, J. Sun, L. J. Vatten, K. Hveem, M. Kumle, M. Tucker, D. S. Gerhard, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, Jr., D. J. Hunter, G. Thomas and S. J. Chanock (2009). "Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24." Nat Genet **41**(10): 1055-1057.
- Yeager, M., N. Orr, R. B. Hayes, K. B. Jacobs, P. Kraft, S. Wacholder, M. J. Minichiello, P. Fearnhead, K. Yu, N. Chatterjee, Z. Wang, R. Welch, B. J. Staats, E. E. Calle, H. S. Feigelson, M. J. Thun, C. Rodriguez, D. Albanes, J. Virtamo, S. Weinstein, F. R. Schumacher, E. Giovannucci, W. C. Willett, G. Cancel-Tassin, O. Cussenot, A. Valeri, G. L. Andriole, E. P. Gelmann, M. Tucker, D. S. Gerhard, J. F. Fraumeni, Jr., R. Hoover, D. J. Hunter, S. J. Chanock and G. Thomas (2007). "Genome-wide

hydroxyestrone and 16alpha-hydroxyestrone in urine." Environ Health Perspect **105 Suppl 3**: 607-614.

Zigelboim, I., P. J. Goodfellow, F. Gao, R. K. Gibb, M. A. Powell, J. S. Rader and D. G. Mutch (2007). "Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type." J Clin Oncol **25**(15): 2042-2048.

- association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24." Nat Genet **39**(5): 645-649.
- Yoshida, N. and Y. Osawa (1991). "Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization." Biochemistry **30**(12): 3003-3010.
- Younes, M. and N. Honma (2011). "Estrogen receptor beta." Arch Pathol Lab Med **135**(1): 63-66.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., R. E. Shore, Y. Afanasyeva, A. Lukanova, S. Sieri, K. L. Koenig, A. Idahl, V. Krogh, M. Liu, N. Ohlson, P. Muti, A. A. Arslan, P. Lenner, F. Berrino, G. Hallmans, P. Toniolo and E. Lundin (2011). "Postmenopausal circulating levels of 2- and 16alpha-hydroxyestrone and risk of endometrial cancer." Br J Cancer **105**(9): 1458-1464.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., R. E. Shore, K. L. Koenig, A. Akhmedkhanov, Y. Afanasyeva, I. Kato, M. Y. Kim, S. Rinaldi, R. Kaaks and P. Toniolo (2004). "Postmenopausal levels of oestrogen, androgen, and SHBG and breast cancer: long-term results of a prospective study." Br J Cancer **90**(1): 153-159.
- Zheng, S. L., J. Sun, F. Wiklund, S. Smith, P. Stattin, G. Li, H. O. Adami, F. C. Hsu, Y. Zhu, K. Balter, A. K. Kader, A. R. Turner, W. Liu, E. R. Bleecker, D. A. Meyers, D. Duggan, J. D. Carpten, B. L. Chang, W. B. Isaacs, J. Xu and H. Gronberg (2008). "Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer." N Engl J Med **358**(9): 910-919.
- Zhongyi, S., P. Rantakari, T. Lamminen, J. Toppari and M. Poutanen (2007). "Transgenic male mice expressing human hydroxysteroid dehydrogenase 2 indicate a role for the enzyme independent of its action on sex steroids." Endocrinology **148**(8): 3827-3836.
- Zhou, Z. X., M. V. Lane, J. A. Kemppainen, F. S. French and E. M. Wilson (1995). "Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability." Mol Endocrinol **9**(2): 208-218.
- Zhu, B. T. and A. H. Conney (1998a). "Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives." Carcinogenesis **19**(1): 1-27.
- Zhu, B. T. and A. H. Conney (1998b). "Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis?" Cancer Res **58**(11): 2269-2277.
- Zhu, B. T., G. Z. Han, J. Y. Shim, Y. Wen and X. R. Jiang (2006). "Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding." Endocrinology **147**(9): 4132-4150.
- Ziegler, R. G., J. M. Faupel-Badger, L. Y. Sue, B. J. Fuhrman, R. T. Falk, J. Boyd-Morin, M. K. Henderson, R. N. Hoover, T. D. Veenstra, L. K. Keefer and X. Xu (2010). "A new approach to measuring estrogen exposure and metabolism in epidemiologic studies." J Steroid Biochem Mol Biol **121**(3-5): 538-545.
- Ziegler, R. G., S. C. Rossi, T. R. Fears, H. L. Bradlow, H. Adlercreutz, D. Sepkovic, P. Kiuru, K. Wahala, J. B. Vaught, J. L. Donaldson, R. T. Falk, C. M. Fillmore, P. K. Siiteri, R. N. Hoover and M. H. Gail (1997). "Quantifying estrogen metabolism: an evaluation of the reproducibility and validity of enzyme immunoassays for 2-