

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Cancérologie

Présentée et soutenue par :

Grégory Ségala

le : lundi 17 septembre 2012

Titre :

Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité anti-cancéreuse du Tamoxifène et de la Dendrogénine A

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Inserm UMR 1037

Directeur(s) de Thèse :

Docteur Marc Poirot

Rapporteurs :

Professeur Philippe Bougnoux

Docteur Vincent Cavaillès

Professeur Jean-Marc Lobaccaro

Membre(s) du jury :

Professeur Philippe Bougnoux (Professeur d'Université - Praticien Hospitalier)

Docteur Vincent Cavaillès (Directeur de Recherche)

Professeur Thierry Levade (Professeur d'Université - Praticien Hospitalier)

Professeur Jean-Marc Lobaccaro (Professeur d'Université)

Docteur Marc Poirot (Directeur de Recherche)

Cette thèse a été financée par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur ainsi que par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) :



Au sein de l'équipe de Marc Poirot :

Métabolisme des stérols et innovations thérapeutiques en oncologie

Unité Mixte de Recherche Inserm 1037

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

Institut Claudius Regaud

20, rue du Pont Saint-Pierre

31052 Toulouse Cedex



A Céline,
A Manon,
A ma famille.

Labor omnia vincit improbus.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait de juger ma thèse. Je suis très reconnaissant de la patience dont vous avez fait preuve pour lire ce manuscrit de thèse volumineux, dont l'écriture m'a fortement passionné! A mes rapporteurs, le Professeur Jean-Marc Lobaccaro spécialiste des récepteurs LXR, le Professeur Philippe Bougnoux spécialiste de l'utilisation thérapeutique de lipides bioactifs et le Docteur Vincent Cavaillès spécialiste du cancer du sein et de la biologie des récepteurs nucléaires, je vous exprime toute ma gratitude pour l'évaluation de mon manuscrit de thèse. Je remercie également le Professeur Thierry Levade spécialiste de la mort cellulaire impliquant des lipides pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie l'Ecole Doctorale de Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse d'avoir soutenu mon projet de thèse en m'accordant un financement du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur pour les trois premières années de ma thèse. Je remercie aussi l'Association pour la Recherche sur le Cancer ainsi que ses donateurs d'avoir financé ma quatrième année de thèse et d'avoir porté l'espoir que ce sujet de cancérologie provoque des retombées en thérapie anti-cancéreuse.

Je remercie fortement Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot qui ont guidé cette thèse avec beaucoup de passion, de créativité et de pertinence. Au-delà des connaissances qu'ils m'ont apportées sur mon sujet de thèse, ils m'ont appris le raisonnement scientifique et la communication scientifique si difficiles à s'approprier. J'ai aussi beaucoup apprécié leur simplicité, leur bonne humeur communicative, et particulièrement l'ambiance familiale qu'ils insufflent à cette équipe ce qui la rend très agréable à vivre. Tout au long de ma thèse, j'ai bénéficié d'une grande autonomie, j'ai été entouré par des personnes toutes aussi passionnées que moi sur la biologie et j'ai ressenti beaucoup de gratitude et d'enthousiasme de la part de Marc et Sandrine face à mes efforts ce qui m'a naturellement pousser à me dépasser. Merci!

Je remercie Michel Record pour sa gentillesse et sa classe. Michel a toujours été très enthousiaste et passionné pour m'expliquer la biologie des exosomes et plus largement la lipidologie. J'ai beaucoup de respect pour ses qualités humaines et scientifiques et je le remercie de les avoir toujours partagées avec générosité.

Je remercie Philippe de Médina pour tout ce qu'il m'a apporté. Ce fut un régal de discuter de science ensemble pendant de longues heures à chaque fois qu'on en avait l'occasion, et toujours avec humour et détente. Les discussions de « philosophie scientifique » que nous avons eu étaient du pur bonheur, d'autant plus qu'il est difficile de trouver des personnes à qui cela plaît... J'ai trouvé en Philippe une personne aussi passionnée que moi par la biologie et je le remercie pour ce partage. Il n'existe pas de personne plus humble que Philippe, et je suis certain que je ne suis pas le seul à le penser, je le remercie profondément pour cette rare qualité humaine.

Je remercie Michaël Paillasse pour son authenticité et sa franchise. Si son côté rugbyman-rentre-dedans est difficile à gérer au début, cela devient rapidement une qualité humoristique. J'ai apprécié son pragmatisme qui me permettait parfois de redescendre sur terre lorsque mon imagination s'emballait. Je le remercie aussi pour sa connaissance du bon-vivre qui nous a permis de voyager gustativement autour d'un bon verre de vin rouge!

Je remercie Emmanuel Noguer pour sa simplicité et sa générosité. Ce fut un plaisir de partager mon bureau avec une personne aussi gentille et admirable au point de vue du dépassement de soi-même. Les discussions que nous avons eu m'ont humainement beaucoup apporté. Je lui souhaite toute la réussite sur la Dendrogénine B et les CEs!

Je remercie Morgan Aubry pour son humour et son humilité. Je le remercie aussi pour sa patience les derniers mois de ma thèse, lorsque j'étais en plein rush et que je ressemblais à une véritable tornade, débitant les explications qu'il me demandait à toute vitesse. Son attitude a été exemplaire pendant son Master de Cancérologie, pleine de courage et de cran pour traverser des épreuves quasiment insurmontables : chapeau bas.

Je remercie Elodie Bacquier pour les discussions comiques que nous avons eu. J'ai beaucoup apprécié son humeur gaie et légère ainsi que sa culture Creusoise.

Je remercie Maud Voisin pour sa franchise et son honnêteté. Elle a réussi à imposer sa personnalité haute en couleur dans l'équipe et je la remercie pour son dynamisme. Tous mes souhaits de réussite sur l'OCDO!

Je remercie Marion David dont j'ai apprécié les qualités humaines, même si nous avons eu relativement peu de temps pour nous connaître. Bonheur et succès dans l'équipe Poirot!

Je remercie Mathias Poirot qui fut mon stagiaire M1 et que j'ai initié à la recherche. Ce fut un grand plaisir de le former et de lui apprendre un maximum tellement sa passion pour la biologie était débordante. Sa personnalité enthousiaste et humoristique a rendu son séjour au

laboratoire d'autant plus agréable. Sa réussite actuelle confirme la chance que j'ai eu de pouvoir l'encadrer. Je lui souhaite longue vie dans la recherche.

Je remercie Bruno Payré pour m'avoir initié à la microscopie électronique. En plus des qualités techniques qu'il m'a apportées, je le remercie beaucoup pour ses qualités humaines et son calme légendaire.

Je remercie les membres de l'équipe qui travaillent sur des sujets éloignés du mien mais avec lesquels les discussions en réunion d'équipe étaient agréables à partager : Frédéric Courbon, Séverine Brillouet, Florence Dalenc, Manuel Bardiès, Thibault Mauxion et Delphine Villoing.

Je remercie tous les membres passés de l'équipe : Guillaume Amouroux, Julia Cherier, Alain Roulet, Caroline Subra pour son humour et sa gentillesse, Loubna Mhamdi pour m'avoir formé à mes débuts sur certaines techniques de ma thèse et pour ses qualités humaines, Clément Becerra, Farid Khallouki et Sandra Dorbes.

Je remercie les Affichémistes Stéphane Silvente et Frédéric Thivet pour la bonne humeur qu'ils ont toujours amenée en venant au laboratoire ou lorsque nous allions au QG d'Affichem. C'est aussi grâce à eux que j'ai pu travailler sur la Dendrogénine A et je les remercie d'avoir pu partager une partie de l'histoire de cette molécule avec eux. Je remercie aussi la nouvelle Affichémiste Cécile Bise pour sa joie communicative et son dynamisme, j'aurais apprécié plus de temps pour la connaître. Longue vie à Affichem!

Je remercie tous les membres présents et passés de l'équipe de Gilles Favre de l'équipe de Stephan Vagner et de l'équipe d'Elisabeth Moyal-Cohen-Jonathan, avec un remerciement spécial pour Anthony Lemarié pour sa bonne humeur communicative, sa gentillesse et sa capacité à faire oublier le stress. Je remercie aussi Rémi Gence et Nicolas Berry pour leur humour et pour les soirées Argelésiennes mémorables et bien arrosées! Je remercie Audrey Delmas et Kenza Mamouni pour leur personnalité calme et posée ainsi que Anne Cayrel pour son humour et sa légèreté. Je remercie Adrien Decorsière et Sandra Pierredon pour leur gentillesse et leur générosité : longue vie aux Hauts-Savoyards... Je remercie Nicolas Skuli pour sa générosité et pour m'avoir éclairé sur la vie de post-doc à l'étranger and beyond. Je remercie Christine Pich avec qui nous nous sommes suivis pendant tout notre cursus universitaire. Je lui souhaite toute la réussite en post-doc et après. Je remercie Iotefa Teiti dont la personnalité reflète complètement sa provenance. Merci d'avoir illuminé le labo du soleil de Tahiti, et de m'avoir autant fait rire.

Je remercie Florence Larminat et Laetitia Bricese pour le stage de Master Recherche que j'ai réalisé dans leur laboratoire. Je n'oublierais pas la détermination dont elles ont fait preuve pour que je réussisse mon Master tout en connaissant mon souhait d'effectuer ma thèse dans une autre équipe. Je les remercie sincèrement de m'avoir permis d'obtenir une bourse de thèse et j'espère que ma thèse honore la générosité dont elles ont fait preuve à mon égard.

Je remercie Albane le Maire et William Bourguet pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au CBS à Montpellier ainsi que pour les connaissances de biochimie structurale qu'ils m'ont apprises.

Je remercie l'équipe de Futura Sciences pour m'avoir confié la tâche de modérateur au cours de ma thèse, ce qui m'a enrichi d'un point de vue scientifique et personnel. Je remercie toute l'équipe de modération pour sa richesse scientifique et humaine, et pour la cohésion de notre équipe. Je remercie aussi Futura Sciences, et plus particulièrement Guillaume Josse, pour la confiance qu'ils m'ont accordée pour écrire un dossier de vulgarisation sur les mécanismes du cancer et pour l'avoir diffusé à grande échelle. La vulgarisation scientifique à un tel niveau d'impact était encore une chose inespérée pour moi, merci de m'avoir permis de réaliser ce rêve!

Je remercie ma famille pour tout. Ma famille m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de mon parcours universitaire. Leur aide à mon égard est sans faille et pour cela je leur exprime toute ma gratitude et mon amour.

Cette thèse n'aurait pas été si bien réussie sans elles. Je remercie tendrement et avec beaucoup d'amour les deux femmes de ma vie : Céline et Manon. Céline, je te remercie pour le soutien essentiel que tu m'as apporté pendant toutes mes études. Malgré les difficultés que je t'ai imposées par mon choix de carrière difficile, tu as toujours trouvé la force de me suivre quels que soient les sacrifices. Je ne me serais pas battu avec la même force sans la simplicité, la complicité, l'humour et l'amour que nous avons toujours partagés ensemble. L'arrivée de Manon a rendu la fin de ma thèse magnifique et cela grâce à toi. Manon, tu ne comprends pas encore les mots, ou tu ne comprends que ceux qui t'intéressent, mais ton papa te dit un grand merci pour le bonheur immense que tu lui a donné au cours de sa dernière année de thèse. Tu es ma plus grande force et je me suis dépassé plus que jamais cette année grâce à toi. Un seul sourire et tu me rends joyeux même si la journée a été difficile! Merci Manon pour ta beauté, ton amour et ton innocence!

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	8
SOMMAIRE	12
LISTE DES ABREVIATIONS	18
RESUME.....	26
SUMMARY	28
INTRODUCTION	30
I) CANCER DU SEIN ET TAMOXIFENE	32
1) Physiologie et développement de la glande mammaire.....	32
1.1) Anatomie de la glande mammaire adulte	32
1.2) Développement de la glande mammaire	34
1.2.1) Développement embryonnaire	34
1.2.2) Puberté	35
1.2.3) Grossesse.....	36
1.2.4) Lactation	36
1.2.5) Involution.....	38
1.3) Mécanismes moléculaires du développement de la glande mammaire.	38
1.2.5) Hiérarchie cellulaire dans la glande mammaire.....	38
1.3.1) Le récepteur des oestrogènes	39
1.3.2) Le récepteur de la progestérone	41
2) Les cancers du sein	42
2.1) Les types de cancers du sein.....	42
2.1.1) Classification histologique.....	42

2.1.2) Classification moléculaire.....	43
2.1.3) Les cellules souches cancéreuses mammaires	44
2.1.4) L'origine des cancers du sein.....	46
2.2) L'hormonothérapie	47
2.2.1) Les SERMs	48
2.2.2) Le Fulvestrant	48
2.2.3) Les inhibiteurs d'aromatase	48
3) Le tamoxifène : pionnier de l'hormonothérapie	49
3.1) Découverte du tamoxifène.....	49
3.2) Mécanisme d'action du tamoxifène.....	50
3.2.1) Mode d'action génomique	50
3.2.2) Mode d'action non génomique	52
3.3) Les effets secondaires du tamoxifène.....	53
3.3) Une cible secondaire du tamoxifène : le complexe AEBS.....	55
3.3.1) Découverte du site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS).....	55
3.3.2) Effets cytostatiques, cytotoxiques et métabolisme lipidique	55
3.3.3) Identification moléculaire d'AEBS.....	57
3.3.4) Induction de la différenciation et de la mort cellulaire	59
3.3.5) La ChEH à l'origine d'une nouvelle voie métabolique	62
II) LES LIVER X RECEPTORS (LXR)	65
1) Les récepteurs nucléaires et les LXRs	65
1.1) Généralités	65
1.2) Nomenclature	66
1.3) Structure	67
1.3.1) La fonction d'activation 1 (AF-1).....	68
1.3.2) Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)	69
1.3.2.1) Structure du DBD des récepteurs nucléaires.....	70
1.3.3) La région charnière	72
1.3.4) Le domaine de liaison au ligand (LBD).....	72
1.3.4.1) Structure du LBD des récepteurs nucléaires	72
1.3.4.2) Structure du LBD des LXRs.....	73
1.4) Mécanisme d'action	75
1.4.1) Liaison à l'ADN.....	75
1.4.2) Dimérisation.....	76

1.4.3) Liaison du ligand et recrutement des corégulateurs.....	77
1.4.4) Le cycle des récepteurs nucléaires	79
1.4.5) Allostérie des récepteurs nucléaires.....	81
1.4.6) Cross-talks des récepteurs nucléaires.....	84
1.4.6.1) Cross-talks de LXR dans l'inflammation.....	84
1.4.6.2) Cross-talks de LXR avec des récepteurs nucléaires	86
1.4.6.3) Autres cross-talks de LXR.....	88
1.4.7) Régulations par des modifications post-traductionnelles	89
1.5) Pharmacologie des LXRs	92
1.5.1) Les agonistes	92
1.5.2) Les antagonistes	94
1.5.3) Les agonistes inverses.....	96
1.5.4) Les modulateurs	96
1.5.5) Ciblage multiple de ligands des LXRs.....	98
1.6) Les corégulateurs transcriptionnels.....	99
1.6.1) Les coactivateurs.....	101
1.6.2) Les corépresseurs	101
1.6.3) Effets tissu-spécifiques des modulateurs des récepteurs nucléaires	102
1.6.4) Les corégulateurs dans la pharmacologie des LXRs	103
2) Rôles cellulaires, physiologiques et physiopathologiques des LXRs... 104	
2.1) Contrôle du métabolisme des stérols.....	104
2.1.1) Les flux de stérols dans la cellule	104
2.1.1.1) Entrée de cholestérol dans la cellule.....	105
2.1.1.2) Efflux de cholestérol.....	107
2.1.1.3) Stockage cellulaire du cholestérol.....	108
2.1.2) La cholestérogenèse	110
2.1.2.1) Voie de biosynthèse du cholestérol	110
2.1.2.2) Régulation de la cholestérogenèse	112
2.1.2.3) Ciblage pharmacologique de la cholestérogenèse.....	114
2.1.3) Les flux de stérols dans l'organisme.....	116
2.1.3.1) Absorption intestinale du cholestérol	116
2.1.3.2) Export de cholestérol du foie vers les cellules périphériques	118
2.1.3.3) Transport inverse du cholestérol.....	119
2.1.4) La métabolisation des stérols	121
2.1.4.1) Oxydation des stérols	121
2.1.4.2) Estérification des stérols	123

2.1.4.3) Sulfatation des stérols	124
2.1.5) Métabolisme des hormones stéroïdiennes	125
2.1.5.1) La stéroïdogénèse	125
2.1.5.2) Régulation du métabolisme des hormones stéroïdiennes.....	127
2.2) Contrôle du métabolisme lipidique	130
2.3) Contrôle du métabolisme glucidique.....	133
2.4) Contrôle du système immunitaire.....	135
2.4.1) Contrôle de l'immunité innée par les LXR _s	135
2.4.2) Contrôle de l'immunité acquise par les LXR _s	137
2.5) Les LXR _s dans les cancers	138
2.5.1) Contrôle de la prolifération.....	138
2.5.2) Mort cellulaire.....	140
2.5.3) Cross-talks avec la voie de signalisation du TGF β	141
2.5.4) Echappement des tumeurs à l'immunosurveillance.....	144
2.5.5) Les LXR _s dans les cancers hormono-dépendants.....	145
2.5.6) Les LXR _s dans la biologie de l'épiderme.....	146
III) OBJECTIFS DE LA THESE	148
MATÉRIELS ET MÉTHODES	150
1) Matériels	152
2) Culture cellulaire	152
3) Transfection de siRNA	152
4) Coloration cellulaire au Bleu Trypan	153
5) Etude du cycle cellulaire en cytométrie de flux	153
6) Marquage cellulaire Annexin V-FITC / Iodure de Propidium.....	154
7) Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial et des ROS.....	154
8) Western Blot	154
9) Immunofluorescence	156
10) Coloration cellulaire à la MonoDensylCadavérine (MDC)	156
11) Microscopie électronique à transmission	157
12) Observation du flux autophagique par GFP-LC3.....	157
13) Essai luciférase	158

14) Etude de liaison à l'équilibre de la DDA aux LXRs	159
15) Extraction d'ARN	160
16) PCR quantitative	160
17) Dosage de la DDA dans les tissus de souris LXR knockout.....	161
RÉSULTATS	162
ARTICLE 1.....	164
INTRODUCTION	164
RESULTATS	165
DISCUSSION	186
ARTICLE 2.....	190
INTRODUCTION	190
DISCUSSION	226
ARTICLE 3.....	230
INTRODUCTION	230
DISCUSSION	252
ARTICLE 4 (REVUE)	254
ARTICLE 5.....	261
INTRODUCTION	261
DISCUSSION	305
ARTICLE 6.....	309
INTRODUCTION	309
DISCUSSION	317
DISCUSSION GENERALE.....	318
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	332

Liste des abréviations

22(R)-HC :	22(R)-HydroxyCholesterol
24,25-CE :	24(S),25-cholestérol Epoxyde
24-HC-24-S :	24-HydroxyCholesterol-24-Sulfate
24-HC-3-S :	24-HydroxyCholesterol-3-Sulfate
25-HC :	25-HydroxyCholesterol
25-HC-3-S :	25-HydroxyCholesterol-3-Sulfate
3'-UTR :	3'-UnTranslated Region
3-MA :	3-MethylAdenine
3 β -HSD :	3 β -HydroxySteroid Deshydrogenase
7-KCS :	7-ketocholesterol-3-Sulfate
ABC :	ATP-Binding Cassette
ACAT :	Acyl-CoA Cholesterol AcylTransferase
ACC :	Acetyl CoA Carboxylase
ACOT1 :	Acyl CoA Thioesterase 1
ACTH :	AdrenoCorticoTropin Hormone
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AEBS :	AntiEstrogen Binding Site
AF-1 :	Activating-Function-1
AF-2 :	Activating-Function-2
AhR :	Aryl hydrocarbon Receptor
AIF :	Apoptosis-Inducing Factor
AKR :	AldoKeto Reductase
ALK-1 :	Activin receptor-Like Kinase-1
AMPK :	Adenosine MonoPhosphate-activated Kinase
Angptl-3 :	Angiopoïetin like protein-3
AP-1 :	Activator Protein-1
ApoE :	Apolipoprotein E
AR :	Androgen Receptor
ARL7 :	Adenosine diphosphate Ribosylation factor-Like 7
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger
ASC-2 :	Activating Signal Cointegrator-2

ATG7 :	Autophagy Gene 7
BafA1 :	Bafilomycine A1
BARD1 :	BRCA1-Associated RING Domain 1
Bcl-2 :	B-cell lymphoma-2
BRCA1 :	BReast Cancer susceptibility gene 1
BSA :	Bovine Serum Albumin
C5DS :	3 β -hydroxysterol- Δ 5-DeSaturase
CAR :	Constitutive Androstane Receptor
CARM1 :	Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1
CCCP :	Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenylhydrazone
CCL24 :	CC Chemokine Ligand 24
CCR7 :	CC Chemokine Receptor 7
CD36 :	Cluster of Differentiation 36
CDK :	Cyclin-Dependent Kinase
CE :	Cholestérol-5,6-Epoxyde
CEH :	Cholesterol Ester Hydrolase
CES :	Cholesterol-5,6-Epoxyde-3-Sulfate
CETP :	Cholesterol Ester Transfer Protein
CHAPS :	3-[(3-CHolamidopropyl)dimethylammonio]-1- PropaneSulfonate
ChEH :	Cholesterol-5,6-Epoxyde Hydrolase
ChREBP :	Carbohydrate Response Element Binding Protein
CK2 :	Casein Kinase 2
CMR :	Chylomicron
Ct :	Cycle threshold
CT :	Cholestane-3,5,6-Triol
CTE :	C-Terminal Extension
CYP :	Cytochrome P450
D8D7I :	3 β -hydroxysteroid- Δ 8, Δ 7-Isomerase
DAF-12 :	DAuer Formation-12
DAPI :	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DBD :	DNA Binding Domain
DDA :	DenDrogénine A
DHCR24 :	3 β -hydroxysteroid- Δ 24-Reductase
DHCR7 :	7-Dehydrocholesterol Reductase
DHL :	24,25-DiHydroxyLanosterol

DiOC6 :	3,3'-DihexylOxacarboCyanine iodide
DPPE :	<i>N,N</i> -diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine
DR :	Direct Repeat
DTT :	DiThioThreitol
E2 :	17 β -oestradiol
EC50 :	Half maximal Effective Concentration
ECL :	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA :	Ethylene Diamine TetraAcetic acid
EGFR :	Epithelial Growth Factor Receptor
Elk1 :	E26-like transcription factor 1
EMT :	Epithelial Mesenchymal Transition
ER :	Estrogen Receptor
ERE :	Estrogen Receptor responsive Element
ERR :	Estrogen Receptor-related Receptor
EST :	Estrogen Sulfatase
FASN :	Fatty Acid Synthase
FDA :	Food and Drug Administration
FDFT1 :	Farnesyl Diphosphate FarnesylTransferase 1
FITC :	Fluorescein IsoThioCyanate
FOX :	Forkhead box
FSH :	Follicle-Stimulating Hormone
FXR :	Farnesoid X Receptor
GFP-LC3 :	Green Fluorescent Protein-Light Chain 3
GLUT4 :	GLUcose Transporter 4
GPR30 :	G Protein-coupled Receptor 30
GPS2 :	G Protein pathway Suppressor 2
GR :	Glucocorticoid Receptor
GST-LBD :	Glutathione S-Transferase-Ligand Binding Domain
HAT :	Histone AcetylTransferase
HDAC :	Histone DeACetylase
HDL :	High Density Lipoprotein
HE :	Hematoxyline et Eosine
HER2 :	Human Epithelial Growth Factor Receptor 2
HiCD :	6-HistaminylCholestane-3,5-Diol
HIF-1 α :	Hypoxia Inducible Factor-1 alpha

HMGCR :	3-HydroxyMethylGlutaryl-CoA Reductase
HMT :	Histone MethylTransferase
HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography
HRE :	Hormone Response Element
HRP :	Horse Radish Peroxidase
HSD11B :	11 β -HydroxySteroid Deshydrogenase
HSD17B :	17 β -HydroxySteroid Deshydrogenase
Hsp-60 :	Heat Shock Protein-60
IC50 :	Half maximal Inhibitory Concentration
ID :	Intrinsic Disorder
IDOL :	Inducible Degradator Of LDLR
IGF-1R :	Insulin Growth Factor-1 Receptor
IL :	InterLeukin
Insig :	INSulin-Induced Gene
IR :	Inverted Repeat
IRF-3 :	Interferon-Related Factor-3
JAK :	Janus Kinase
JNK :	c-Jun N-terminal Kinase
kDa :	kiloDalton
K _M :	Constante de Michaelis-Menten
LBD :	Ligand Binding Domain
LBP :	Ligand Binding Pocket
LC3 :	Light Chain 3
LDL :	Light Density Lipoprotein
LDLR :	LDL Receptor
L-FABP :	Liver-Fatty Acid Binding Protein
LH :	Luteinizing Hormone
LPL :	LipoProtein Lipase
LPS :	LipoPolySaccharide
LSS :	LanoSterol Synthase
Luc :	Luciferase
LXR :	Liver X Receptor
LXRE :	LXR Response Element
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDC :	MonoDensyl Cadaverine

Med1 :	Mediator subunit 1
mEH :	microsomal Epoxide Hydrolase
MFGE-8 :	Milk Fat Globule Protein-8
MIG12 :	Midline-1-Interacting G12-like protein
miRNA :	micro RiboNucleic Acid
MMP :	Matrix MetalloProteinase
MNAR :	Modulator of Non-genomic Activity of estrogen Receptor
MOS :	2,3(S)-MonoOxydoSqualene
MR :	Mineralocorticoid Receptor
MTP :	Microsomal Triglycerid Transfer Protein
MUC1 :	Mucin 1
NCoR :	Nuclear receptor CoRepressor
NFkB :	Nuclear Factor kappa B
NOR1 :	Neuron-derived Orphan Receptor 1
NPC :	Niemann-Pick type C
NPC1L1 :	NPC1-Like protein 1
OCDO :	6-OxoCholestane-3,5-DiOl
P300/CBP :	E1A-binding protein P300/cAMP Response Element Binding-Binding Protein
P450SCC :	Cytochrome P450 Side Chain Cleavage
PARP :	Poly-Adenosine diphosphate Ribose Polymerase
PBPE :	N,N-Pyrrolidino-[4-Benzyl) Phenoxy Ethanamine]
PBS :	Phosphate Buffered Saline
P-CAF :	P300/CBP-Associated Factor
PEI :	PolyEthylenImine
PEPCK :	PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PGC :	PPAR Gamma Coactivator
PI3K :	PhosphatidyInositol-3-Kinase
PIAS-1 :	Protein Inhibitor of Activated STAT-1
PKA :	Protein Kinase A
PKC :	Protein Kinase C
PLTP :	PhosphoLipid Transfer Protein
PPAR :	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PR :	Progesterone Receptor
PTHrP :	ParaThyroidHormone-related Protein
PVDF :	PolyVinyl DiFluoridene

PXR : Pregnane X Receptor
 qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
 RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B-Ligand
 RAR : Retinoic Acid Receptor
 RIP-140 : Receptor-Interacting Protein-140
 ROR : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor
 ROS : Reactive Oxygen Species
 RTx-6 : Resistant to Tamoxifen-6
 RXR : Retinoid X Receptor
 S6K1 : P70-ribosomal protein S6-Kinase 1
 SCAP : SREBP Cleavage-Activating Protein
 SCD1 : Stearoyl CoA Desaturase 1
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
 SE : Squalene Epoxidase
 SERD : Selective Estrogen Receptor Downregulator
 SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
 SF-1 : Steroidogenic Factor-1
 Shc : Src homology 2 domain-containing
 Shh : Sonic hedgehog
 siRNA : small interfering RiboNucleic Acid
 SIRT1 : SIRTuine 1
 Skp-2 : S-phase Kinase-associated Protein 2
 SMAD : Mothers Against Decapentaplegic homolog 1
 SMRT : Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone Receptors
 SR-B1 : Scavenger Receptor-B1
 Src : Sarcoma
 SRC : Steroid Receptor Coactivator
 SREBP : Sterol Responsive Element Binding Protein
 SRF : Serum Responsive Factor
 StAR : Steroidogenic Acute Regulatory protein
 STAT1 : Signal Transducer and Activator of Transcription 1
 STS : Steroid Sulfatase
 SULT : Steroid SULfoTransferase
 SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier
 SWI/SNF : SWItch/Sucrose NonFermentable

SXR :	Steroid and Xenobiotic Receptor
T.A. :	Température Ambiante
Tam :	Tamoxifène
TBP :	TATA box-Binding Protein
TBS :	Tris Base Saline
t-BuPE :	tert-Butyl Phenoxyethyl diEthylamine
TGF β :	Transforming Growth Factor beta
TLR :	Toll-Like Receptor
TMAO :	TriMethylAmine-N-Oxyde
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TR :	Thyroid hormone Receptor
TRAP :	Thyroid hormone Receptor-Associated Protein
TRBP :	Thyroid hormone Receptor Binding Protein
UCP :	UnCoupling Protein
VDR :	Vitamin D Receptor
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL :	Very Light Density Lipoprotein
V _m :	Vitesse enzymatique maximale
Vps34 :	Vacuolar Protein Sorting 34
zVAD-fmk :	Benzyloxycarbonyl Valyl-Alanyl-Aspartyl-(O-methyl)-fluoromethylketone

RESUME

Le tamoxifène (Tam) est l'un des principaux médicaments utilisés pour le traitement des cancers du sein exprimant les récepteurs des œstrogènes (ER). Des résistances au Tam limitent son utilisation thérapeutique et l'identification des mécanismes responsables de ces résistances nécessite une connaissance approfondie de la pharmacologie du Tam. L'ER est la cible la mieux connue du Tam mais d'autres cibles existent parmi lesquelles le site de liaison des anti-œstrogènes (AEBS : AntiEstrogen Binding Site). L'équipe de Marc Poirot a montré qu'AEBS est impliqué dans les effets anti-cancéreux du Tam par un mécanisme qui fait intervenir le métabolisme des stérols. Au cours de ma thèse, nous avons découvert qu'AEBS porte l'activité enzymatique cholestérol époxyde hydrolase (ChEH) qui catalyse la transformation des cholestérol-5,6-époxydes (5,6-CE) en cholestane-3,5,6-triol. Nous avons montré que le Tam induit une production de 5,6-CE dans les cellules cancéreuses mammaires et stimule leur accumulation en inhibant la ChEH. Les métabolites de 5,6-CE sont des modulateurs du récepteur nucléaire des oxystérol LXR β . Nous avons caractérisé l'implication de LXR β dans les effets différenciants et cytotoxiques du Tam et montré une dérégulation de cette voie dans une lignée cellulaire résistante au Tam. En parallèle, nous avons découvert que le 5,6-CE alpha est métabolisé dans les tissus sains en Dendrogénine A (DDA), qui est le premier alcaloïde stéroïdien découvert chez les mammifères, et qui est absente dans les tissus tumoraux ce qui suggère un lien entre le métabolisme de la DDA et l'oncogénèse. Nous avons observé que la DDA a une forte activité anti-tumorale sur des cancers du sein et sur des mélanomes métastatiques en provoquant la différenciation et la mort cellulaire, ce qui a motivé son développement pour une utilisation thérapeutique. Nous avons identifié que LXR β est une cible directe de la DDA et nous avons établi que la cytotoxicité de la DDA dépend de LXR β et fait intervenir une apoptose ainsi qu'une autophagie cytotoxique. La caractérisation des mécanismes d'action du Tam et de la DDA pourront permettre une utilisation thérapeutique optimale de ces deux molécules ainsi que le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses personnalisées.

SUMMARY

Tamoxifen (Tam) is one the leading drug used for the treatment of estrogen receptor (ER)-positive breast cancers. Resistances to Tam limit its therapeutic use and the identification of mechanisms involved in these resistances requires an accurate knowledge of its pharmacology. ER is the best-known target of Tam but other targets exist such as the Antiestrogen Binding Site (AEBS). Marc Poirot's team showed that AEBS is involved in the anti-cancerous effects of Tam by a mechanism that induced a perturbation in sterol metabolism. During my thesis, we discovered that the AEBS carried out the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) activity which catalyzes the transformation of 5,6-epoxy-cholesterol (5,6-EC) into cholestane-3,5,6-triol. We showed that Tam induced the production of 5,6-EC in tumor cells and stimulated their accumulation through ChEH inhibition. We found that some 5,6-EC metabolites were modulators of the oxysterols nuclear receptor LXR β . We characterized the involvement of LXR β in the anticancer action of Tam and showed a deregulation of this oxysterol signaling pathway in a Tam-resistant cell line. At the same time, we discovered that one 5,6-EC was metabolized in normal tissue into Dendrogenin A (DDA), the first steroidal alkaloid discovered in mammals, but DDA was found absent in neoplastic tissues, suggesting a link between DDA metabolism and oncogenesis. We found that DDA has a strong anti-tumor potency on breast cancers and metastatic melanoma through the induction of tumor cell differentiation and death, which prompted its development for clinical applications. We demonstrated that LXR β is a direct target of DDA and established that the cytotoxicity of DDA was LXR β -dependent and involved apoptosis and cytotoxic autophagy. The characterization of the mechanisms of action of Tam and DDA will allow an optimal therapeutic use of these two molecules and also the development of new personalized anti-cancer therapies.

INTRODUCTION

I) Cancer du sein et tamoxifène

1) Physiologie et développement de la glande mammaire

Chez la femme, la glande mammaire produit le lait et le délivre au nouveau-né. L'apparition de la glande mammaire au cours de l'évolution a donné naissance à la vaste famille des mammifères¹. Le lait constitue l'unique alimentation des mammifères pendant les premiers mois de leur vie, ce qui rend la glande mammaire essentielle pour la survie d'une espèce mammifère. La nutrition par le lait, qui s'appelle la lactation, confère un avantage sélectif aux mammifères puisque l'apport énergétique du lait est important ce qui permet un développement optimal de la progéniture pendant les premiers mois du développement post-natal. Aussi, le lait contient des peptides antimicrobiens qui peuvent assister les défenses immunitaires encore immatures du nouveau-né contre des micro-organismes pathogènes ou opportunistes. Par conséquent, la glande mammaire est l'organe le plus important d'une mère pour son nouveau-né, ce qui peut expliquer pourquoi la physiologie de la glande mammaire est très dynamique chez la femme, de la maturation de sa sexualité au cours de la puberté jusqu'à la lactation.

1.1) Anatomie de la glande mammaire adulte

La glande mammaire qui se situe dans le sein de la femme est constituée de 15 à 20 lobes glandulaires, entièrement entourés de tissu adipeux, et qui sont responsables de la production de lait (Figure 1A). Les lobes glandulaires sont formés par des lobules comprenant des alvéoles. Les alvéoles sont l'unité physiologique de base de la production de lait. Au sein des lobules, les alvéoles sont connectées aux canaux alvéolaires dans lesquels le lait est transporté. Le lait provenant du lobule s'écoule dans un canal lobulaire jusqu'à un canal galactophore qui draine le lait de l'ensemble des lobules constituant un lobe glandulaire. Les canaux galactophores transportent le lait jusqu'au mamelon où ils se terminent en sinus lactifères qui permettent l'excrétion du lait hors du sein. Comme tout organe excréteur, le réseau de canaux de la glande mammaire, appelé l'arbre mammaire, est densément ramifiés pour rendre la production et le transport du lait optimaux.

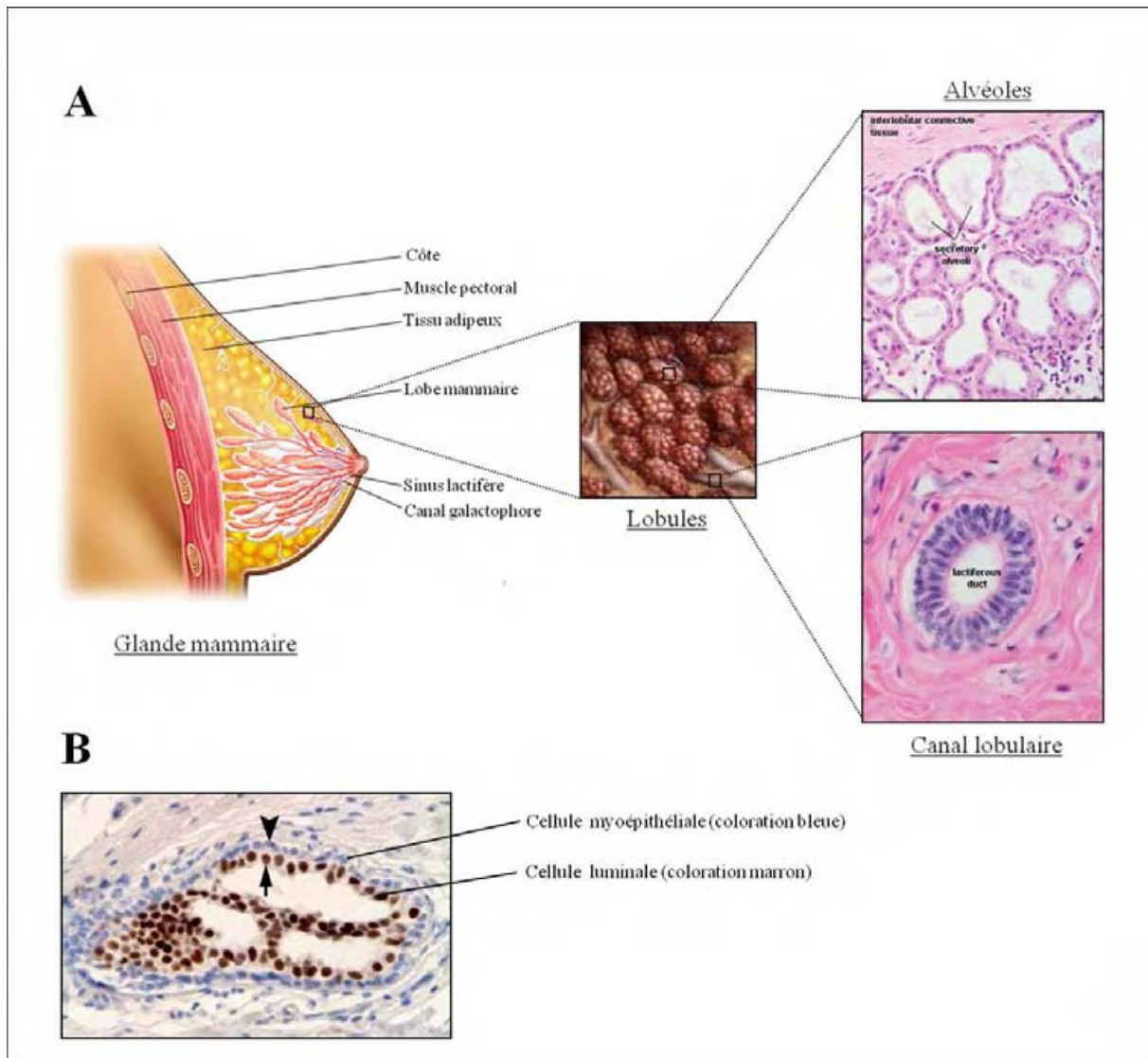


Figure 1 : Morphologie de la glande mammaire. A. Anatomie de la glande mammaire et vue en coupe d'alvéoles mammaires et d'un canal lobulaire avec marquage H&E. B. Coupe d'une alvéole mammaire avec un marquage immunohistologique des cellules myoépithéliales en bleu et des cellules luminales en marron.

Au niveau histologique, les alvéoles sont constituées de cellules luminales sécrétrices qui sécrètent le lait dans la lumière alvéolaire (Figure 1B). Le lait est transporté dans des canaux qui sont formés par des cellules luminales bordant la lumière canalaire, et des cellules myoépithéliales sous-jacentes qui sont en contact avec la membrane basale séparant les canaux mammaires du stroma. Les cellules myoépithéliales ont une capacité contractile permettant le transport actif du lait des alvéoles vers le sinus galactophore.

1.2) Développement de la glande mammaire

A la différence d'autres organes, la glande mammaire ne se développe que plus d'une décennie après la naissance². A la naissance, seule une glande rudimentaire est présente au niveau des seins mâles et femelles. La glande mammaire ne se développe que lorsque les hormones sexuelles féminines commencent à être sécrétées chez les femmes au début de la puberté par les ovaires. Toutefois, le développement de la glande mammaire au cours de la puberté reste incomplet. Ce n'est que lors de la grossesse puis lors de la lactation que la glande mammaire termine son développement pour être fonctionnelle et produire suffisamment de lait pour le futur nourrisson.

1.2.1) Développement embryonnaire

Chez la souris, le développement de la glande mammaire débute au jour embryonnaire 10,5 (E10,5) avec la différenciation de cellules de l'ectoderme (Figure 2), qui implique la protéine PTHrP (ParaThyroid Hormone-related Protein), qui forment alors cinq paires de placodes mammaires à E11,5².

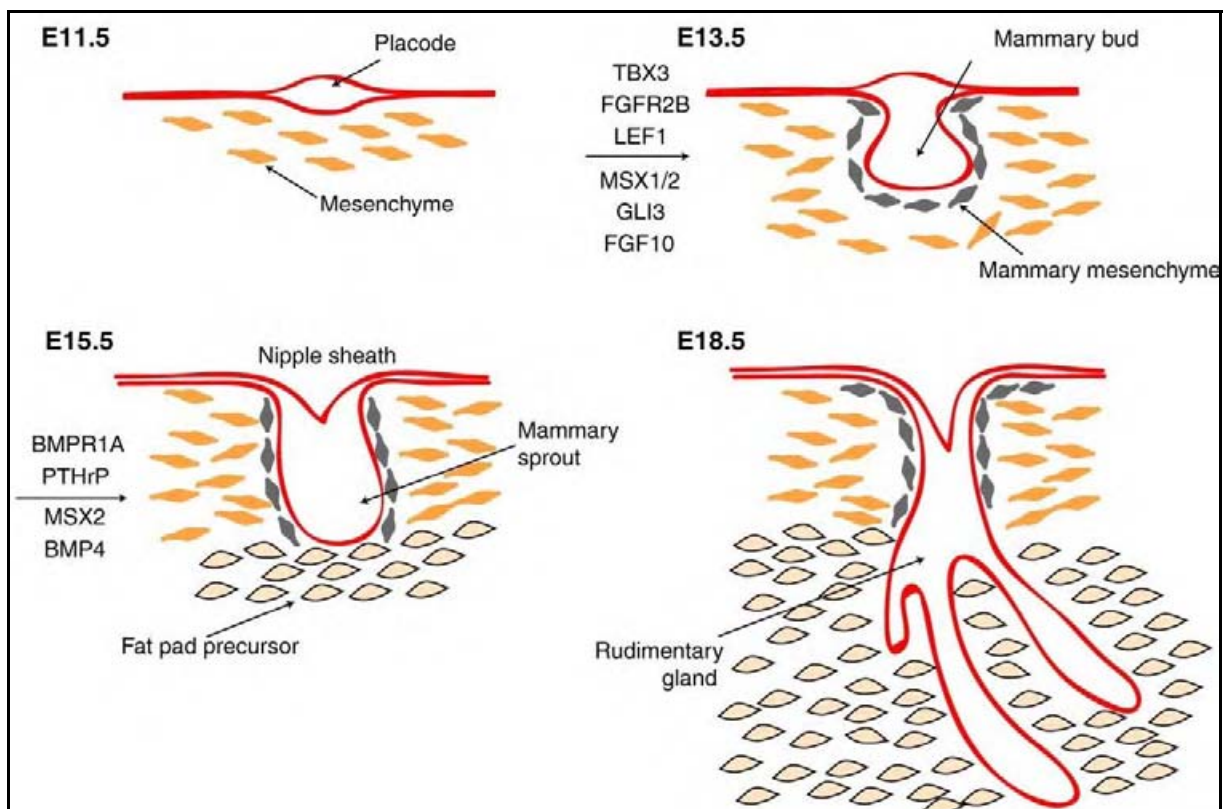


Figure 2 : Stades du développement embryonnaire de la glande mammaire chez la souris.² Chez la souris, à E11,5, les placodes mammaires apparaissent. A E13,5 un bourgeonnement mammaire se forme qui continue sa croissance jusqu'à former à E18,5 une glande mammaire rudimentaire.

Chaque placode étant à l'origine d'une glande mammaire, chez l'Homme, c'est une seule paire de placode qui se forme au cours de l'embryogenèse. A E13,5 un bourgeonnement épithélial apparaît au niveau de chaque placode, qui progresse dans le mésenchyme formant le bourgeonnement mammaire. Des cellules mésenchymateuses s'associent au bourgeonnement mammaire de manière dense et sont essentielles pour la détermination du destin des cellules épithéliales mammaires au cours du développement de la glande mammaire. A E15,5 le bourgeonnement mammaire s'allonge pour former une pousse mammaire à l'intérieur de laquelle se développe une lumière. Cette lumière présente une ouverture au niveau de la peau qui est délimitée par la formation du mamelon. A E16 la pousse mammaire se ramifie en quelques canaux qui forment à E18,5 un petit arbre mammaire de 10 à 15 courtes ramifications qui constitue la glande mammaire rudimentaire. Après la naissance, la glande mammaire rudimentaire entre dans une longue phase de quiescence morphogénétique qui dure jusqu'au début de la puberté³.

1.2.2) Puberté

Le développement de la glande mammaire reprend dès que le taux d'hormones sexuelles augmente lors de la puberté, et en particulier le taux d'oestrogènes qui ont une activité mitogène sur l'épithélium mammaire^{2,3}. Les oestrogènes, comme l'oestradiol (E2), stimulent la prolifération des cellules épithéliales mammaires afin de provoquer la croissance de l'arbre mammaire (Figure 3).

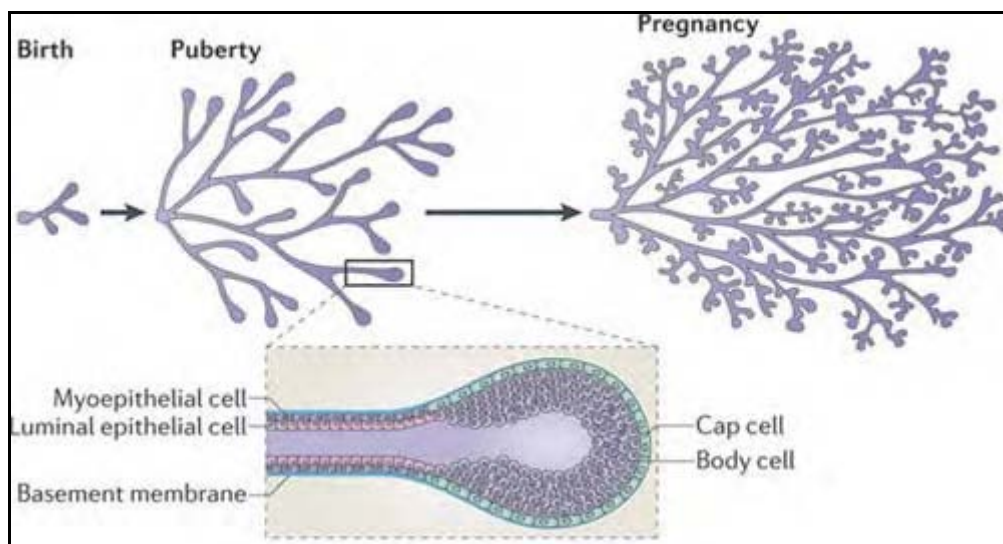


Figure 3 : Evolution morphologique de l'arbre mammaire de la naissance à la grossesse³. L'agrandissement montre un bourgeonnement terminal pendant la croissance de l'arbre mammaire au cours de la puberté. Cap cell : cellule de coiffe ; body cell : cellule de la masse bourgeonnante.

Des bourgeonnements terminaux apparaissent à l'extrémité de chaque canal mammaire et ils provoquent l'allongement de ces canaux et l'apparition de ramifications secondaires. Les bourgeonnements terminaux sont des sites de prolifération intense des cellules épithéliales mammaires pour permettre la croissance de l'arbre mammaire. Ils sont constitués de cellules de coiffe à leur extrémité et de couches multiples internes de cellules de la masse bourgeonnante. Les cellules de coiffe génèrent les cellules basales ou myoépithéliales des canaux mammaires tandis que les cellules de la masse bourgeonnante sont à l'origine des cellules luminales⁴. La croissance des bourgeonnements terminaux est couplée avec une apoptose régulée des cellules de la masse bourgeonnante, ce qui permet de créer la lumière canalaire⁵. Les canaux s'allongent jusqu'à ce qu'ils atteignent les limites du compartiment adipeux. Les bourgeonnements terminaux disparaissent provoquant l'arrêt de la croissance de l'arbre mammaire qui est désormais complet³.

1.2.3) Grossesse

Pendant la grossesse, la glande mammaire prépare la lactation qui doit être entièrement opérationnelle dès la naissance du nouveau-né. La lactation est prise en charge par des cellules luminales spécialisées dans la sécrétion de lait au niveau des alvéoles mammaires. Cependant, la glande mammaire de la femme adulte possède un arbre mammaire dépourvu d'alvéoles. Durant la grossesse, de multiples bourgeonnements alvéolaires apparaissent le long des canaux formant l'arbre mammaire pour générer les alvéoles. L'apparition des bourgeonnements alvéolaires et la formation des alvéoles mammaires dépendent de l'augmentation du taux de progestérone et de prolactine, cette dernière étant responsable de la différenciation des cellules luminales alvéolaires². Les oestrogènes ne sont pas essentielles pour le développement des alvéoles. La prolactine permet aussi la maintenance du corps jaune des ovaires qui est responsable de la sécrétion de progestérone nécessaire au développement des alvéoles. Une inactivation du récepteur de la prolactine n'empêche pas le développement des alvéoles mammaires lorsque de la progestérone est administrée aux souris mais elles sont incapables de produire du lait⁴.

1.2.4) Lactation

Le lait est un fluide riche en protéines, en glucides et en lipides qui assure une alimentation complète pour le développement du nourrisson. La protéine principalement contenue dans le lait est la caséine, et le lactose est le glucide principal. Les lipides contenus dans le lait sont essentiellement des triglycérides qui représentent une source énergétique importante pour le

nourrisson ⁶. On distingue trois sources de lipides dont disposent les cellules luminales sécrétrices pour l'incorporation de triglycérides dans le lait : les lipides provenant de l'alimentation de la mère, les lipides provenant des réserves adipocytaires et les lipides synthétisés *de novo* par la lipogenèse induite dans les cellules luminales sécrétrices. Pour favoriser la lipogenèse, le catabolisme des lipides est inhibé grâce à la répression de gènes de la β -oxydation.

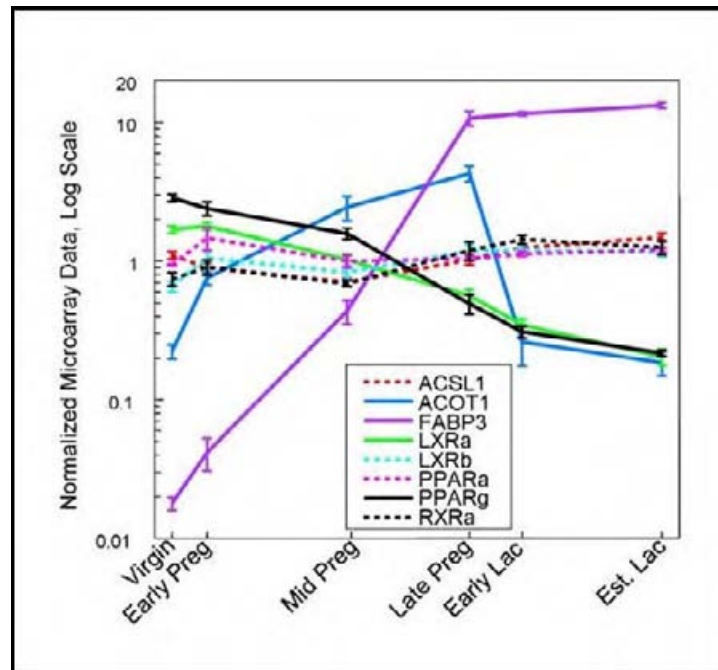


Figure 4 : Niveau d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique au cours des stades du développement adulte de la glande mammaire ⁶. L'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique est activement régulée pendant la grossesse et la lactation. L'expression de LXR α diminue au cours de la grossesse et pendant la lactation alors que l'expression de LXR β est maintenue constante. ACSL1 : Acyl-CoA Synthetase Long-chain family member 1 ; ACOT1 : Acyl-CoA Thioesterase 1 ; FABP3 : Fatty Acid Binding Protein 3 ; LXR : Liver X Receptor ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor.

Les récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator-Associated Receptors) sont des activateurs de la β -oxydation. L'expression de PPAR γ diminue avant et pendant la lactation (Figure 4), ce qui peut participer à la diminution du catabolisme lipidique, et l'enzyme Acyl CoA Thioesterase 1 (ACOT1), qui génère des acides gras libres qui peuvent activer les PPARs, est aussi réprimée. Curieusement, le Liver X Receptor α (LXR α) qui stimule la lipogenèse est réprimé avant et pendant la lactation de la même façon que PPAR γ tandis que les expressions de LXR β et PPAR α restent constantes. Lors de l'activation de la sécrétion dans les cellules luminales sécrétrices, la kinase mitogène Akt1 est activée. Son activation

stabilise le facteur de transcription lipogénique SREBP-1c qui est capable de stimuler la transcription des principaux gènes nécessaires à la lipogenèse. Ce mécanisme peut donc être une des principales voies utilisées pour la stimulation de la lipogenèse pour l'apport de triglycérides dans le lait.

1.2.5) Involution

Après la lactation, la glande mammaire subit l'involution qui est un retour de la physiologie mammaire à un état pré-gestationnel. Cela implique une réduction très importante de la masse mammaire par l'apoptose d'environ 90% des cellules épithéliales mammaires ⁷ qui sont remplacées par du tissu adipeux ⁸. Plusieurs phases existent au cours de l'involution. La première phase est un déclenchement de l'apoptose de cellules épithéliales mammaires dépendante de p53 et provoquée par l'accumulation du lait dans la glande mammaire ⁸. Cette phase est réversible durant 48 heures par une reprise de l'activité de succion du nourrisson au sein. La seconde phase est une apoptose irréversible provoquée par des hormones lactogéniques et dépendante de protéinases de la famille des MMPs (Matrix MetalloProteases) qui dégradent la membrane basale entourant les structures lobulaires. Cela provoque un remodelage total de la glande mammaire qui redevient un arbre mammaire dépourvu d'alvéoles. La dernière phase est une croissance du tissu adipeux qui remplace les zones précédemment occupée par les alvéoles mammaires ⁸.

1.3) Mécanismes moléculaires du développement de la glande mammaire

1.2.5) Hiérarchie cellulaire dans la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire peut être initié par une seule cellule souche mammaire, qui occupe une position basale dans l'épithélium mammaire (Figure 5A), et capable de générer une glande mammaire fonctionnelle chez la souris ^{9, 10}. Cela suggère l'existence d'une hiérarchie cellulaire où une cellule souche mammaire se situe au début d'un schéma de différenciation cellulaire qui génère l'ensemble des types cellulaires de la glande mammaire adulte (Figure 5B). Le schéma proposé actuellement est une différenciation des cellules souches mammaires en trois types de progéniteurs : l'un engagé dans la génération des cellules myoépithéliales des canaux mammaires, un deuxième dans la génération des cellules luminales canalaire et le troisième type de progéniteurs impliqué dans la formation des alvéoles grâce à sa capacité à se différencier en cellule myoépithéliale alvéolaire et en

cellule lumaire alvéolaire ¹¹. Le facteur de transcription Gata-3, qui est impliqué dans la différenciation de nombreux types cellulaires, est nécessaire à la génération et au maintien du phénotype luminal. En effet, sa délétion dans l'épithélium mammaire adulte conduit à une perte de l'état différencié des cellules lumaire. La protéine ΔN-p63 qui est sous le contrôle de la voie Sonic Hedgehog serait impliquée dans la génération de la lignée myoépithéliale mais son rôle dans cette voie de différenciation n'est pas bien défini ^{11,12}.

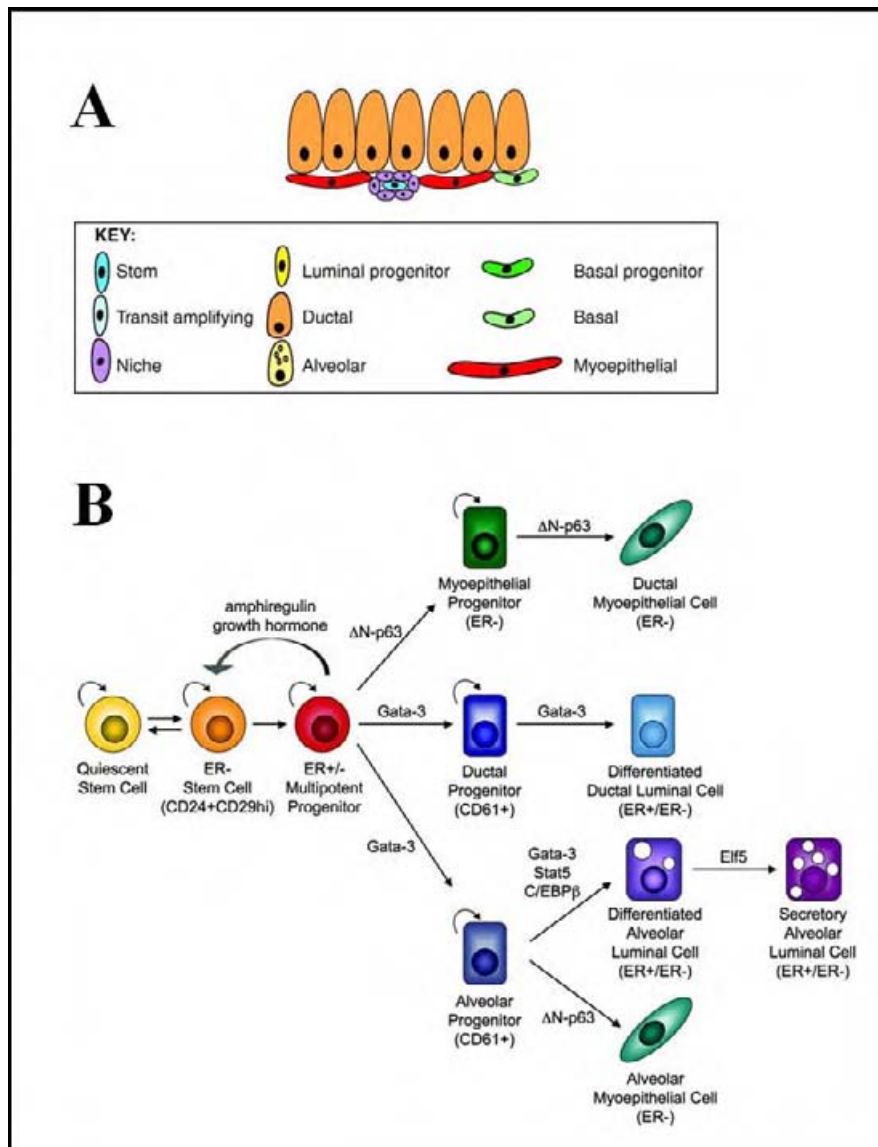


Figure 5 : Hiérarchie cellulaire dans la glande mammaire. A. Organisation des différents types cellulaires dans le tissu mammaire ². B. Schéma de différenciation des types cellulaires de la glande mammaire ¹¹. ER : Estrogen Receptor ; CD : Cluster of Differentiation ; STAT5 : Signal Transduction Activated Transcription factor 5 ; C/EBPβ : CCAAT Enhancer Binding Protein β.

1.3.1) Le récepteur des oestrogènes

Les hormones sexuelles féminines (Figure 6) et leur récepteur ont un rôle central dans le développement de la glande mammaire. Chez la femme, environ 15 à 25% des cellules

épithéliales mammaires expriment le récepteur des oestrogènes ¹³. Deux isotypes du récepteur des oestrogènes existent : le récepteur des oestrogènes α (ER α) et β (ER β). Un knockout d'ER α provoque un développement hypoplasique de l'arbre mammaire, tout comme une ovariectomie qui supprime la production d'oestrogènes ³. L'invalidation génétique d'ER β n'a pas d'incidence sur le développement de l'arbre mammaire. Les deux isotypes du récepteur des oestrogènes ne sont pas impliqués dans le développement des alvéoles mammaires ⁴.

La voie de signalisation des oestrogènes stimule la prolifération cellulaire des cellules mammaires. Pourtant, dans l'épithélium mammaire, les cellules qui expriment ER α ne prolifèrent pas. Ce sont les cellules ER α - qui prolifèrent, ce qui suggère un mode d'action paracrine des oestrogènes. Paradoxalement, une exposition forte aux oestrogènes avant la ménopause a un effet plus fort sur l'apparition de tumeurs ER- que sur l'apparition de tumeurs ER+. Après la ménopause, qui est caractérisée par un arrêt de la production d'oestrogènes, l'incidence de cancers mammaires ER- diminue alors que l'apparition de cancers mammaires ER+ continue d'augmenter ¹⁴. De récentes études pourraient apporter quelques explications à ces effets qui semblent paradoxaux. Les cellules souches mammaires n'expriment pas ER α ni le récepteur de la progestérone (PR), mais leur nombre et leur capacité de régénération de la glande mammaire dépend des oestrogènes et de la progestérone ¹⁵. La fonction de régénération des cellules souches dépend d'une augmentation de leur taux de prolifération, et elles pourraient être une cible importante et indirecte des oestrogènes sur la croissance de l'épithélium mammaire. Un mécanisme d'action paracrine des oestrogènes sur la prolifération des cellules souches mammaires a été caractérisé ¹⁶. Les cellules luminales qui expriment ER α stimulent l'expression de l'amphiréguline lorsqu'elles sont en présence d'oestrogènes ¹⁷. L'amphiréguline provoque la sécrétion d'un facteur encore inconnu par des cellules stromales mammaires qui expriment l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Ce facteur stimule ensuite la prolifération des cellules souches mammaires ^{14, 17, 18}. Cela permettrait d'expliquer l'action indirecte des oestrogènes sur la prolifération du tissu mammaire sain.

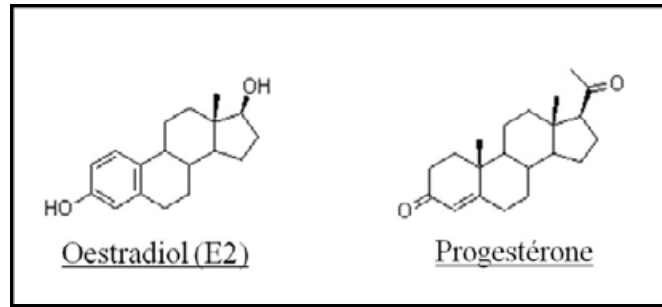


Figure 6 : Hormones sexuelles féminines. Les deux principales hormones stéroïdiennes responsables du développement de la glande mammaire : l'oestradiol et la progestérone qui se lient respectivement sur le récepteur des oestrogènes et le récepteur de la progestérone.

1.3.2) Le récepteur de la progestérone

Le récepteur de la progestérone est représenté par deux isotypes : PR α et PR β . L'action de la progestérone sur le développement mammaire est différente des oestrogènes. L'inactivation génétique de PR a un effet mineur sur le développement canalaire mais empêche le développement alvéolaire de la glande mammaire contrairement à l'inactivation d'ER qui empêche uniquement le développement canalaire. Seule l'inactivation de PR β affecte le développement alvéolaire de la glande mammaire, l'inactivation de PR α n'a aucun effet rapporté sur la glande mammaire⁴. PR est nécessaire pour la génération de ramifications des canaux mammaires ainsi que pour la morphogenèse alvéolaire¹⁹.

Comme les oestrogènes, l'action de la progestérone sur le tissu mammaire passe par un mode paracrine²⁰. La progestérone a une action mitogène sur le tissu mammaire mais les cellules qui expriment PR ne prolifèrent pas. La progestérone stimule la prolifération des cellules souches mammaires, qui ont un statut PR-, par une action paracrine¹⁵. Les cellules mammaires luminales expriment PR qui stimule l'expression de RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand) sous l'action de la progestérone. RANKL agit ensuite sur les cellules souches mammaires qui expriment le récepteur de RANKL en stimulant leur prolifération. D'autre part, la génération de ramifications alvéolaires par la progestérone est aussi paracrine puisque les cellules PR+ stimulent l'expression de Wnt-4 qui agit sur des cellules PR- responsables de ces ramifications²¹. De la fin de la grossesse jusqu'à la parturition, le taux de progestérone diminue et cela est corrélé avec l'activation de la sécrétion de lait par la glande mammaire. La progestérone a un effet inhibiteur sur la différenciation terminale des cellules alvéolaires qui les empêche d'activer leur capacité sécrétoire. Par conséquent, la diminution du taux de progestérone provoque la différenciation des cellules alvéolaires luminales qui peuvent produire le lait et cela contribue à la transition de la grossesse à la lactation¹⁹.

2) Les cancers du sein

En France, le cancer touche 350.000 personnes par an et il est responsable de 146.000 décès, ce qui en fait la première cause de mortalité. Chez la femme, le cancer du sein est le plus fréquent avec 42.000 nouveaux cas par an en France et environ 11.000 décès (source : www.ligue-cancer.net). Plusieurs thérapies existent contre les cancers du sein mais la réponse anticancéreuse provoquée par ces traitements est spécifique de certains types de cancers mammaires et de leur stade d'avancement. Des efforts considérables sont produits pour établir une classification pertinente des cancers du sein, dépendante de la découverte de nouveaux marqueurs de réponse aux thérapies, qui permettrait de faire correspondre une stratégie thérapeutique clinique à un type de cancer précis et bien défini décelé chez la patiente.

2.1) Les types de cancers du sein

2.1.1) Classification histologique

La classification des cancers du sein est complexe à cause de l'hétérogénéité qui caractérise ces cancers. La définition du profil histologique d'un cancer est la première approche utilisée pour le classer ²². Les premières caractéristiques observées sont la taille de la tumeur, l'atteinte des ganglions périphériques (ou ganglions sentinelles) et la présence de métastase qui définissent le grade tumoral. L'analyse histologique de la tumeur permet d'identifier la localisation tissulaire de la tumeur ainsi que ses limites. En fonction de la morphologie tissulaire de la tumeur, les cancers du sein peuvent être grossièrement divisés en cancers lobulaires, qui présentent des caractéristiques proches des alvéoles mammaires, et en cancers canaux dont le profil se rapproche des canaux mammaires. Cependant cela ne veut pas dire que ces cancers proviennent des lobules ou des canaux mammaires puisque l'origine histologique de la majorité des cancers du sein se situerait au niveau de l'extrémité terminale des canaux mammaires, là où l'activité de prolifération cellulaire est la plus forte lors de la croissance de l'arbre mammaire pendant la puberté et à chaque cycle menstruel. D'autres caractéristiques tissulaires permettent de préciser la taxonomie des cancers du sein, comme par exemple la présence de plusieurs types cellulaires cancéreux dans les carcinomes métaplasiques ou alors l'observation d'une tumeur composée de cellules de petite taille dans les carcinomes à petite cellule. Actuellement, le nombre considéré de types histologiques de cancers du sein est d'au moins 17 avec environ 50 à 80% des cancers du sein qui sont classés parmi les cancers invasifs canaux à cause d'une absence de caractéristique discriminante ²². Même si la classification histologique est nécessaire pour définir un profil général de cancer

du sein, une classification moléculaire des cancers du sein rend compte plus précisément du type de cancer du sein.

2.1.2) Classification moléculaire

Les cancers du sein sont principalement classés selon le profil d'expression d'ER et du récepteur HER2 qui appartient à la famille de l'EGFR (Figure 7) ²³. En clinique, la classification moléculaire des cancers du sein, qui est en amélioration constante grâce à la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires, aide les cliniciens à choisir la stratégie thérapeutique la plus adaptée contre chaque type de cancer du sein auquel ils sont confrontés. Malgré l'effort permanent fourni par les biologistes et les cliniciens pour créer une nouvelle classification moléculaire plus efficace d'un point de vue pronostique et prédictif de la réponse à la chimiothérapie ²⁴, la classification des cancers du sein a relativement peu changé en dix ans depuis l'étude transcriptomique de Perou *et al.* ²³ et depuis la division des cancers du sein en cinq sous-types par Sorlie *et al.* ²⁵

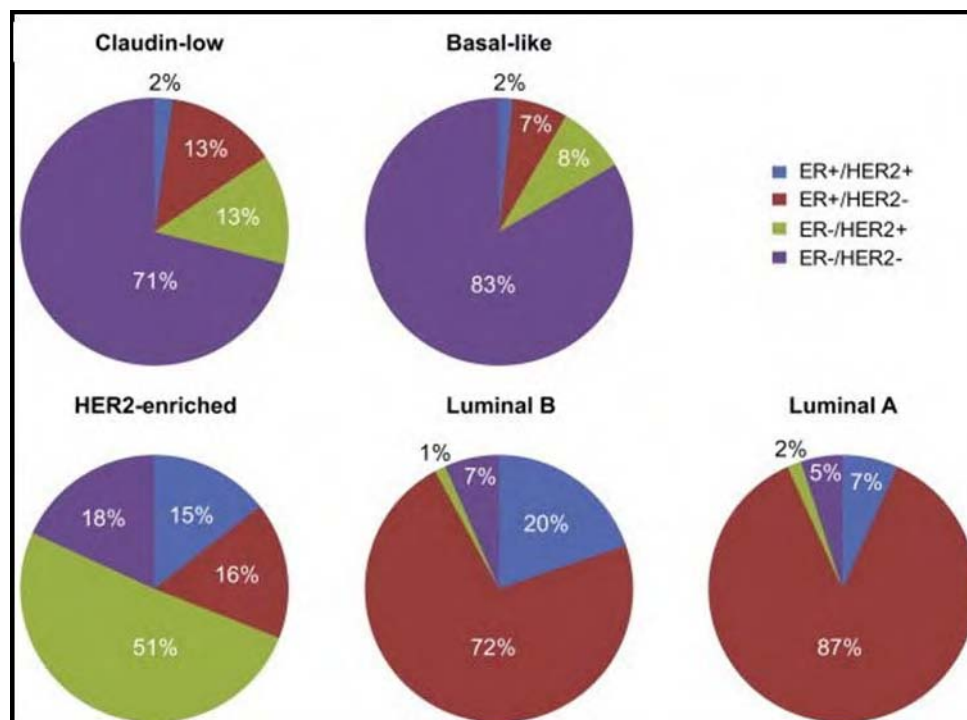


Figure 7 : Proportion de l'expression d'ER et HER2 pour les principaux groupes de cancers du sein selon la classification moléculaire actuelle ²⁶. Les cancers du sein sont principalement classés en fonction de l'expression du récepteur des oestrogènes (ER), du récepteur de la progestérone et du récepteur de la famille de l'EGFR (HER2).

Au cours de l'étude de Perou *et al.*, une analyse du profil transcriptomique de tumeurs de 42 individus a permis de dresser un classement des cancers du sein selon l'expression de

marqueurs communs dont les principaux sont ER et HER2. Dans la glande mammaire, les cellules dites basales, c'est-à-dire les cellules myoépithéliales qui bordent la membrane basale, expriment les cytokératines 5 et 6, alors que les cellules luminales, en contact avec la lumière alvéolaire ou canalaire, expriment les cytokératines 8 et 18. Par conséquent, ces cytokératines servent de marqueurs moléculaires de chacun de ces deux types cellulaires mammaires. Perou *et al.* ont observé que des tumeurs ER+ expriment les cytokératines 8 et 18, ce qui a conduit les auteurs à les classer dans le groupe luminal. Des tumeurs n'exprimant pas ER sont positives pour les cytokératines 5 et 6 ce qui les place dans le groupe basal. Dans leur analyse, ils ont aussi découvert un groupe de tumeurs surexprimant le récepteur HER2 de la famille de l'EGFR. Les tumeurs mammaires surexprimant HER2 n'expriment pas ER, ce qui les rapproche du groupe basal. Cependant, une proportion de tumeurs ER- ne surexprime pas HER2 ce qui a motivé la création d'un troisième groupe : le groupe HER2+. Un quatrième groupe a été créé dans lequel les tumeurs mammaires expriment fortement des gènes caractéristiques de cellules épithéliales basales et expriment faiblement des gènes caractéristiques de cellules épithéliales luminales : il s'agit du groupe « normal-like » (qui ressemble à la glande mammaire normale) ²³. Un an plus tard, Sorlie *et al.* affinent la classification des cancers du sein établie par Perou *et al.* en divisant le groupe luminal en deux sous-groupes : luminal A et luminal B qui se différencient au niveau de plusieurs marqueurs moléculaires ce qui a permis de les discriminer et d'améliorer la capacité prédictive de cette classification ²⁵. Un groupe de cancer a été ajouté à cette classification, le groupe Claudin-low (Figure 7) ²⁶. Il est caractérisé par une faible expression de Claudin, qui est bien exprimée dans les autres groupes de cancers. Les cellules souches mammaires seraient à l'origine de ce type de cancer puisque ces cellules expriment peu Claudin. La pertinence de la répartition des cancers du sein selon cette classification a été observée puisqu'elle permet une prédiction des résultats cliniques sur des patientes traitées atteintes de cancers du sein ^{27, 28}.

2.1.3) Les cellules souches cancéreuses mammaires

La difficulté dans la classification des cancers du sein réside essentiellement dans l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs mammaires. Les profils transcriptionnels réalisés sur les tumeurs de patientes et permettant d'inclure de nouveaux marqueurs moléculaires sont effectués sur l'ensemble de la tumeur et renseignent uniquement sur la tendance transcriptionnelle de l'ensemble des populations cellulaires constituant une tumeur. Les cancers évoluent par sélection clonale ce qui peut faire apparaître plusieurs populations cellulaires au sein d'une tumeur ce qui peut retracer son histoire évolutive ou témoigner de la

coévolution de plusieurs populations cancéreuses. Aussi, l'instabilité génétique est généralement une caractéristique majeure des cancers qui peut provoquer une diversité génétique des populations cellulaires cancéreuses²⁹. Une hypothèse souvent énoncée dans la littérature scientifique est que des cellules souches cancéreuses mammaires pourraient être à l'origine de l'hétérogénéité des cancers du sein³⁰. L'hétérogénéité des tumeurs mammaires pourrait résulter d'une différenciation anarchique des cellules souches cancéreuses mammaires ce qui générerait plusieurs populations cellulaires. Une des voies de différenciation cellulaire utilisées pour la morphogenèse mammaire pourrait être préférentiellement empruntée par les cellules souches cancéreuses, peut-être à cause d'évènements oncogénétiques particuliers, ce qui conduirait à l'émergence d'une population cellulaire majoritaire. Cette population pourrait représenter la classe à laquelle la tumeur s'apparente le mieux. Par exemple, les cancers luminal A sont plus différenciés que les cancers luminal B qui contiennent une proportion de progéniteurs mammaires ER+ plus élevée. L'un des marqueurs permettant la discrimination des cancers luminal A est GATA-3 qui est un facteur de transcription impliquée dans la différenciation des progéniteurs ER+ en cellules luminales différenciées³¹. Cela peut suggérer que des cellules souches cancéreuses sont à l'origine de ces deux types de cancer du sein en s'arrêtant plus ou moins tôt dans le schéma de différenciation cellulaire de l'épithélium mammaire. Dans ce cas, c'est la population cellulaire résultante de la différenciation des cellules souches cancéreuses mammaires qui permet de classer la tumeur. Cela peut biaiser la classification moléculaire des cancers du sein car ce n'est peut-être pas la bonne population qui est visée pour l'obtention de résultats pronostiques et prédictifs. Cependant, la question de l'origine des cellules souches cancéreuses mammaires subsiste. Est-ce que les cellules souches cancéreuses mammaires apparaissent suite à la transformation de cellules souches mammaires ou suite à une dédifférenciation survenant au cours de l'oncogenèse de cellules différenciées qui les transforme en cellules souches cancéreuses ? Dans la glande mammaire saine, les cellules souches sont capables de reconstituer une glande mammaire fonctionnelle⁹, ce qui montre que ces cellules ont la capacité de générer l'ensemble des types cellulaires mammaires dont semblent dériver les cancers du sein et sur lesquels se basent les classifications moléculaires actuelles. Toutefois, il a été montré que des cellules mammaires immortalisées subissant une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) acquièrent des propriétés de cellules souches³². L'EMT est un processus naturel qui confère à des cellules épithéliales les capacités migratoires de cellules mésenchymateuses. Ce processus est détourné par les cellules cancéreuses pour envahir les tissus adjacents de la tumeur et atteindre la circulation sanguine.

Cela suggère que des cellules cancéreuses peuvent devenir des cellules souches cancéreuses au cours de l'oncogenèse. Les cellules souches cancéreuses peuvent donc avoir deux origines opposées : provenir de cellules souches qui subissent l'oncogenèse ou au cours de l'oncogenèse de cellules différenciées.

2.1.4) L'origine des cancers du sein

Le statut d'ER dans l'histoire naturelle des cancers du sein est ambigu. En effet, dans la glande mammaire, les cellules ER+ ne prolifèrent pas alors que l'on retrouve des cancers du sein ER+ ce qui suggère que des cellules ER+ acquièrent une capacité à proliférer, ou que des cellules ER- qui prolifèrent expriment ER au cours de l'oncogenèse. Des études du groupe de Cathrin Brisken ont montré que les cellules mammaires ER+ ne seraient pas les cibles directes de la stimulation mitogénique des oestrogènes ¹⁶. Indirectement, ce sont les cellules souches mammaires ER- qui seraient stimulées par les oestrogènes ¹⁵. Il est bien établi que les oestrogènes ont un effet promoteur de tumeur à cause de leur capacité à stimuler la prolifération du tissu mammaire. Par exemple, une augmentation de l'exposition aux oestrogènes causée par une puberté précoce et/ou une ménopause tardive augmente les risques de développer un cancer du sein. Curieusement, la ménopause qui se traduit par un arrêt de la production d'oestrogènes par les ovaires provoque une rapide diminution de l'incidence des cancers du sein ER- mais a peu d'effet sur l'incidence des cancers du sein ER+, ce qui suggère que les oestrogènes ciblent des cellules ER- dans leurs effets de promotion tumorale ¹⁴. Ajouté à cela le fait que les tumeurs mammaires sont hétérogènes, cela suggère que les cellules souches mammaires pourraient être à l'origine d'une proportion significative de cancers du sein. En faveur de cette hypothèse, la majorité des cancers du sein émergent des bourgeonnements terminaux ²² qui sont des sites de forte croissance durant la puberté pour générer l'arbre mammaire, et à chaque cycle menstruel ⁴. L'activité de croissance de ces bourgeonnements terminaux est dépendante des oestrogènes et ce sont les cellules souches mammaires qui prolifèrent à leur extrémité et qui se différencient, au cours de l'élongation des canaux mammaires, en cellule luminaire ou en cellule myoépithéliale ⁵. Même si de nombreux éléments sont en faveur d'une origine souche des cancers du sein, des cellules mammaires différenciées ou des progéniteurs mammaires peuvent aussi être à l'origine de cancers mammaires ³⁰. Par conséquent, la cellule souche mammaire n'est probablement pas à l'origine de tous les types de cancers du sein.

2.2) L'hormonothérapie

Les cancers du sein qui expriment le récepteur des oestrogènes représentent 60% des cancers du sein chez la femme âgée de moins de 50 ans et 80% chez la femme âgée de plus de 50 ans³³. La dépendance des cancers du sein ER+ à la présence d'oestrogènes, appelée l'hormono-dépendance, a inspiré la mise au point de thérapies ciblant la voie de signalisation des oestrogènes³⁴. Ce type de thérapie s'appelle l'hormonothérapie qui regroupe actuellement trois groupes de thérapies anti-oestrogéniques (Figure 8) : les modulateurs du récepteur des oestrogènes (SERMs : Selective Estrogen Receptor Modulators), l'antagoniste pur du récepteur des oestrogènes l'ICI 182,780 ou Fulvestrant (SERD : Selective Estrogen Receptor Downregulator) et les inhibiteurs d'aromatase.

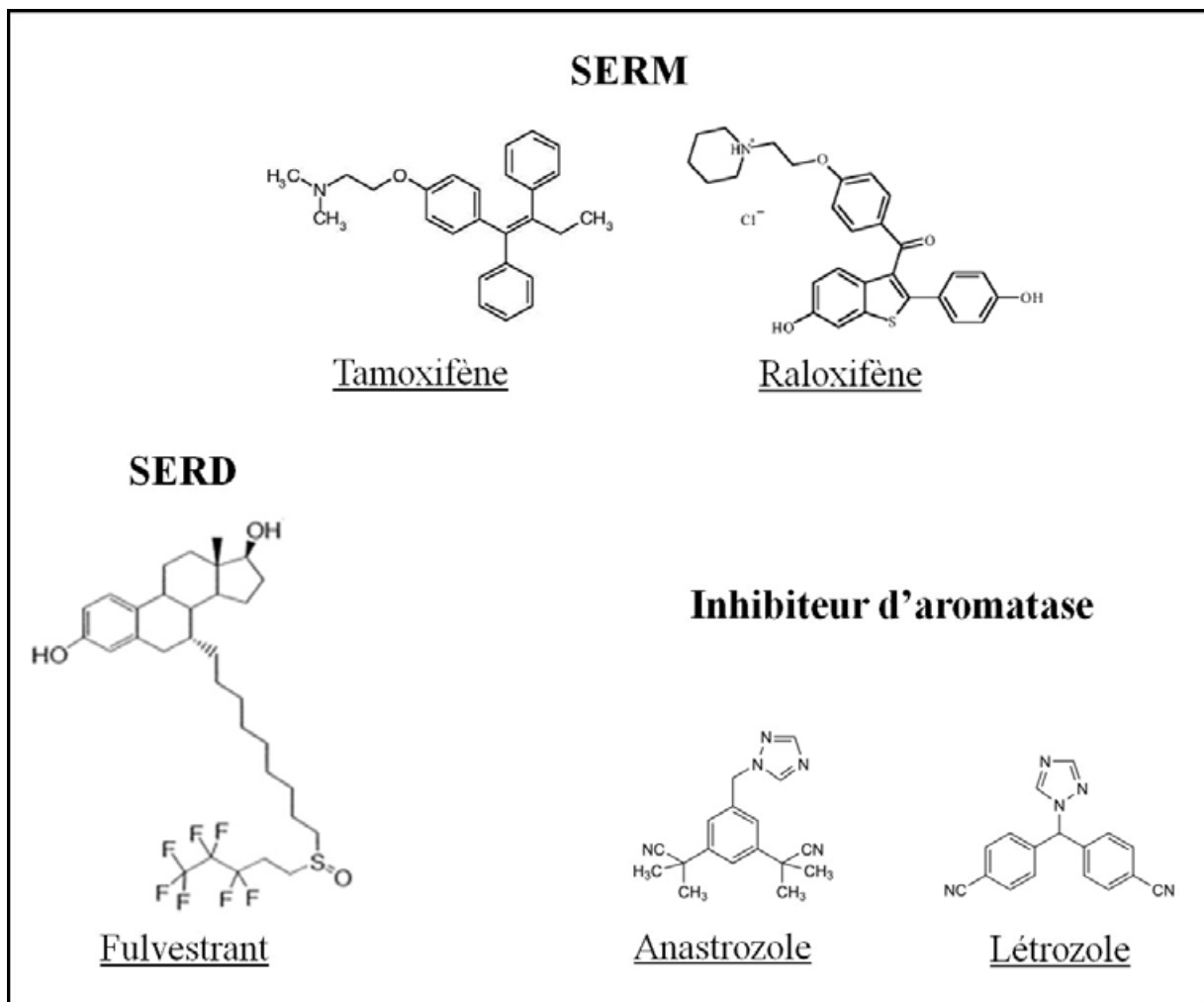


Figure 8 : Principales classes d'agents utilisés en hormonothérapie. L'hormonothérapie des cancers du sein repose sur trois classes d'agents thérapeutiques qui ciblent la signalisation des oestrogènes : les SERMs, les SERDs et les inhibiteurs d'aromatase.

2.2.1) Les SERMs

L'un des premiers SERM découvert est le tamoxifène qui est le meilleur SERM actuellement utilisé en hormonothérapie des cancers du sein ER+ (Figure 8)^{33, 35}. Le tamoxifène est utilisé en thérapie de première ligne, c'est-à-dire que le tamoxifène est le premier traitement administré aux patientes atteintes de cancers du sein hormono-dépendants. Lorsque le tamoxifène se lie à ER, il antagonise l'effet mitogène des oestrogènes et il provoque l'arrêt de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires ER+³⁶. Grâce à son action anti-proliférative, un traitement de 5 ans de patientes atteintes de cancers du sein ER+ par le tamoxifène provoque une réduction de la mortalité de 34%³³. Le tamoxifène agit aussi sur d'autres tissus : il diminue la perte osseuse³⁷, il peut provoquer une hypertriglycémie et stimuler l'oncogenèse de l'endomètre³⁸.

2.2.2) Le Fulvestrant

Le fulvestrant (Figure 8) est considéré comme un SERD (Selective Estrogen Receptor Downregulator) c'est-à-dire qu'il inhibe entièrement ER en l'empêchant de se dimériser et en provoquant sa dégradation³⁹. Le fulvestrant est utilisé comme traitement de deuxième ou de troisième ligne contre les cancers du sein ER+⁴⁰. Les résistances au fulvestrant apparaissent plus tardivement que les résistances au tamoxifène. Aussi, lorsque des cancers du sein ER+ deviennent résistants au tamoxifène par des mécanismes impliquant une activation du récepteur des oestrogènes indépendante de la fixation du ligand, le fulvestrant n'est pas limité par ces résistances puisqu'il provoque la dégradation d'ER⁴⁰. Il a été montré *in vitro* que le développement d'une résistance acquise au fulvestrant par des cellules cancéreuses mammaires ER+ confère une résistance croisée avec le tamoxifène⁴¹. Néanmoins, aucune étude clinique n'a relevé à ce jour cette résistance croisée.

2.2.3) Les inhibiteurs d'aromatase

L'aromatase est une enzyme de la stéroïdogénèse qui catalyse la transformation des androgènes en oestrogènes⁴². Des inhibiteurs d'aromatase, tels que l'anastrozole et le létrozole (Figure 8), ont été développés pour empêcher la production d'oestrogènes contre les cancers du sein ER+ en traitement de première ligne chez la femme post-ménopausée. Ces inhibiteurs ne sont pas utilisés chez la femme pré-ménopausée car ils empêchent le rétrocontrôle négatif des oestrogènes sur la stimulation ovarienne par l'hypothalamus³³. Un traitement de cinq ans avec l'anastrozole chez des patientes post-ménopausée atteintes de

cancers du sein ER+ augmente leur survie de 40% ⁴³. Il a été montré que sur les femmes post-ménopausées, le létrozole à une efficacité supérieure au tamoxifène ⁴⁴, ce qui fait des inhibiteurs d'aromatase le traitement de référence contre les cancers du sein ER+ chez la femme post-ménopausée ⁴³.

3) Le tamoxifène : pionnier de l'hormonothérapie

3.1) Découverte du tamoxifène

Dans les années 1960, alors que la compagnie ICI Pharmaceuticals cherche de nouveaux agents contraceptifs, Michael Harper et Arthur Walpole synthétisent un triphényléthylène appelé ICI-46,474 ⁴⁵, plus tard appelé tamoxifène. Le tamoxifène présente des propriétés anti-ovulatoire chez le rat ⁴⁶ mais il est pro-ovulatoire chez la souris. Il est décrit quelques années plus tard comme une molécule capable d'induire l'ovulation chez la femme ⁴⁷. Considérant l'objectif initial de la compagnie ICI Pharmaceuticals, le tamoxifène est un échec comme contraceptif. Cependant, Arthur Walpole est intéressé par le développement de thérapies anti-cancéreuse ce qui lui permet de découvrir au cours d'un bref essai clinique que le tamoxifène a des propriétés anti-cancéreuses sur des tumeurs mammaires de patientes ⁴⁸. Malgré cela, l'intérêt d'ICI Pharmaceuticals pour le tamoxifène reste faible pour des raisons de rentabilité financière ³⁵.

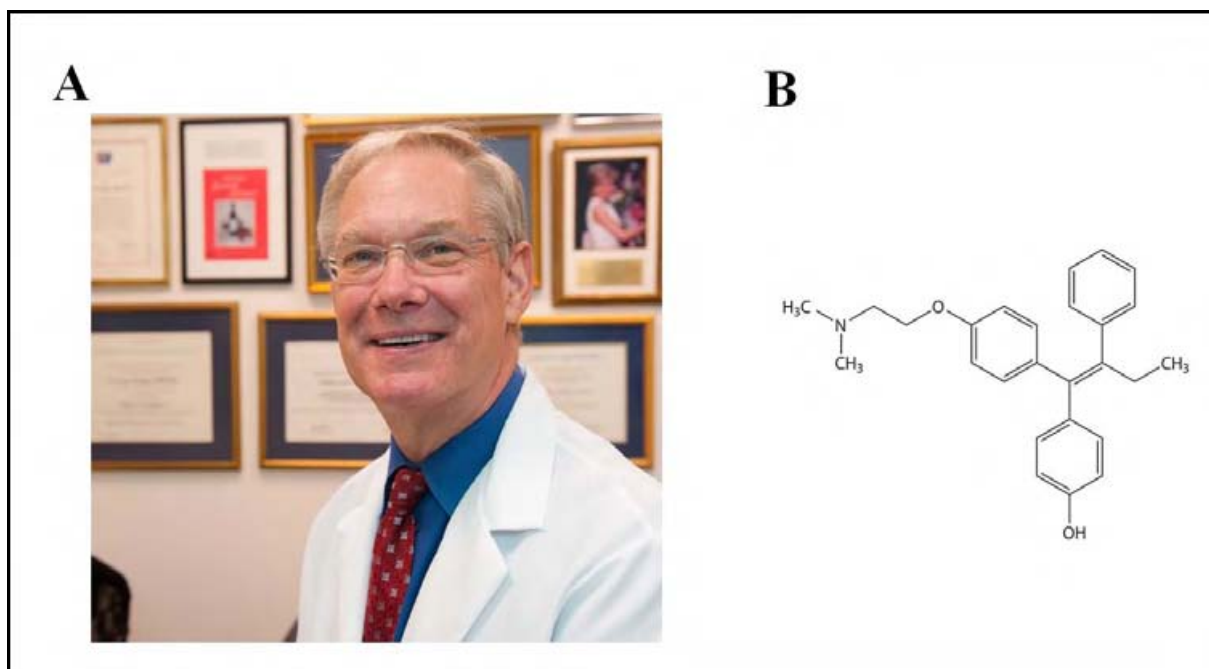


Figure 9 : V. Craig Jordan et le 4-hydroxytamoxifène. En 1977, V. Craig Jordan montre que le tamoxifène est métabolisé en 4-hydroxytamoxifène.

V.Craig Jordan (Figure 9) est recruté à la fondation Worcester comme scientifique indépendant pour développer les anti-oestrogènes en thérapie anti-cancéreuse mammaire. Il s'intéresse au tamoxifène et montre sur un modèle de carcinome mammaire chimiquement induit chez le rat que le tamoxifène a des propriétés anti-cancéreuses ⁴⁹. Il découvre aussi que le tamoxifène est métabolisé en 4-hydroxytamoxifène (Figure 9) qui a une affinité plus élevée pour le récepteur des oestrogènes, le tamoxifène est alors considéré comme une pro-drogue ⁵⁰. En 1980, V.Craig Jordan montre que le 4-hydroxytamoxifène est un métabolite actif du tamoxifène puisqu'il a des effets anti-cancéreux supérieurs sur des cancers mammaires de rat ⁵¹. Grâce à la communication des résultats obtenus en laboratoire aux cliniciens en charge d'un essai clinique sur le tamoxifène, le tamoxifène est testé pendant deux ans sur des patientes atteintes de cancers du sein exprimant le récepteur des oestrogènes ⁵². Lors de cet essai clinique, le tamoxifène a été démontré comme un agent thérapeutique prometteur pour le traitement des cancers du sein ER+, ce qui a motivé son application clinique pour le traitement à grande échelle de ces cancers. Désormais, on considère que plus d'un million de femmes dans le monde sont actuellement en vie grâce au tamoxifène ⁵³.

3.2) Mécanisme d'action du tamoxifène

3.2.1) Mode d'action génomique

Les oestrogènes comme l'oestradiol (E2) exercent leur action physiologique en se liant à leur récepteur intracellulaire ER. Cette liaison provoque un changement conformationnel d'ER cytoplasmique qui s'homodimérise et entre dans le noyau (Figure 10A). Il se lie sous forme de dimère à un élément de réponse d'ER (ERE : Estrogen Receptor response Element) présent dans le promoteur de ses gènes cibles. ER lie des coactivateurs transcriptionnels qui à leur tour recrute la machinerie générale de transcription. La fixation d'E2 à ER provoque ainsi l'activation des gènes sous le contrôle d'ER ¹³. ER peut aussi activer indirectement ses gènes cibles en interagissant avec les facteurs de transcription AP-1 ou Runx1 ⁵⁴. Parmi les gènes cibles d'ER, on compte des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Figure 10B) tel que la Cycline D1 qui expliquent les effets mitogènes des oestrogènes dans ses tissus cibles, ainsi que des gènes impliqués dans la survie cellulaire tel que Bcl-2 ⁵⁵.

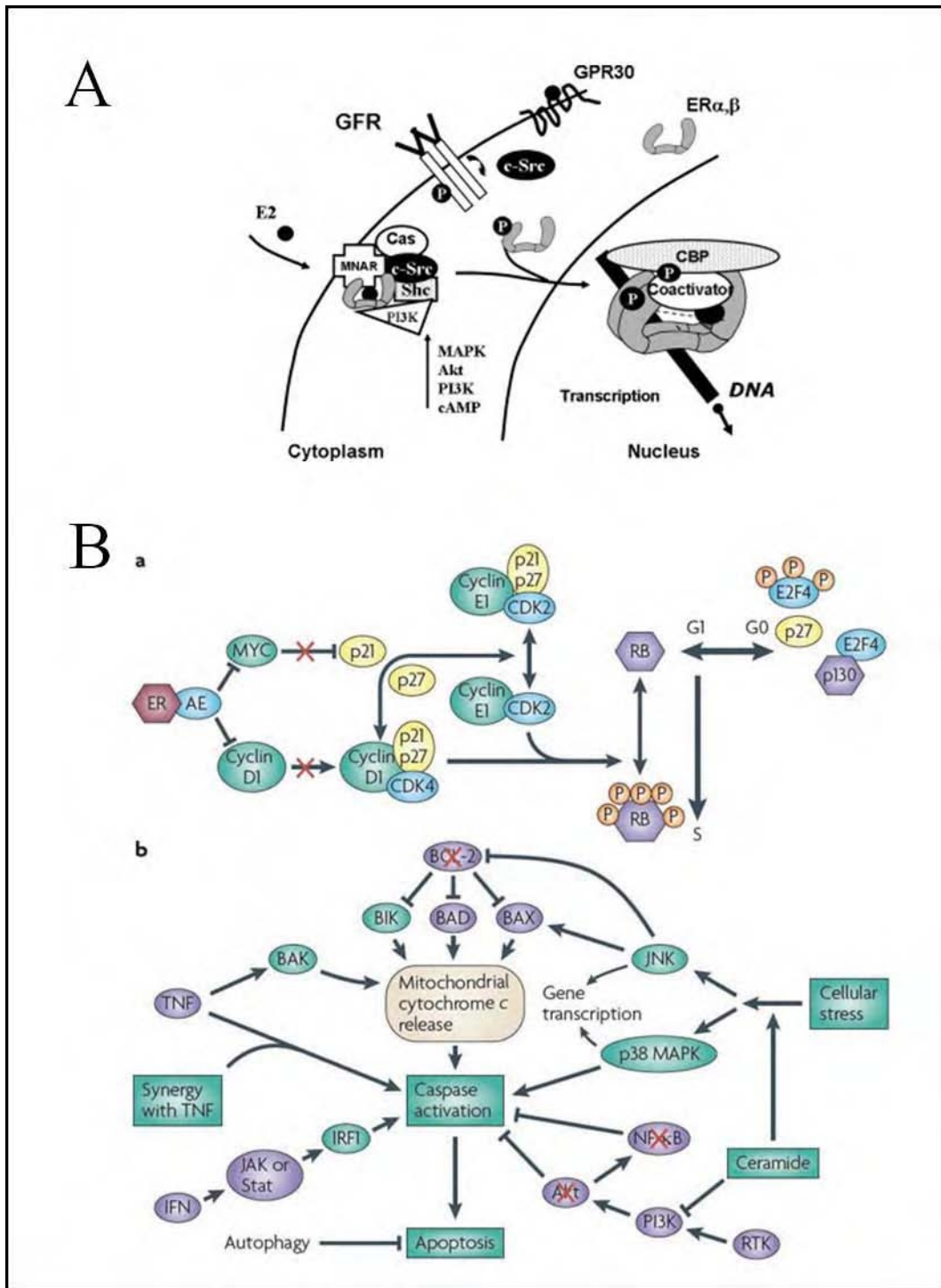


Figure 10 : Mode d'action génomique et non génomique des oestrogènes et du tamoxifène. A. Mécanismes d'action non génomiques des oestrogènes via le récepteur des oestrogènes et GPR30³⁶. B. Mécanismes d'action génomiques du tamoxifène sur la prolifération cellulaire (a) et sur la mort cellulaire (b)⁵⁶. Les croix rouges montrent les gènes dont l'expression est inhibée par le tamoxifène. ER : Estrogen Receptor ; GPR30 : G Protein coupled Receptor 30.

Les SERMs comme le tamoxifène ou le raloxifène se lient aussi à ER mais ils induisent une conformation du récepteur différente de celle adoptée lorsqu'il est lié à E2, ce qui provoque leur effet antagoniste ou agoniste partiel sur la signalisation oestrogénique⁵⁷. Dans le tissu mammaire, le tamoxifène inhibe l'activation de gènes cibles d'ER par E2 et aussi il stimule

l'expression de PR qui bloque la stimulation mitogénique induite par E2³⁴. Par ce mécanisme, le tamoxifène est capable d'inhiber la prolifération et la survie des cellules cancéreuses mammaires ce qui provoque l'arrêt de la croissance tumorale et la mort des cellules cancéreuses par apoptose.

Le tamoxifène et le raloxifène sont des modulateurs d'ER c'est-à-dire qu'ils induisent une conformation intermédiaire d'ER entre la conformation agoniste et la conformation antagoniste. Cela veut dire que ER lié à un SERM peut recruter des corépresseurs mais aussi des coactivateurs avec différentes affinités³⁴. Par conséquent, ce qui détermine en partie la pharmacologie d'un SERM dans un tissu donné est la concentration des différents corégulateurs transcriptionnels. C'est ainsi que le tamoxifène a un effet antagoniste sur la prolifération des cellules mammaires mais qu'il a un effet agoniste sur la prolifération des cellules de l'endomètre. Le mécanisme responsable vient d'une expression plus élevée du coactivateur SRC-1 de la famille SRC/p160 (Steroid Receptor Coactivator) dans les cellules de l'endomètre, ce qui provoque des effets du tamoxifène similaires à ceux d'E2 dans ce tissu⁵⁸. En revanche, le raloxifène n'a pas d'effet agoniste sur ER dans l'endomètre, ce qui montre la sélectivité tissulaire que peut avoir un SERM par rapport à un autre SERM. Ce mécanisme a permis d'expliquer la stimulation du cancer de l'endomètre par le tamoxifène, observé auparavant lors d'essais cliniques^{59, 60}. Cet effet secondaire limite l'utilisation du tamoxifène sur le long-terme. Toutefois, l'effet d'une prise prolongée de SERMs sur plusieurs années comme le tamoxifène ou le raloxifène est nettement meilleure contre les cancers du sein ER+ qu'un traitement avec ces mêmes molécules sur un temps plus court³⁵. Une étude clinique a testé le tamoxifène pendant plus de 5 ans sur des femmes ayant un risque élevé de développer un cancer du sein et a montré que le tamoxifène pouvait être utilisé en chimioprévention puisqu'il réduit de 50% l'incidence de cancers du sein chez les patientes traitées⁶¹. Une étude comparative entre le tamoxifène et le raloxifène a montré que ces deux molécules ont un potentiel similaire dans la chimioprévention des cancers du sein et le risque de cancer de l'endomètre est équivalent. L'avantage retrouvé avec le raloxifène est que le risque de thrombose est plus faible qu'avec le tamoxifène⁶². Le raloxifène semble donc être un meilleur candidat que le tamoxifène pour la chimioprévention des cancers du sein ER+⁶³.

3.2.2) Mode d'action non génomique

Les mécanismes d'action nucléaire d'ER sont bien décrits mais une part du mécanisme d'action de la signalisation oestrogénique se déroule en dehors du noyau, au niveau de la

membrane plasmique et du cytoplasme (Figure 10A) ³⁶. Une faible proportion d'ER est localisée au niveau de la membrane plasmique grâce à une modification post-traductionnelle qui est un acide palmitique liée de façon covalente au LBD (Ligand Binding Domain), le domaine de liaison à l'hormone ⁶⁴. Lorsque ER est activé par E2, il interagit avec la protéine MNAR (Modulator of Non-genomic Action of estrogen Receptor), Shc, IGF-1R et Cas qui servent de protéines intermédiaires entre ER activé et les protéines c-Src et la Phosphatidyl Inositol 3-phosphate Kinase (PI3K) ³⁶. De plus, une interaction directe d'ER avec PI3K a aussi été décrite ⁶⁵. L'interaction directe et indirecte d'ER avec la voie de signalisation de la PI3K et c-Src permet à E2 de stimuler l'activité des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) qui stimulent la prolifération cellulaire. L'implication de ce mécanisme dans les effets du tamoxifène n'est pas clair puisqu'il semblerait que le tamoxifène affecte cette voie de manière indépendante du récepteur des oestrogènes ^{66, 67}.

L'oestradiol a une autre cible qu'ER, il s'agit de GPR30 qui est un récepteur couplé aux protéines G ³⁶. GPR30 est capable de moduler l'activité de la Protéine Kinase A et des MAPK ⁶⁸. Par ce mécanisme, l'E2 peut stimuler rapidement la prolifération cellulaire en activant la voie de signalisation des MAPK. L'implication de GPR30 dans la stimulation de la prolifération cellulaire par E2 reste à approfondir. Par exemple, l'inactivation de GPR30 par des siRNA dans des cellules cancéreuses mammaires n'affecte pas la prolifération induite par E2. En revanche dans des cellules cancéreuses de l'endomètre, GPR30 est responsable de la stimulation de la prolifération cellulaire par E2 mais aussi par le 4-hydroxytamoxifène ⁶⁹. GPR30 pourrait donc participer aux effets oncogènes du tamoxifène dans l'endomètre.

3.3) Les effets secondaires du tamoxifène

Comme nous l'avons vu dans la partie 3.2.1), le tamoxifène peut augmenter le risque de développer un cancer de l'endomètre chez les patientes traitées. Les SERMs comme le tamoxifène et le raloxifène ont aussi un effet agoniste sur la protection osseuse, tout comme les oestrogènes qui sont impliqués dans la dynamique osseuse. Il a été montré que les oestrogènes sont capables d'empêcher la perte osseuse en inhibant la différenciation des ostéoclastes qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire osseuse ⁷⁰. Aussi, les oestrogènes induisent l'expression du ligand du récepteur de mort cellulaire Fas par les ostéoclastes ce qui provoque leur mort par apoptose ⁷¹. Ces deux mécanismes moléculaires expliquent l'apparition d'ostéoporose chez la femme ménopausée ⁷² qui nécessite un traitement pour éviter les fractures osseuses ⁷³. Les cliniciens ont observé que le traitement de

patientes ménopausées atteintes de cancers du sein ER+ par le tamoxifène permet d'accroître la densité osseuse ⁷⁴. Cependant, le traitement de l'ostéoporose chez la femme post-ménopausée s'effectue sur de nombreuses années et les effets pro-carcinogènes du tamoxifène sur l'endomètre ont motivé l'évaluation d'autres SERMs pour le traitement de l'ostéoporose. Le raloxifène, qui n'induit pas l'oncogenèse de l'endomètre, a été testé en clinique et il a été observé que ce SERM augmente la densité minérale osseuse chez la femme post-ménopausée ⁷⁵, ce qui a conduit à utiliser le raloxifène dans le traitement de l'ostéoporose de la femme ménopausée, et qui est validé par la Food and Drug Administration (FDA) ⁷³.

Les SERMs ont un effet bénéfique sur le taux de cholestérol sérique en le diminuant ⁷⁴. Le raloxifène diminue le taux de LDL (Light Density Lipoprotein) circulant ⁷⁶, qui est considéré comme le « mauvais cholestérol » car cette lipoprotéine transporte le cholestérol du foie vers les organes périphériques et elle est responsable du dépôt de cholestérol sur les parois artérielles. Le tamoxifène diminue le taux de cholestérol de sept fois chez la souris ainsi que le taux de LDL et il augmente le taux de HDL (High Density Lipoprotein) qui permet le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son élimination. Un traitement par le tamoxifène de souris mâles déficientes pour l'expression de l'apolipoprotéine E, qui est un modèle murin d'athérosclérose, diminue les lésions artérielles provoquées par l'accumulation de lipides ⁷⁷. Cependant, même si le tamoxifène permet une amélioration du taux de cholestérol, il est responsable d'une augmentation du taux de triglycérides chez certaines patientes ⁷⁸ alors que le raloxifène ne provoque pas d'hypertriglycéridémie ⁷⁹. Il a été montré en clinique que le tamoxifène diminue l'activité de la lipoprotéine lipase et de la triglycéride lipase hépatique qui sont responsables de la métabolisation des triglycérides et pourraient expliquer ses effets hypertriglycéridémiant. L'induction de l'hypertriglycéridémie dépend de la dose de tamoxifène administrée aux patientes puisqu'une diminution de la dose administrée diminue l'hypertriglycéridémie ⁸⁰. Une étude clinique a testé une co-administration de Vitamine E ou de Vitamine C, qui sont des antioxydants naturels, avec le tamoxifène chez des patientes traitées ⁸¹. Ils ont observé que la Vitamine E et la Vitamine C diminuent l'effet hypertriglycéridémiant du tamoxifène, ce qui suggère qu'un processus oxydatif est nécessaire pour que le tamoxifène augmente le taux de triglycérides.

3.3) Une cible secondaire du tamoxifène : le complexe AEBS

3.3.1) Découverte du site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS)

En 1980, Robert Sutherland met en évidence une cible secondaire de haute affinité des SERMs, appelé AEBS pour AntiEstrogen Binding Site, qui ne lie pas l'oestradiol ⁸². Cette découverte est appuyée par les travaux de Jean-Charles Faye qui a identifié presque simultanément AEBS dans le cytosol de cellules de l'utérus de rat ⁸³. L'ICI 182,780 (Fulvestrant), qui est aussi un anti-oestrogène mais n'appartenant pas à la famille des SERMs, lie aussi un site de haute affinité différent de l'ER mais qui n'est pas AEBS ⁸⁴, ce qui montre qu'AEBS a une véritable spécificité pour les SERMs. Rapidement, une partie du pharmacophore reconnu par AEBS a été caractérisé, il s'agit de la chaîne latérale aminoéther que tous les SERMs ont en commun ⁸⁵. Alors que l'oxydation du tamoxifène en 4-hydroxytamoxifène augmente son affinité de 50 fois pour le récepteur des oestrogènes, cela n'est pas le cas pour AEBS qui lie ces deux SERMs avec la même affinité qui est de l'ordre du nanomolaire ⁸⁶. Ces résultats montrent que les SERMs ont une relation de structure-affinité différente pour AEBS et pour ER et qu'AEBS est une cible des SERMs pharmacologiquement bien distincte d'ER. Cela est confirmé par la présence d'un site de haute affinité pour les SERMs, correspondant aux caractéristiques d'AEBS, dans des biopsies de tumeurs du sein humaines n'exprimant pas ER ⁸⁷. Des cellules MCF-7 résistantes aux effets cytotoxiques du tamoxifène ont été générées dans le laboratoire de Francis Bayard : la lignée résistante RTx6 ⁸⁶. Les cellules RTx6 ne sont pas affectées au niveau de la capacité d'ER à lier le tamoxifène et l'oestradiol mais elles contiennent beaucoup moins d'AEBS, ce qui suggère qu'AEBS a un rôle important dans les effets anti-cancéreux du tamoxifène et qu'un mécanisme d'action du tamoxifène indépendant d'ER pourrait exister.

3.3.2) Effets cytostatiques, cytotoxiques et métabolisme lipidique

En 1984, le DPPE qui est un ligand d'AEBS est synthétisé (Figure 11) ⁸⁸. Il s'agit d'un dérivé du tamoxifène de type diphénylméthane. Les auteurs ont montré que le DPPE ne se lie pas à ER, ce qui en fait un ligand sélectif d'AEBS.

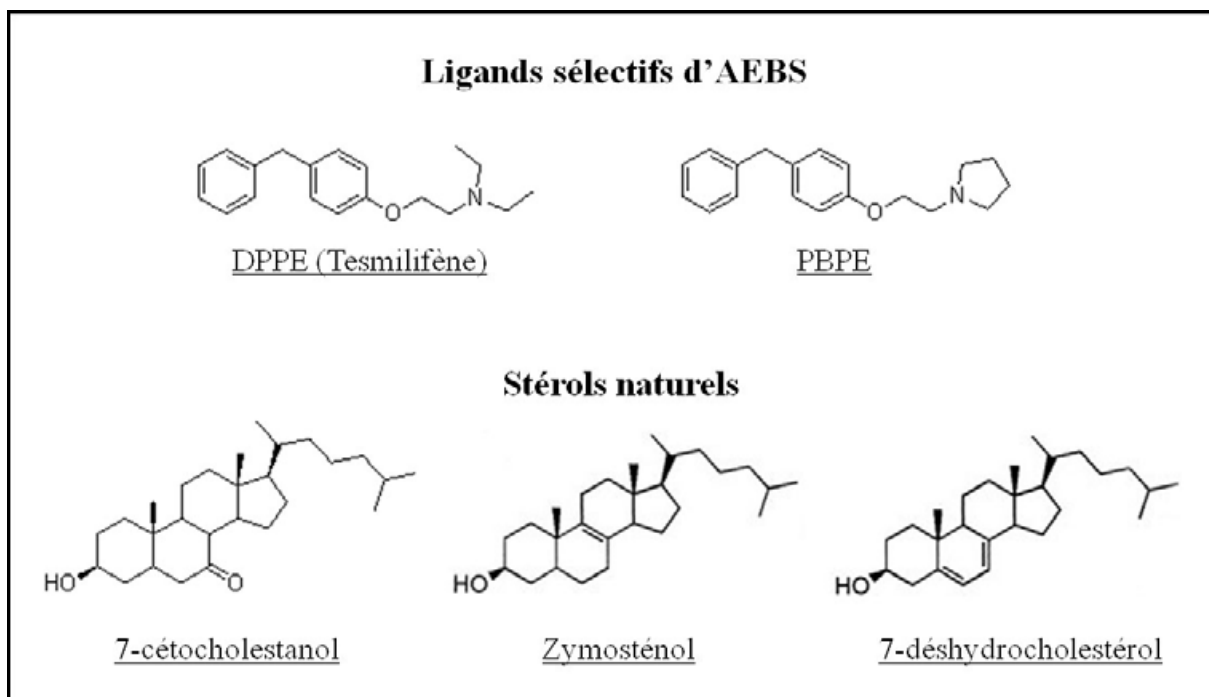


Figure 11 : Ligands synthétiques et naturels du site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS). Le DPPE et le PBPE sont des ligands synthétiques spécifiques d'AEBS alors que les stérols ci-dessus sont des ligands naturels endogènes.

Ce type de ligand ouvre la perspective d'étudier spécifiquement le rôle d'AEBS ainsi que la part du mécanisme d'action des SERMs qui relève spécifiquement d'AEBS ⁸⁹. AEBS est localisé au niveau de la membrane réticulum endoplasmique granuleux dans des extraits de foie de rat ⁹⁰ puis dans les cellules MCF-7 ⁹¹, et le ligand spécifique d'AEBS est capable de s'y lier ⁸⁸, ce qui confirme son identité. Une étude a utilisé un ligand spécifique d'AEBS, le tert-Butylphenoxyethyl diéthylamine (t-BuPE) pour caractériser l'implication d'AEBS dans les effets anti-prolifératifs des SERMs ⁹². Les auteurs n'ont constaté aucun potentiel de ce ligand à reproduire des effets cellulaires constatés avec les SERMs, ce qui a laissé supposer que l'importance d'AEBS dans les effets anti-cancéreux des SERMs est probablement mineure. Cependant, on sait maintenant que le t-BuPE est un ligand de faible affinité pour AEBS, ce qui explique certainement l'absence d'effet anti-prolifératif du t-BuPE sur des cellules cancéreuses mammaires ⁹³. En effet, il a été montré que des ligands qui lient spécifiquement AEBS avec une forte affinité ⁸⁸, inhibent la prolifération cellulaire d'une manière dépendante de la présence d'AEBS ^{94, 95}. Cela montre qu'AEBS pourrait être impliqué dans les effets anti-prolifératifs du tamoxifène. AEBS est ubiquitaire et il peut avoir un rôle dans d'autres types tumoraux que les tumeurs mammaires. Le tamoxifène est capable d'agir en synergie avec le cisplatine en clinique sur des mélanomes métastatiques ⁹⁶ et sur la

sensibilité de cellules de mélanome au cisplatine ⁹⁷. La résistance des cellules de mélanomes aux effets cytotoxiques du tamoxifène est spécifiquement corrélée avec sa perte d'affinité pour AEBS, ce qui révèle une implication d'AEBS dans la résistance des cellules de mélanome aux effets synergiques du tamoxifène avec le cisplatine ⁹⁸. Cela suggère qu'AEBS peut être une cible thérapeutique intéressante pour des cancers autres que les cancers du sein.

Les SERMs inhibent aussi la prolifération de cellules lymphoïdes, qui appartiennent à un type cellulaire qui n'expriment pas ER, et l'ajout de cholestérol ou de lipoprotéines inhibe les effets cytostatiques des SERMs ⁹⁹. Cela confirme l'implication d'AEBS dans les effets cytostatiques des SERMs de façon indépendante de la présence d'ER et cela suggère une implication du métabolisme du cholestérol dans ces effets. Un autre ligand spécifique d'AEBS, de la famille des benzofuranes, inhibe la prolifération cellulaire et la biosynthèse du cholestérol, ce qui montre qu'AEBS est impliqué dans le métabolisme du cholestérol ¹⁰⁰. Une autre étude conforte cette hypothèse en montrant que des stérols oxydés en position 7 comme le 7-cétocholestanol sont capables de se lier à AEBS ^{101, 102} ainsi que d'inhiber la prolifération cellulaire de façon corrélée avec leur affinité pour AEBS ¹⁰³. En accord avec ces données, AEBS contient au moins une enzyme impliquée dans le métabolisme du cholestérol puisqu'il est montré que le tamoxifène se lie à la delta 8, delta 7-cholestérol isomérase ¹⁰⁴. Une autre classe de lipides comprend des ligands d'AEBS, il s'agit des acides gras insaturés qui sont capables de se lier à AEBS ¹⁰⁵ et d'empêcher la liaison du tamoxifène à AEBS de façon non compétitive ¹⁰⁶, ce qui suggère qu'AEBS puisse être aussi impliqué dans le métabolisme lipidique. Cela voudrait dire que l'implication d'AEBS dans le métabolisme du cholestérol et le métabolisme lipidique pourrait expliquer les effets du tamoxifène sur la perturbation du profil lipidique sérique chez les patientes traitées avec ce SERM ⁷⁸.

3.3.3) Identification moléculaire d'AEBS

Afin d'identifier la nature moléculaire d'AEBS, une sonde qui présente une photoaffinité pour AEBS a été synthétisée ¹⁰⁷. Cette sonde a permis la mise au point d'une méthode de purification d'AEBS afin de pouvoir l'analyser ¹⁰⁸. Chez le rat, la purification d'AEBS a permis d'identifier une protéine qui est une époxyde hydrolase microsomale (mEH). L'expression de cette protéine ne permet pas la liaison du tamoxifène, ce qui montre que la mEH est une protéine associée à AEBS mais qu'elle n'est pas directement impliquée dans la liaison du tamoxifène ¹⁰⁹. Toutefois, cette étude a été reprise par un essai clinique qui a montré que l'expression de l'époxyde hydrolase microsomale est prédictive de la réponse des

cancers du sein au tamoxifène ¹¹⁰. Cela veut dire qu'AEBS ou du moins l'une de ses sous-unités pourrait être un marqueur de la réponse clinique au tamoxifène et qu'il pourrait éventuellement être impliqué dans des phénomènes de résistance à l'hormonothérapie. Une nouvelle étude avec une sonde présentant une affinité plus forte pour AEBS a identifié deux protéines supplémentaires qui entrent dans la composition d'AEBS hépatique : il s'agit d'une carboxylestérase et d'une protéine hépatique de liaison des acides gras (L-FABP : Liver Fatty Acid Binding Protein) qui sont impliquées dans la liaison du tamoxifène ¹¹¹. Cependant, il avait été montré que l'AEBS hépatique et l'AEBS provenant de cellules cancéreuses mammaires ont une pharmacologie différente ce qui suggère que leur composition n'est pas la même ¹¹². Afin d'optimiser l'étude d'AEBS, de nouveaux ligands spécifiques d'AEBS et de meilleure affinité ont été synthétisés. Parmi ces ligands, le PBPE est l'un des plus efficaces pour se lier à AEBS et provoquer la mort cellulaire des cellules MCF-7 ¹¹³. Des études antérieures ont montré que AEBS semble impliqué dans le métabolisme des stérols ⁹⁹⁻¹⁰³, avec une enzyme cholestérogénique liant le tamoxifène clairement identifiée, la D8D7I ¹⁰⁴. L'équipe de Marc Poirot a étudié l'effet de ligands d'AEBS, tels que le tamoxifène et le PBPE, sur la biosynthèse du cholestérol dans des cellules de cancers du sein MCF-7 ⁹³. Ils ont pu détecter une accumulation de stérols intermédiaires de la cholestérogénèse sous l'action des deux ligands d'AEBS testés : une accumulation de zymosténol avec le tamoxifène, et une accumulation de zymosténol et de 7-déshydrocholestérol avec le PBPE. Ces résultats suggèrent que les ligands d'AEBS inhibent des enzymes cholestérogéniques qui ont pour substrat les stérols accumulés sous l'action du tamoxifène et du PBPE. Le zymosténol est un substrat de la D8D7I, déjà identifiée pour lier le tamoxifène ^{104, 114}, et le zymosténol s'accumule avec un traitement des cellules MCF-7 avec le tamoxifène et avec le PBPE. Cela suggère que la D8D7I occupe une position essentielle pour la constitution du site de liaison aux ligands d'AEBS. Cependant, un groupe a déjà testé la liaison du tamoxifène à D8D7I. Les auteurs ont observé que le tamoxifène est capable de se lier à D8D7I lorsqu'elle est exprimée chez la levure mais pas lorsqu'elle est exprimée dans des cellules de mammifères ¹¹⁴. Cela n'exclut pas que D8D7I puisse être impliquée dans le site de liaison d'AEBS mais cela suggère que chez les mammifères, l'expression de D8D7I seule ne suffit pas à reconstituer AEBS. Comme le PBPE provoque une accumulation de 7-déshydrocholestérol dans les MCF-7 ⁹³, la 7-déshydrocholestérol réductase (DHCR7) qui catalyse sa conversion en cholestérol pourrait aussi entrer dans la composition d'AEBS dans les cellules de mammifères. Le groupe de Marc Poirot a donc mis en œuvre une co-expression ectopique de D8D7I et de DHCR7 dans des cellules Cos-7 qui sont des cellules embryonnaires de rein de singe vert, ce qui

provoque une augmentation du nombre de sites de liaison des ligands d'AEBS dans ces cellules, contrairement à l'expression de l'une ou l'autre de ces deux enzymes qui n'augmente pas le nombre d'AEBS. Une expérience de co-immunoprécipitation a démontré que D8D7I et DHCR7 interagissent physiquement. Par conséquent, ces données montrent qu'AEBS est un complexe hétéro-oligomérique formé par les enzymes cholestérogéniques D8D7I et DHCR7 et que la liaison de ligands d'AEBS, tels que le tamoxifène et le PBPE, provoquent une perturbation de leur activité enzymatique conduisant à une accumulation de stérols (Figure 12).

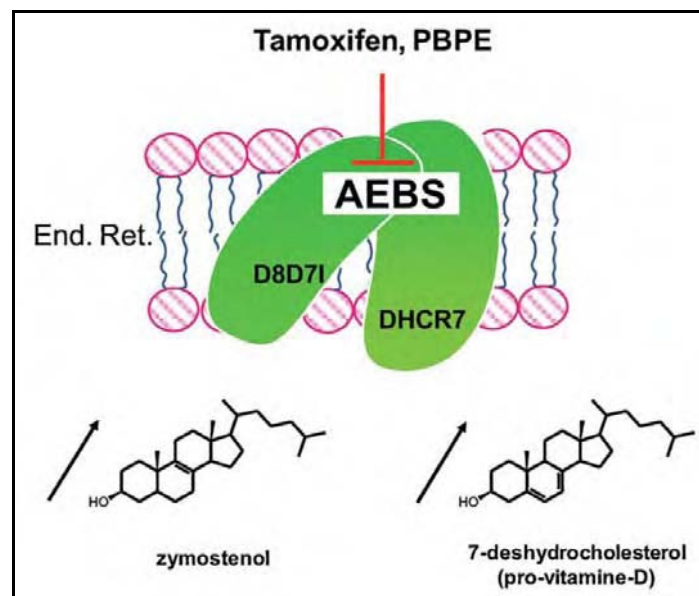


Figure 12 : Mode d'action des ligands d'AEBS sur le site AEBS ¹¹⁵. AEBS est constitué des enzymes cholestérogéniques D8D7I et DHCR7. Les ligands d'AEBS inhibent l'activité enzymatique de ces deux enzymes ce qui provoque une accumulation de leur substrat respectif : le zymosténol pour D8D7I et le 7-déshydrocholestérol pour DHCR7. AEBS = AntiEstrogen Binding Site ; D8D7I = 3 β -hydroxycholestérol- Δ 8, Δ 7-isomérase ; DHCR7 = 7-déshydrocholestérol réductase ; End. Ret : Endoplasmic Reticulum.

D'autres enzymes pourraient entrer dans la composition d'AEBS telles que la Cholestérol delta5-Désaturase (C5DS) ou la Déshydrocholestérol delta24-Reductase (DHCR24) puisque le tamoxifène et le PBPE provoquent une accumulation de desmostérol. Toutefois, D8D7I et DHCR7 suffisent à reconstituer AEBS ce qui suggère que l'association de ces deux protéines porte le site de liaison des ligands d'AEBS.

3.3.4) Induction de la différenciation et de la mort cellulaire

Afin de caractériser le mode d'action cellulaire des ligands d'AEBS, Bruno Payré *et al.* ont étudié les effets cytostatiques du tamoxifène et du PBPE sur les cellules MCF-7 à des concentrations cytostatiques ¹¹⁶. Ils ont montré que les ligands d'AEBS induisent des

caractéristiques de différenciation cellulaire c'est-à-dire une accumulation des cellules dans la phase G0-G1 du cycle cellulaire et l'apparition de caractères propres aux cellules épithéliales luminales différenciées dont dérive potentiellement la lignée cancéreuse MCF-7 qui est classée dans le cancer du sein luminal A. En effet, les ligands d'AEBS provoquent une reprise de l'activité sécrétoire des cellules MCF-7 associée à la lactation comme en témoigne la sécrétion de lipides et d'une protéine retrouvés naturellement dans le lait : des triglycérides et la Milk Fat Globule Protein 8 (MFGE-8). Le zymosténol et le 7-déshydrocholestérol, qui s'accumulent dans des cellules traitées avec les ligands d'AEBS ⁹³, ont la même capacité à induire la différenciation des cellules MCF-7 ce qui suggère que l'accumulation de ces stérols provoquée par les ligands d'AEBS est responsable de la différenciation cellulaire. Cependant, le mécanisme d'action impliquant l'accumulation de stérols semble plus complexe puisque l'inhibition de l'oxydation par la vitamine E qui est un antioxydant naturel inhibe les effets différenciants du tamoxifène, du PBPE ainsi que du zymosténol et du 7-déshydrocholestérol. Cela suggère que l'oxydation des stérols accumulés dans les cellules traitées par les ligands d'AEBS est essentielle pour l'induction de la différenciation des cellules MCF-7.

Dans une autre étude, Philippe de Medina *et al.* ont utilisé des concentrations cytotoxiques de PBPE et de tamoxifène sur les cellules MCF-7 et ils ont constaté une induction de la mort cellulaire par apoptose ainsi que des caractéristiques d'autophagie ¹¹⁷. L'apoptose et l'autophagie provoquées par les ligands d'AEBS dépendent de l'accumulation de stérols. Les ligands d'AEBS augmentent la quantité d'espèces oxygénées réactives (ROS : Reactive Oxygen Species) responsables du stress oxydant cellulaire capable de provoquer l'oxydation de stérols ¹¹⁸. L'oxydation des stérols accumulés est nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire mais pas de l'autophagie. Lorsque l'autophagie est inhibée pharmacologiquement et génétiquement par l'extinction de la protéine autophagique Beclin 1, la mort cellulaire induite par les ligands d'AEBS augmente ce qui montre que l'autophagie provoquée par le tamoxifène et le PBPE est cytoprotectrice. Ces résultats montrent que l'accumulation des stérols induite par les ligands d'AEBS provoque une autophagie cytoprotectrice et que leur oxydation en oxystérols est responsable de la mort des cellules MCF-7 par apoptose.

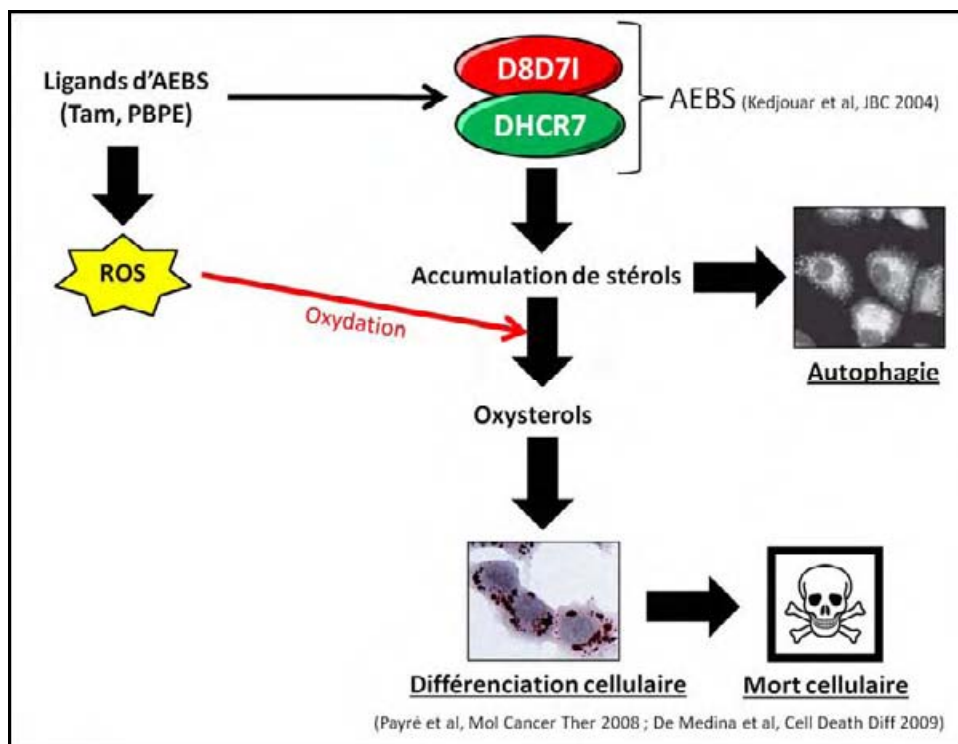


Figure 13 : Mécanisme d'action des ligands d'AEBS dans la différenciation et la mort cellulaire de cellules cancéreuses mammaires. Les ligands d'AEBS (Tam, PBPE) inhibent les activités enzymatiques portées par le complexe AEBS ce qui provoque une accumulation de stérols impliqués dans l'induction de l'autophagie. En parallèle, les ligands d'AEBS induisent une production de ROS qui interviennent dans l'oxydation des stérols ce qui provoque l'apparition d'oxystérols. Ces oxystérols induisent la différenciation et la mort des cellules cancéreuses mammaires. AEBS = AntiEstrogen Binding Site ; D8D7I = 3 β -hydroxycholestérol- Δ 8, Δ 7-isomérase ; DHCR7 = 7-déshydrocholestérol réductase ; Tam = Tamoxifène ; ROS = Reactive Oxygen Species.

Ces deux études révèlent un mécanisme d'action commun des ligands d'AEBS (Figure 13) qui induisent une accumulation de ROS et de stérols qui sont oxydés en oxystérols. Les oxystérols produits seraient responsables de la différenciation cellulaire et de la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses mammaires provoqués par les ligands d'AEBS ¹¹⁵. Le mécanisme moléculaire par lequel les oxystérols accumulés induisent la différenciation et la mort cellulaire reste à identifier. Les Liver X Receptors (LXRs) pourraient être impliqués dans les effets oxystérol-dépendants des ligands d'AEBS puisque ce sont les récepteurs nucléaires des oxystérols ¹¹⁹. Ils sont capables d'activer des programmes complexes d'expression de gènes responsables d'une réponse cellulaire et physiologique à l'accumulation de stérols. Les LXRs sont aussi des activateurs de la lipogenèse et pourraient être des acteurs de la différenciation des cellules MCF-7 qui est caractérisée par une augmentation de la production et de la sécrétion de lipides. Aussi, les LXRs sont impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire ¹²⁰, ils pourraient donc réguler l'induction de la mort cellulaire par les ligands d'AEBS. L'étude de l'implication des LXRs dans les effets anti-cancéreux des ligands d'AEBS constitue la première partie de mes travaux de thèse.

3.3.5) La ChEH à l'origine d'une nouvelle voie métabolique

En 2010, nous avons identifié qu'AEBS porte l'activité enzymatique Cholestérol-5,6-Epoxyde Hydrolase (ChEH) qui catalyse l'hydrolyse des époxydes de cholestérol alpha ($CE\alpha$: Cholesterol Epoxide alpha) et beta ($CE\beta$: Cholesterol Epoxide beta) en cholestane triol (CT) (Figure 14A) ¹²¹. Cette découverte a été inspirée par des travaux antérieurs qui ont identifié une activité enzymatique cholestérol époxyde hydrolase dans des microsomes ¹²², c'est-à-dire le même compartiment cellulaire où se trouve AEBS ⁹⁰. D'autres travaux ont montré que l'activité cholestérol époxyde hydrolase est inhibée par des stérols oxydés sur le cycle B comme le 7-cétocholestanol ¹²³, qui est aussi un ligand d'AEBS ¹⁰². Afin de voir si un lien structural et fonctionnel existe entre AEBS et la ChEH, nous avons regardé si les substrats (CE) et le produit (CT) de la ChEH sont capables de se lier à AEBS. Nous avons observé une affinité des CEs de l'ordre du nanomolaire et du CT de l'ordre du micromolaire pour AEBS. D'autre part, le tamoxifène, le PBPE ainsi que de nombreux autres ligands d'AEBS synthétiques sont capables d'inhiber l'activité ChEH avec une constante d'inhibition de l'ordre du nanomolaire (Figure 14B). Ces résultats ont permis d'établir une corrélation positive entre la constante d'affinité pour AEBS et la constante d'inhibition de la ChEH pour chaque ligand d'AEBS testé. Lors de l'identification moléculaire d'AEBS, la co-expression de la D8D7I et de DHCR7 avait permis la reconstitution d'AEBS ⁹³. Dans notre étude nous avons aussi effectué la co-expression de la D8D7I et de DHCR7 et nous avons constaté qu'elle permet d'augmenter fortement l'activité ChEH, contrairement à l'expression unique de chacune des deux enzymes qui ne permet qu'une augmentation modérée de l'activité ChEH. Finalement, nous avons effectué l'extinction de la D8D7I et de DHCR7 dans les cellules MCF-7 avec des siRNAs. L'extinction de DHCR7 augmente la constante de Michaelis-Menten (K_M) alors que l'extinction de la D8D7I diminue la vitesse enzymatique maximale (V_m). En revanche, l'extinction simultanée de DHCR7 et de la D8D7I diminue drastiquement l'activité ChEH de 92%, ce qui montre que l'expression des deux enzymes est nécessaire pour que l'activité ChEH soit fonctionnelle dans la cellule. Cette étude montre qu'AEBS et la ChEH sont portés par le même complexe enzymatique formé de DHCR7 et D8D7I.

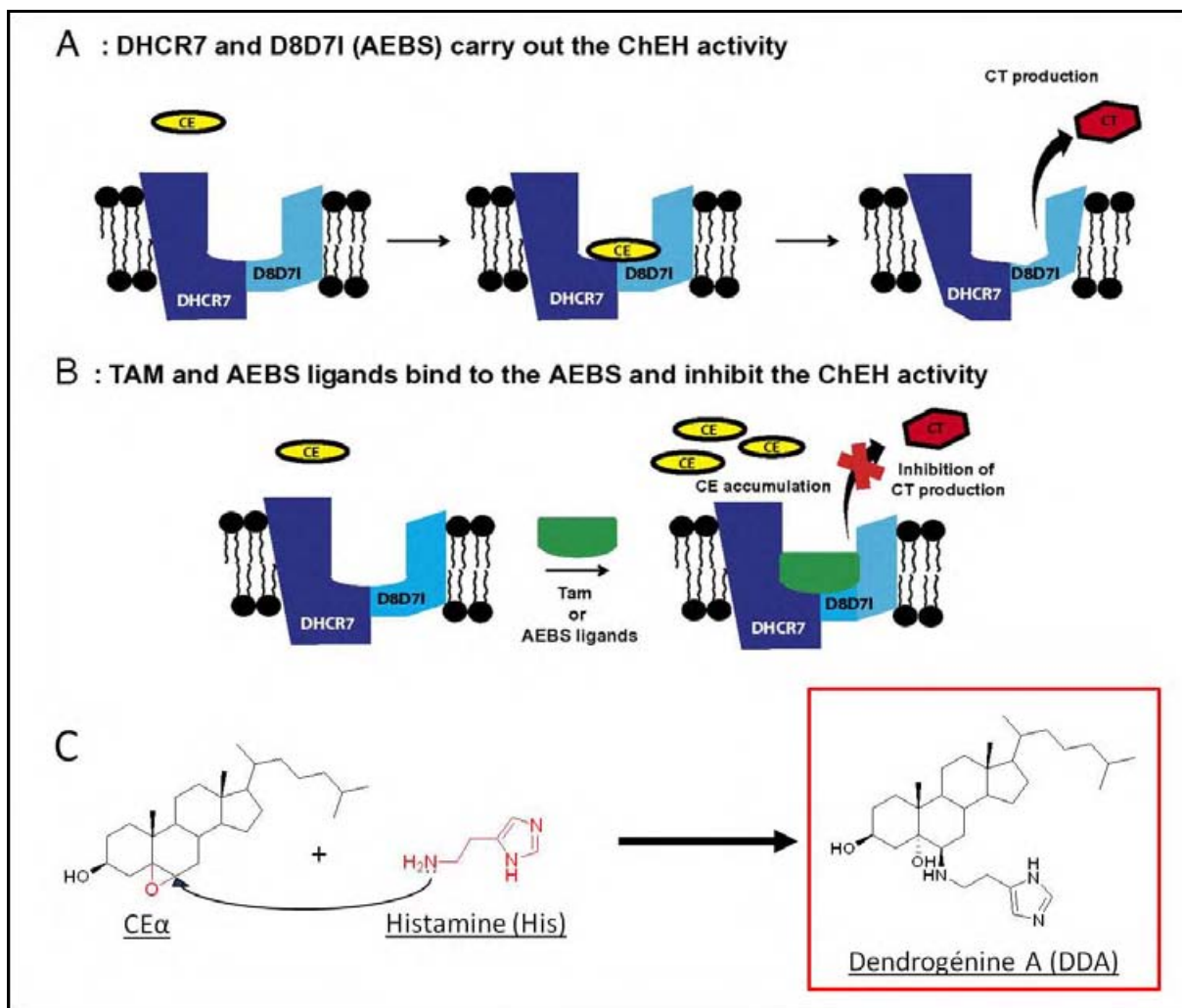


Figure 14 : L'activité cholestérol époxyde hydrolase (ChEH) et le mécanisme réactionnel de synthèse de la Dendrogénine A (DDA) ¹²¹. A. L'activité ChEH est portée par le complexe AEBS formé par les enzymes D8D7I et DHCR7, et elle catalyse l'hydrolyse du cholestérol-5,6-époxyde (CE) en cholestane triol (CT). B. Les ligands d'AEBS inhibent l'activité ChEH ce qui provoque une accumulation de cholestérol-5,6-époxyde. C. La DDA est produite par la réaction du cholestérol-5,6-époxyde alpha ($CE\alpha$) avec l'histamine. AEBS = AntiEstrogen Binding Site ; D8D7I = 3 β -hydroxycholestérol- $\Delta 8$, $\Delta 7$ -isomérase ; DHCR7 = 7-déhydrocholestérol réductase.

Il ressort de cette étude que le tamoxifène et le PBPE sont des inhibiteurs de la ChEH et provoquent une accumulation de CE (Figure 14B). Les effets des ligands d'AEBS sur la différenciation et la mort cellulaire passent par une accumulation de stérols mais les CEs n'ont pas été testés pour la production de ces effets. Dans une autre étude, de Medina *et al.* ont montré que les CEs sont incapables d'induire la différenciation des cellules MCF-7 ¹²⁴ à des concentrations inférieures au micromolaire, ce qui suggère que les CEs ne sont pas impliqués dans les effets différenciants des ligands d'AEBS ou qu'ils sont transformés en une autre classe de molécule qui possède une activité différenciante. Une étude avait montré qu'AEBS lie l'histamine ¹²⁵, ce qui suggère que les CEs et l'histamine peuvent

potentiellement être concentrés à proximité l'un de l'autre au niveau d'AEBS. La fonction amine de l'histamine est nucléophile et pourrait effectuer une attaque nucléophile au niveau d'un carbonyle engagé dans la fonction époxyde des CEs puisqu'ils sont électrophiles (Figure 14C). Cette hypothèse réactionnelle a conduit de Medina *et al.* à synthétiser le produit de la réaction entre l'histamine et le CE α puisqu'ils ont constaté que le CE β ne réagit pas avec l'histamine. Le produit de cette réaction, le 6-histaminylcholestan-3,5-diol (HiCD) a été testé pour sa capacité à induire la différenciation cellulaire sur des monocytes et des précurseurs embryonnaires de neurones car la différenciation de ces deux types cellulaires respectivement en cellule dendritique et en neurone est facilement observable en microscopie photonique puisqu'elle est associée à une émission de dendrites. L'HiCD induit la différenciation cellulaire des deux modèles cellulaires testés et par conséquent, sa capacité à induire la production de dendrites à des concentrations de l'ordre du nanomolaire a conduit de Medina *et al.* à appeler ce composé la dendrogénine A (DDA) comme la première molécule de la nouvelle famille des alkylaminooxystérol. Les propriétés différenciantes de la DDA ont été testées sur la lignée cellulaire cancéreuse mammaire MCF-7 et sur la lignée cellulaire de mélanome métastatique SK-MEL28. La DDA induit la différenciation des MCF-7 avec l'apparition des mêmes caractéristiques de différenciation observées avec le tamoxifène et le PBPE, c'est-à-dire une accumulation de triglycérides et la production de la protéine du lait MFGE-8. La DDA provoque l'apparition de dendrites sur les SK-MEL28 et augmente la production de mélanine, qui sont deux caractéristiques typiques des mélanocytes dont dérivent les cellules de mélanome. Cela montre que la DDA a une activité différenciante sur plusieurs types de cancers. La cytotoxicité de la DDA a ensuite été évaluée sur des lignées cellulaires très diverses de cancers (côlon, sein, poumon, mélanome, neuroblastome, gliome, leucémies) et il a été montré que la DDA induit la mort cellulaire de l'ensemble des lignées cancéreuses testées avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire. Sa capacité à provoquer la mort cellulaire de cancers très agressifs comme le mélanome métastatique à des concentrations relativement faibles fait de la DDA un potentiel agent chimiothérapeutique prometteur pour le traitement de ces cancers pour lesquels peu de solutions thérapeutiques existent. La deuxième partie de ma thèse consiste à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels la DDA induit la mort cellulaire, ainsi que l'identification de la cible de la DDA et la caractérisation de son implication dans les mécanismes de mort cellulaire. La DDA dérivant du CE α qui est un ligand des LXRs¹²⁶, nous avons émis l'hypothèse que les LXRs puissent être les récepteurs cibles de la DDA.

II) Les Liver X Receptors (LXR)

1) Les récepteurs nucléaires et les LXR

1.1) Généralités

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui, pour la plupart d'entre eux, régulent l'expression génique sous la dépendance de la fixation d'un ligand (Figure 15). Les récepteurs nucléaires forment une superfamille de 48 membres qui contrôlent et régulent de très nombreuses fonctions cellulaires et physiologiques, de l'homéostasie cellulaire jusqu'au développement ¹²⁷. Au sein de cette superfamille on distingue deux grandes classes de récepteurs nucléaires : les récepteurs stéroïdiens qui lient des hormones stéroïdes et les récepteurs non stéroïdiens.

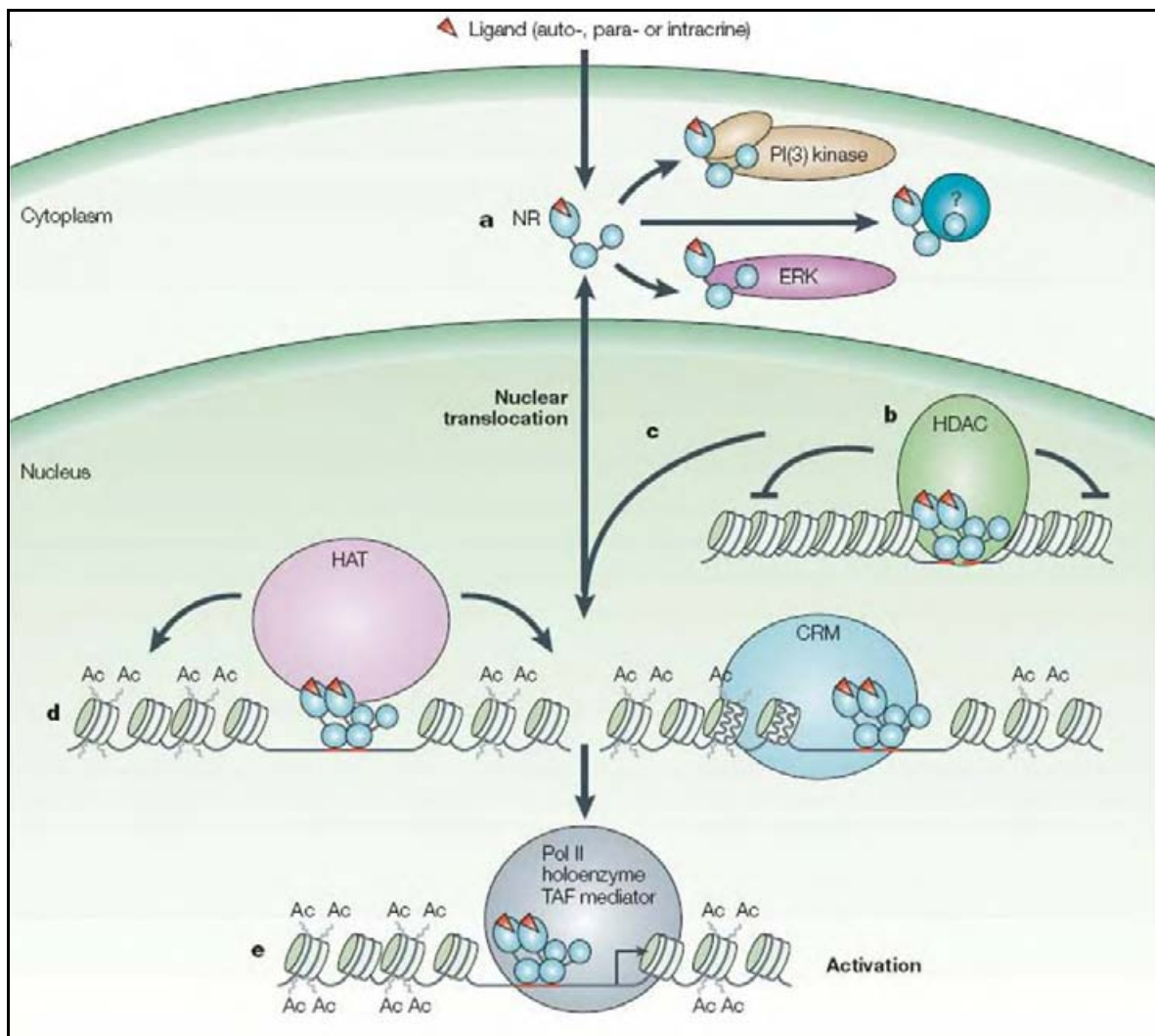


Figure 15 : Mécanisme d'action général des récepteurs nucléaires ¹²⁸. Les récepteurs nucléaires sont activés en liant leur ligand et peuvent avoir une action cytoplasmique en interagissant avec des protéines cytoplasmiques (a). La liaison du ligand provoque la translocation de récepteurs nucléaires dans le noyau de la cellule (c). Selon

la nature du ligand, le récepteur nucléaire a une action répressive sur ses gènes cibles en recrutant des histones déacétylases (HDAC) (b), ou une action activatrice en recrutant des histones acétyltransférases (HAT) (d) puis le complexe de remodelage de la chromatine (CRM) qui permet la transcription de ses gènes cibles par l'ARN polymérase II (Pol II) (e). ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase ; PI(3)-Kinase : Phosphatidylinositol-3-Phosphate Kinase ; NR : Nuclear Receptor ; TAF : TBP-Associated Factor ; Ac : groupement acétyle.

Les récepteurs nucléaires exercent leur activité dans le noyau de la cellule en se liant à l'ADN sous forme de monomère, homo- ou hétérodimère sur un élément de réponse spécifique à chaque récepteur nucléaire dans le promoteur de leurs gènes cibles. La majorité des récepteurs nucléaires régule ses gènes cibles en liant un ligand de nature hydrophobe ce qui provoque le recrutement de corégulateurs transcriptionnels au niveau de la chromatine. Les corégulateurs associés aux récepteurs nucléaires modifient l'accessibilité de la chromatine et ils définissent la fréquence d'initiation de la transcription par le complexe général de transcription sur le promoteur des gènes cibles ¹²⁹. Les corégulateurs transcriptionnels recrutés par un récepteur nucléaire peuvent être des corépresseurs ou des coactivateurs transcriptionnels selon la nature pharmacologique du ligand lié au récepteur. Les corépresseurs rendent la chromatine inaccessible aux facteurs généraux de transcription ce qui réprime l'expression des gènes. Les coactivateurs modifient la chromatine en la rendant accessible aux facteurs généraux de transcription sur le promoteur des gènes ce qui active leur expression ¹³⁰.

1.2) Nomenclature

Les récepteurs nucléaires partagent une structure commune qui suggère qu'ils dérivent d'un même ancêtre génétique. Des études phylogénétiques ont montré que l'apparition des récepteurs nucléaires pourrait remonter aux eucaryotes unicellulaires ¹³¹. Les 48 récepteurs nucléaires que l'on retrouve désormais chez l'homme (Figure 16) seraient donc apparus au cours de dérives génétiques successives de gènes ancestraux de récepteurs nucléaires qui ont donné naissance à de nouveaux récepteurs spécialisés. A partir de similitudes de séquences génétiques, les récepteurs nucléaires ont été classés en familles et en sous-familles sur des critères de distance phylogénétique qui ont permis l'établissement d'un arbre phylogénétique sur lequel est basée la nomenclature des récepteurs nucléaires ^{127, 132}. On distingue ainsi 7 familles de récepteurs nucléaires classées de 0 à 6, chacune étant subdivisée en sous-familles représentées par des lettres. Les membres des sous-familles sont identifiés par des chiffres. Selon cette nomenclature, Liver X Receptor alpha (LXR α) est NR1H3 et Liver X Receptor beta (LXR β) est NR1H2 ¹²⁷.

Names	Nomenclature
TR α	NR1A1
TR β	NR1A2
RAR α	NR1B1
RAR β	NR1B2
RAR γ	NR1B3
PPAR α	NR1C1
PPAR β	NR1C2
PPAR γ	NR1C3
Rev-erb α	NR1D1
Rev-erb β	NR1D2
ROR α	NR1F1
ROR β	NR1F2
ROR γ	NR1F3
LXR α	NR1H3
LXR β	NR1H2
FXR α	NR1H4
FXR β^a	NR1H5
VDR	NR1I1
PXR	NR1I2
CAR	NR1I3
HNF4 α	NR2A1
HNF4 γ	NR2A2
RXR α	NR2B1
RXR β	NR2B2
RXR γ	NR2B3
TR2	NR2C1
TR4	NR2C2
TLL	NR2E2
PNR	NR2E3
COUP-TFI	NR2F1
COUP-TFII	NR2F2
EAR2	NR2F6
ER α	NR3A1
ER β	NR3A2
ERR α	NR3B1
ERR β	NR3B2
ERR γ	NR3B3
GR	NR3C1
MR	NR3C2
PR	NR3C3
AR	NR3C4
NGFI-B	NR4A1
NURR1	NR4A2
NOR1	NR4A3
SF1	NR5A1
LRH-1	NR5A2
GCNF	NR6A1
DAX-1	NR0B1
SHP	NR0B2

Figure 16 : Les récepteurs nucléaires humains et leurs ligands ¹²⁷. Dans la colonne de gauche, les noms des récepteurs nucléaires, dans la colonne de droite le nom officiel de leur gène selon la nomenclature phylogénétique des récepteurs nucléaires.

1.3) Structure

La structure moléculaire des récepteurs nucléaires est divisée en cinq domaines fonctionnels (Figure 17). De la partie N-terminale du récepteur vers sa partie C-terminale, on distingue une région activatrice AF-1 (Activation Function 1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain), une région charnière, un domaine de liaison au ligand (LBD : Ligand Binding Domain) et une région activatrice AF-2 (Activation Function 2).

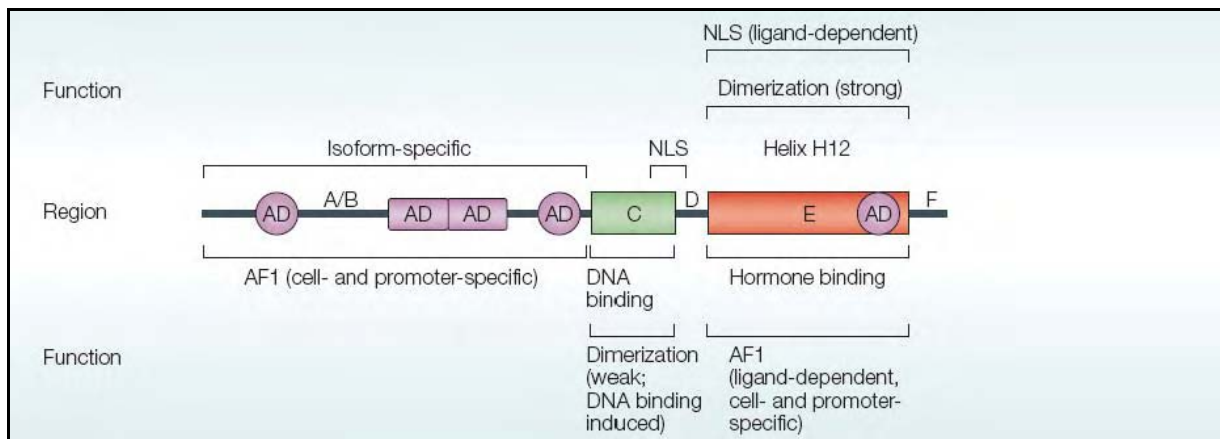


Figure 17 : Structure générale des récepteurs nucléaires ¹²⁸. De leur partie N-terminale vers leur partie C-terminale, les récepteurs nucléaires sont constitués d'un domaine AF-1 (A/B), d'un domaine de liaison de l'ADN (DBD ; C), d'une région charnière (D), d'un domaine de liaison du ligand (E) et d'un domaine AF-2 (F). AF : Activation Function ; AD : Activation Domain ; NLS : Nuclear Localization Signal.

1.3.1) La fonction d'activation 1 (AF-1)

La région AF-1 possède une fonction d'activation de la transcription qui peut être indépendante de la fixation d'un ligand sur les récepteurs nucléaires ^{133, 134}. AF-1 est le domaine le moins conservé des récepteurs nucléaires et le plus variable d'un récepteur nucléaire à l'autre au sein d'une même espèce ¹³⁴. Elle contient des zones mal repliées appelées ID (Intrinsic disorders : désorganisations intrinsèques) qui seraient responsables de sa faible structuration ¹³⁵. Néanmoins, la particularité d'AF-1 est d'adopter une forme structurée en liant des régulateurs transcriptionnels ^{136, 137}, après que des modifications post-traductionnelles d'AF-1 soient opérées ¹³⁸ ou après qu'AF-1 ait subi un changement structural allostérique en coopération avec d'autres domaines du récepteur nucléaire ¹³⁹. La structuration d'AF-1 lui permet ensuite d'exercer sa fonction transcriptionnelle en interagissant avec des cofacteurs transcriptionnels ¹³³⁻¹³⁹. AF-1 est un domaine des récepteurs nucléaires dont l'activité est régulée par phosphorylation, ce qui rend son activité fortement dépendante des signalisations cellulaires spécifiques à chaque type cellulaire ¹⁴⁰. Même si AF-1 est capable d'activer la transcription de gènes en l'absence de la région AF-2 ^{141, 142}, l'activation optimale des gènes par les récepteurs nucléaires nécessite la présence des deux fonctions d'activation de la transcription AF-1 et AF-2 qui permettent ensemble une meilleure stabilisation des corégulateurs transcriptionnels recrutés ¹³³.

Concernant les récepteurs LXRs, une seule étude a décrit brièvement la région AF-1 de l'isotype LXR α . Un isoforme de LXR α , LXR α 2, généré par l'usage d'un promoteur alternatif et pour lequel il manque 45 acides aminés en position N-terminale par rapport au récepteur LXR α entier, LXR α 1, a été identifié par le groupe de Peter Tontonoz. Cet isoforme a une

activité transcriptionnelle réduite par rapport à LXR α ce qui montre l'importance de la région AF-1 pour une activité optimale de LXR α ¹⁴³.

1.3.2) Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Le DBD est le domaine le plus conservé des récepteurs nucléaires. Il confère aux récepteurs nucléaires la capacité d'interagir directement avec une séquence d'ADN spécifique qui constitue un élément de réponse du récepteur nucléaire (HRE : Hormone Response Element : élément de réponse de l'hormone) dans le promoteur de ses gènes cibles. Le HRE peut être une répétition directe (direct repeat : DR) (Figure 18A, B), une répétition inversée (inverted repeat : IR) ou une répétition opposée (everted repeat : ER) du demi-site de séquence consensus AGAACA pour les récepteurs stéroïdiens (PR, MR, GR et AR) ou AGGTCA pour l'ER et les récepteurs non stéroïdiens (Figure 18A) ¹²⁷. La majorité des récepteurs nucléaires se lient aux HREs sous forme de dimères, chacun des deux partenaires se liant sur un des deux demi-sites constituant le HRE (Figure 18B).

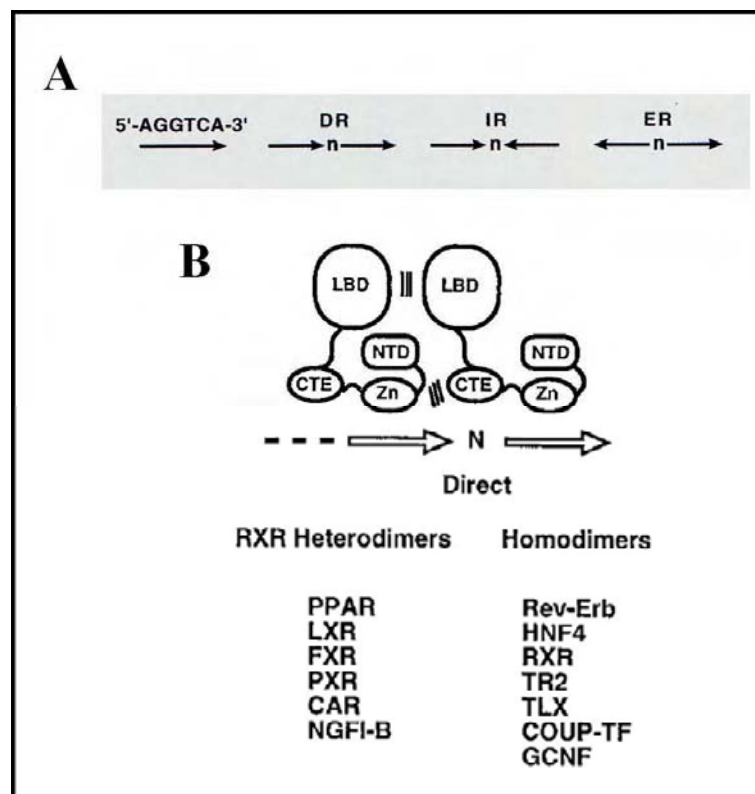


Figure 18 : Les types d'élément de réponse des récepteurs nucléaires. A. Les éléments de réponse des récepteurs nucléaires sont constitués d'une séquence consensus nucléotidique 5'-AGGTCA-3' monomérique ou répétée deux fois de façon directe et séparé par n bases (DR), répétée de façon inversée (IR) ou répétée de façon opposée (ER) ¹⁴⁴. B. Liaison schématique des dimères de récepteurs nucléaires à un élément de réponse direct et exemple non exhaustif de récepteurs nucléaires liant ce type d'élément de réponse en hétérodimère avec RXR ou en homodimère ¹⁴⁵.

Les deux demi-sites sont espacés d'un nombre variable de bases qui contribue à la spécificité de la reconnaissance du HRE par le dimère ^{127, 145}. La structure du DBD des récepteurs nucléaires est connue précisément depuis la première détermination de la structure cristallographique du DBD du récepteur des glucocorticoïdes (GR : Glucocorticoid Receptor) en 1991 ¹⁴⁶. La forte conservation de ce domaine permet de considérer que la structure générale du DBD d'un récepteur nucléaire modèle, comme GR, est transposable à l'ensemble des récepteurs nucléaires ¹⁴⁷.

1.3.2.1) Structure du DBD des récepteurs nucléaires

Le DBD a une structure globulaire (Figure 19C). Il est constitué de deux motifs à doigt de zinc, de deux hélices alpha 1 et 2, et d'une extension C-terminale (CTE) (Figure 19A, B). L'hélice alpha 1 interagit directement avec le sillon majeur de l'ADN tandis que l'hélice alpha 2 stabilise la structure du DBD ¹⁴⁷. Le DBD est subdivisé en 4 séquences peptidiques fonctionnelles qui sont appelées les boîtes P, D, T et A. La boîte P située au niveau de l'hélice alpha 1 permet la reconnaissance d'un demi-site du HRE et elle définit la spécificité de la liaison entre un récepteur nucléaire et son HRE. La boîte D participe à la dimérisation des DBD des récepteurs nucléaires. La boîte D est localisée dans le doigt de zinc C-terminal et elle détermine aussi l'espacement requis entre les deux demi-sites du HRE pour qu'il soit reconnu par le dimère ^{127, 145, 147}.

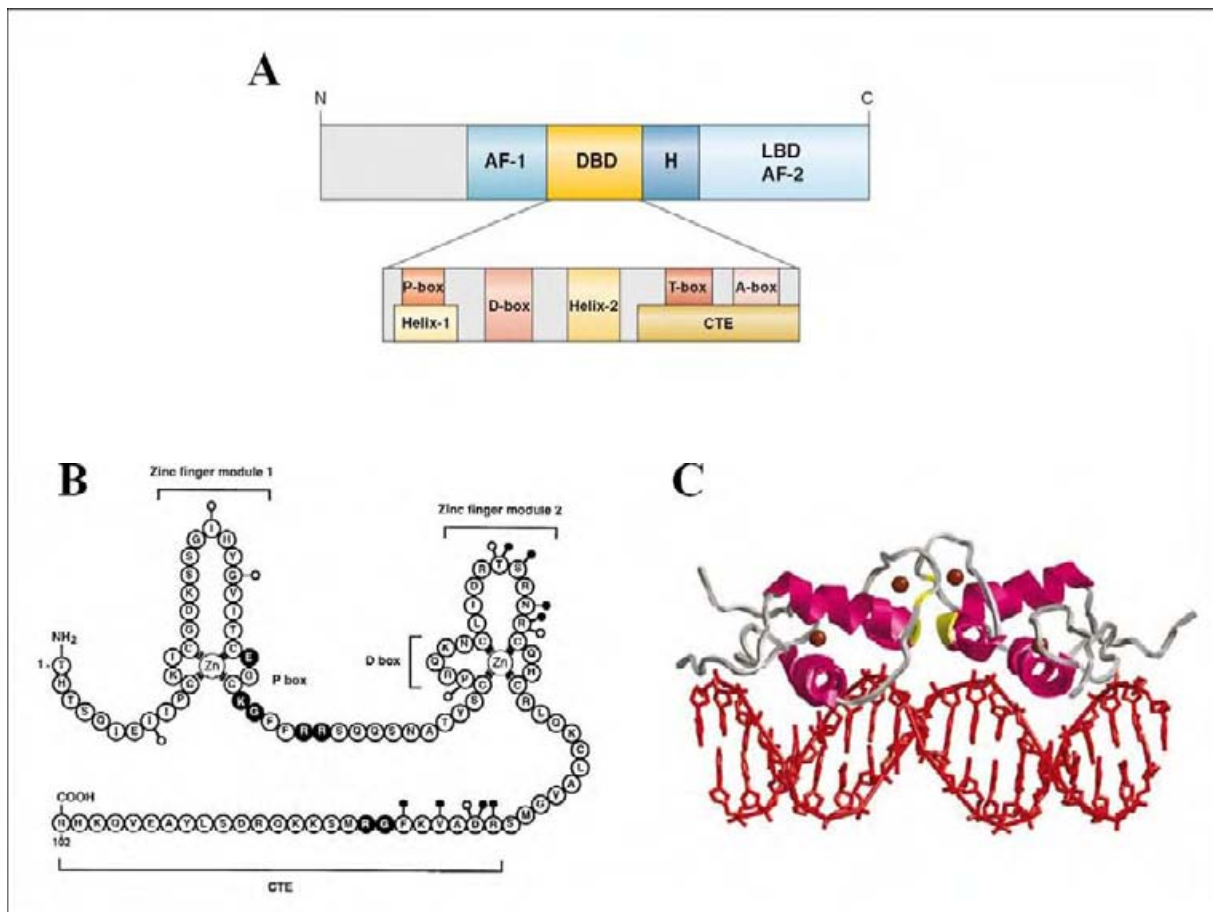


Figure 19 : Le domaine de liaison de l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires. A. Représentation schématique de la structure du DBD¹⁴⁷. B. Structure primaire du DBD et de ses domaines fonctionnels¹⁴⁵. C. Structure cristallographique du DBD du récepteur des glucocorticoïdes (GR) lié à son élément de réponse¹⁴⁷. Le DBD des récepteurs nucléaires est constitué de domaines structuraux appelés « boîtes » : la boîte P, D, T et A. Il se structure en deux hélices alpha qui reconnaissent le sillon majeur de l'ADN et d'une extension C-terminale (CTE) qui participe à la spécificité d'un récepteur nucléaire pour son élément de réponse.

Entre la boîte P et la boîte D, une courte séquence peptidique conservée de 6 acides aminés, appelée le bras levier, adopte une conformation qui varie suivant la séquence du HRE lié par le DBD. Les boîtes T et A sont présentes au niveau de l'extension C-terminale du DBD. La boîte T stabilise la dimérisation des DBD et la boîte A stabilise la liaison entre le dimère et l'ADN en interagissant avec le sillon mineur de l'ADN au niveau des séquences flanquant le HRE¹⁴⁷. L'extension C-terminale du DBD est une région qui n'est pas conservée entre les récepteurs nucléaires et qui adopte une conformation unique. Son interaction avec des bases de l'ADN flanquant le HRE participe à la spécificité d'un récepteur nucléaire vis-à-vis des gènes qu'il régule^{147, 148}.

1.3.3) La région charnière

La région charnière confère une flexibilité au récepteur nucléaire entre le LBD et le DBD. Lorsque les récepteurs nucléaires sont dimérisés, la région charnière permet la rotation des DBDs du dimère pour qu'ils s'adaptent à l'orientation des demi-sites du HRE. Cela permet au LBD et au DBD d'adopter plusieurs orientations sans être confrontés à des problèmes de gêne stérique^{127, 145}.

1.3.4) Le domaine de liaison au ligand (LBD)

Le domaine de liaison au ligand est une région conservée, très structurée et multifonctionnelle. Il contient la poche de liaison du ligand (LBP : Ligand Binding Pocket) qui est le site de fixation des ligands spécifiques de chaque récepteur nucléaire. Le LBD interagit avec différents corégulateurs transcriptionnels selon sa conformation. Le LBD présente aussi une interface de dimérisation qui permet aux récepteurs nucléaires de s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec le partenaire RXR (Retinoid X Receptor)^{127, 145, 149}. Les structures cristallographiques de LBDs de nombreux récepteurs nucléaires ont montré que la structure générale du LBD est similaire entre les récepteurs nucléaires^{128, 149}. La structure tridimensionnelle d'un LBD a été élucidée pour la première fois en 1995 avec le LBD de RXR α ¹⁵⁰.

1.3.4.1) Structure du LBD des récepteurs nucléaires

Le LBD est formé de 12 hélices alpha et d'un coude beta, organisés en trois feuillets anti-parallèles formant une structure générale globulaire en sandwich (Figure 20A). Les hélices 1, 2, 3, 6, 7 et 10 forment les deux feuillets extérieurs du LBD. Les hélices 4, 5, 8, 9 et le coude beta forment le feuillet central du LBD. L'organisation spatiale des hélices alpha laisse une cavité à l'intérieur du LBD qui forme la LBP, qui est entourée par les résidus de plusieurs hélices alpha. La LBP est la région la plus variable du LBD des récepteurs nucléaires. La structure de la LBP détermine quels ligands peuvent se lier spécifiquement au LBD selon la forme de la LBP, sa taille, ainsi que les résidus de la LBP qui interagissent avec des ligands spécifiques et stabilisent leur liaison^{149, 150}. La taille et la forme de la LBP semble corrélées avec la fonction d'un récepteur nucléaire. En effet, les récepteurs des hormones stéroïdiennes, comme le récepteur des oestrogènes, possèdent une LBP de petite taille qui ne peut fixer que quelques ligands avec une très forte affinité. Cela leur permet de répondre très sensiblement à des situations physiologiques très précises dans les systèmes endocriniens. Au contraire, les

récepteurs nucléaires qui lient des métabolites, comme les récepteurs LXR, ont une LBP de taille importante qui leur permet de fixer différents métabolites de structure variable avec une faible affinité pour réguler l'ensemble d'une voie métabolique en agissant comme des senseurs métaboliques^{128, 149, 151}. La région C-terminale du LBD contient le domaine AF-2 qui établit la fonction transcriptionnelle du LBD. Ce domaine est formé par l'hélice 12 du LBD dont le repliement varie en fonction du ligand fixé. Sa position détermine le type de corégulateur recruté sur le récepteur nucléaire.

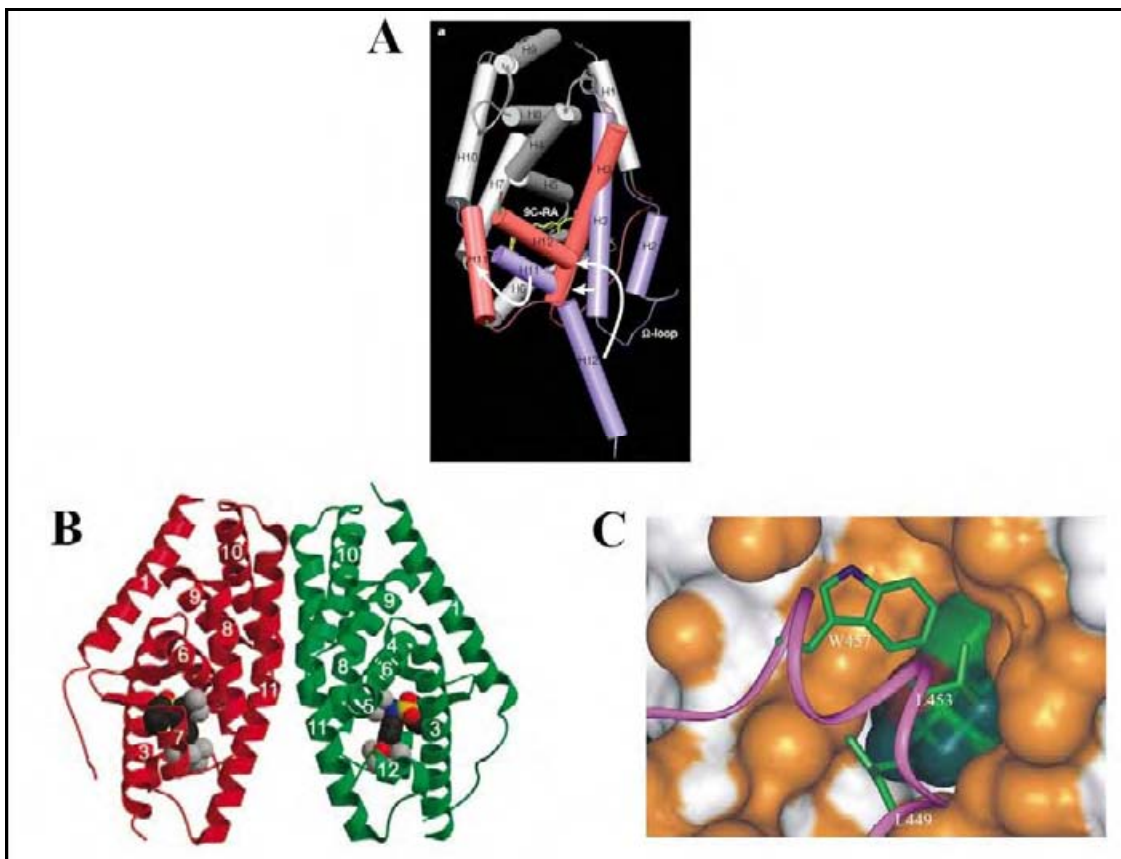


Figure 20 : Domaine de liaison du ligand (LBD) des récepteurs nucléaires. A. LBD du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) avec la numérotation des hélices alpha le constituant¹²⁸. B. Structure cristallographique de l'homodimère du LBD de LXR β lié au T0901317¹⁵². C. Poche de liaison du ligand (LBP) de LXR β lié au T0901317. L'hélice 12 a été artificiellement effacée et la zone de contact entre l'hélice 12 et la LBP est colorée en marron¹⁵³.

1.3.4.2) Structure du LBD des LXRs

La structure générale des LBDs des LXRs est comparable à celle des autres LBDs des récepteurs nucléaires (Figure 20B). L'homologie entre les LBDs de LXR α et de LXR β est de 75%¹⁵². La LBP a une forme cylindrique et son volume est estimé à environ 700 Å³ pour les deux LXRs humains (Figure 20C)^{154, 155}. La LBP de grand volume des LXRs leur permet de

fixer un vaste panel d'oxystérols, qui sont les ligands naturels des LXRs avec un volume moyen de 400 \AA^3 , et agir ainsi comme des senseurs du métabolisme des stérols. En comparaison, les récepteurs des hormones stéroïdiennes ont une LBP d'environ 400 \AA^3 qui ne s'accommode qu'avec des ligands endocriniens très spécifiques de volume proche de celui de la LBP¹⁵⁵. Le glutamate 267 de LXR α humain (glutamate 281 pour LXR β humain) intervient dans la liaison des oxystérols aux LXRs en interagissant avec l'hydroxyle en C3 présent dans tous les oxystérols^{154, 155}. La phénylalanine 268 de LXR β est aussi très importante pour la liaison des oxystérols¹⁵⁶. La LBP des LXRs est principalement hydrophobe et les résidus qui établissent des interactions avec les ligands sont les mêmes pour LXR α que pour LXR β , ce qui rend difficile la synthèse de ligands spécifiques de l'un ou l'autre des isotypes. Les différences entre les deux récepteurs permettant la synthèse de ligands isotype-spécifiques se situent au niveau de résidus en dehors de la LBP et qui ne sont pas conservés entre les deux LXRs.

Il a été montré que LXR β peut adapter le volume de sa LBP en fonction du ligand lié. En effet, un agoniste synthétique de grande taille des LXRs, le GW3965, provoque une augmentation du volume total de la LBP qui mesure alors 1000 \AA^3 environ. Le mécanisme d'action de ce ligand consiste à ouvrir l'accès vers une cavité adjacente à la LBP lui permettant d'accroître le volume total de la LBP, qui rend possible la liaison d'un ligand de taille plus importante que le volume initial de la LBP, de 700 \AA^3 . Le GW3965 se lie avec la même affinité aux deux LXRs ce qui suggère que LXR α lie cet agoniste de la même façon que LXR β . Cela montre que les LBDs des LXRs ont une structure modulable qui leur permet de lier un panel de ligand important, de taille et de structure diversifiées¹⁵². Des isoformes de LXR α ont été identifiées pour lesquels la séquence du LBD est différente de LXR α 1. Il s'agit de LXR α 3, LXR α 4 et LXR α 5¹⁵⁷. LXR α 3 a une délétion de 60 acides aminés dans son LBD, LXR α 4 a une insertion de 64 acides aminés au niveau des hélices 4 et 5 du LBD et LXR α 5 a une délétion des hélices 7 à 12. Des études *in vitro* ont mis en évidence un potentiel antagoniste de LXR α 5 sur l'activité transcriptionnelle de LXR α 1 puisque LXR α 5 recrute des corépresseurs sur le promoteur des gènes cibles de LXR α 1. Pour l'instant, aucun rôle n'a été identifié pour ces isoformes de LXR α .

1.4) Mécanisme d'action

1.4.1) Liaison à l'ADN

Les récepteurs nucléaires exercent principalement leur action en se liant directement à l'ADN grâce à leur DBD sur le promoteur de leurs gènes cibles. La reconnaissance du HRE permet à un récepteur nucléaire de se lier au promoteur de son gène cible pour réguler l'accessibilité de la chromatine en amont du point d'initiation de la transcription et positionner le complexe général de transcription¹⁵⁸. Certains récepteurs nucléaires, comme les récepteurs des hormones stéroïdiennes, dépendent de la liaison de leur ligand pour pouvoir se lier à leur élément de réponse. En effet, ces récepteurs sont cytoplasmiques en l'absence de ligand et ils sont transloqués au noyau après avoir fixé leur ligand^{145, 159}. D'autres récepteurs nucléaires comme les LXRs sont liés à leur élément de réponse même en l'absence de ligand¹⁶⁰. La majorité des récepteurs nucléaires se lient à leur élément de réponse sous forme de dimère (Figure 21) mais d'autres récepteurs nucléaires, Rev-erb, RORs, SF-1, Nur77, Nurr1, NOR1, et ERR, se lient sous forme de monomère sur un HRE qui ne contient qu'un seul demi-site consensus¹⁶¹. L'orientation des DBD au sein du dimère définit quel type d'élément de réponse est reconnu par le dimère. Les DBD orientés dos à dos reconnaissent des demi-sites opposés (ER), ceux qui sont orientés face à face se lient à des demi-sites inversés (IR)^{127, 162}, alors que les DBD orientés dans le même sens reconnaissent des demi-sites répétés de façon directe (DR)^{127, 163}. L'hétérodimère LXR/RXR se lie à des éléments de réponse de type DR-4, c'est-à-dire une DR présentant un espacement de 4 bases entre les deux demi-sites¹⁶⁴. La plupart des HRE sont dégénérés c'est-à-dire que leur séquence s'éloigne plus ou moins de la séquence consensus des demi-sites du HRE. Les récepteurs nucléaires se lient à leurs HRE avec une affinité variable suivant leur séquence. Aussi, l'état de la chromatine dans laquelle se trouve un HRE influence son accessibilité par le récepteur nucléaire. Les séquences des HRE et le degré de condensation de la chromatine étant différents d'un promoteur à un autre, la régulation de l'expression génique par un récepteur nucléaire lié à un ligand peut donc être variable selon le gène et le type cellulaire considérés^{165, 166}. La liaison des hétérodimères à l'ADN respecte une polarité qui dépend de l'hétérodimère considéré (Figure 21)^{163, 167}. Par exemple pour l'hétérodimère PPAR γ -RXR α , PPAR γ occupe le demi-site 5' d'un élément de réponse DR1 (Figure 21A, B)^{163, 168, 169}, tandis que dans les hétérodimères RAR-RXR et VDR-RXR qui se lient respectivement sur des éléments de réponse DR5 et DR3, RAR et VDR occupent le demi-site en 3' (Figure 21A, C)¹⁶³. Dans l'hétérodimère LXR/RXR, LXR occupe le demi-site 3' du HRE¹⁶⁴. La résolution cristallographique de l'hétérodimère PPAR γ -

RXR α lié à son élément de réponse a permis de montrer que le déterminant majeur de la polarité de la liaison à l'ADN est l'extension C-terminale du DBD de PPAR γ qui reconnaît une séquence AAAC flaquant le demi-site 5' du HRE. L'extension C-terminale définit aussi quel espacement est nécessaire entre les demi-sites du HRE pour que le HRE soit reconnu par l'hétérodimère ¹⁴⁸.

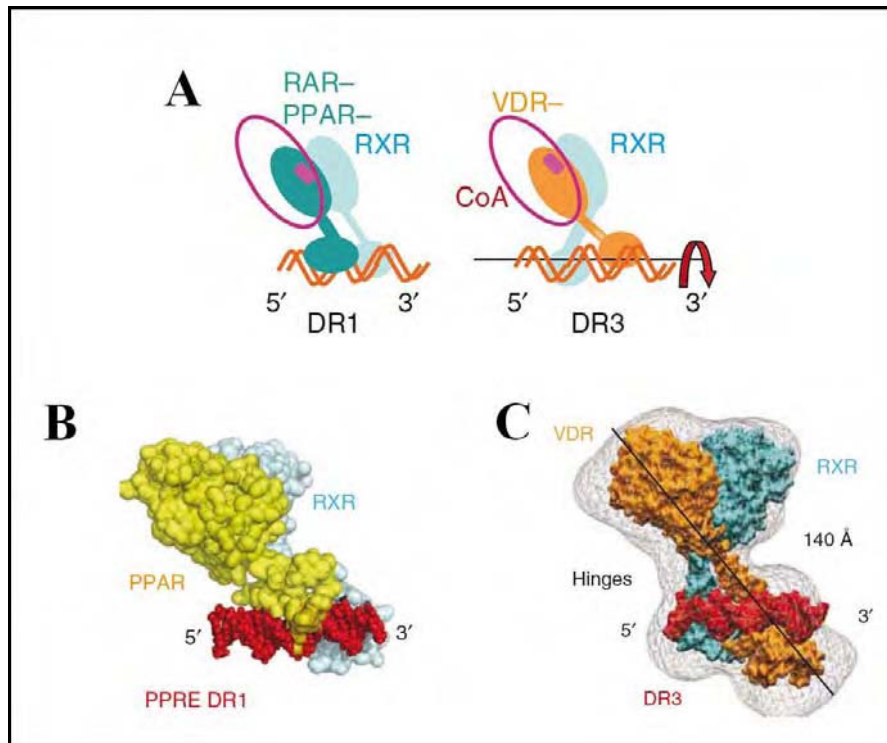


Figure 21 : Liaison de récepteurs nucléaires à l'ADN sous forme d'hétérodimère avec RXR ¹⁶³. A. Représentation schématique de la liaison des hétérodimères à leur élément de réponse où RXR occupe la position 3', comme pour PPAR/RXR, ou la position 5', comme pour VDR/RXR. B. Structure tridimensionnelle de PPAR/RXR lié à son élément de réponse DR1. C. Structure tridimensionnelle de VDR/RXR lié à son élément de réponse DR3. RAR : Retinoic Acid Receptor ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor ; VDR : Vitamin D Receptor ; PPRE : PPAR Response Element ; DR : Direct Repeat.

1.4.2) Dimérisation

Les récepteurs stéroïdiens s'homodimérisent alors que les récepteurs non stéroïdiens, pour la plupart, s'hétérodimérisent avec RXR. Chez les récepteurs nucléaires, il existe deux interfaces de dimérisation : une interface de dimérisation au niveau du DBD et une deuxième interface au niveau du LBD ¹⁴⁹. La comparaison de structures cristallographiques d'homodimères et d'hétérodimères de LBDs de récepteurs nucléaires a permis de constater que leur organisation générale est similaire, à la différence d'une dimérisation légèrement moins symétrique dans les hétérodimères. L'interface de dimérisation des LBDs implique des résidus des hélices H7, H9, H10 et H11 des deux LBDs ¹²⁷. Dans l'hétérodimère LXR/RXR, la surface d'interaction est formée par les hélices 9 et 10 des deux partenaires ¹⁵⁴. La dimérisation des récepteurs

nucléaires avec RXR se fait en deux temps. Premièrement, RXR forme un hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire grâce à leur interface de dimérisation situé dans le LBD. Dans un deuxième temps, les DBDs de l'hétérodimère, grâce à leur proximité, peuvent lier un HRE spécifique avec une forte affinité et se dimériser au niveau de leur boîte D¹⁴⁴. D'un point de vue structural, la dimérisation des récepteurs nucléaires favorise leur liaison à l'ADN en induisant un changement conformationnel de l'extension C-terminale des DBDs qui lève un encombrement stérique empêchant leur interaction avec l'ADN¹⁷⁰. Réciproquement, la liaison à l'ADN permet de stabiliser les dimères de récepteurs nucléaires^{147, 162}. Dans les récepteurs nucléaires qui s'hétérodimérisent avec RXR, la liaison de leur ligand affecte l'interface de dimérisation en communiquant des changements allostériques à leur partenaire indiquant que la LBP et l'interface de dimérisation sont énergétiquement couplées. Ce moyen de communication allostérique entre les deux partenaires des hétérodimères explique la permissivité de certains de ces hétérodimères¹⁷¹, que nous expliquerons dans la partie 1.4.5). Les hétérodimères RXR se lient à des éléments de réponse directs (DR), comme l'hétérodimère LXR/RXR, ne recrutent qu'un seul corégulateur transcriptionnel qui se lie au partenaire de RXR. Malgré la variabilité de la polarité de liaison à l'ADN, tous les hétérodimères placent le LBD du partenaire de RXR en 5' du HRE. Cette topologie commune définit un recrutement orienté du corégulateur ce qui permettrait son positionnement correct à proximité de la chromatine pour qu'il puisse modifier son accessibilité¹⁶³.

Les LXRs sont capables de s'homodimériser en absence de RXR ainsi que lier un ligand agoniste sous forme d'homodimère. Toutefois, en présence de RXR, les LXRs s'hétérodimérisent systématiquement avec RXR. En effet, l'hétérodimère LXR/RXR est plus stable que les homodimères LXR/LXR¹⁷². L'homodimère LXR/LXR n'aurait donc de relevance physiologique que dans un type cellulaire exprimant les LXRs mais n'exprimant pas de RXRs.

1.4.3) Liaison du ligand et recrutement des corégulateurs

Les ligands des récepteurs nucléaires sont lipophiles et de petite taille. Leur nature lipophile leur permet de traverser facilement la double couche lipidique des membranes biologiques pour atteindre leur récepteur cible dans le cytoplasme ou le noyau des cellules. Parmi les ligands naturels des récepteurs nucléaires, on compte des dérivés du cholestérol, des rétinoïdes, des prostaglandines, des acides gras ou des acides aminés modifiés. La forme du ligand, sa taille ainsi que les interactions chimiques qu'il est capable de faire avec les résidus

de la LBP définissent la spécificité et l'affinité de sa liaison à son récepteur nucléaire ¹²⁷. En présence d'un agoniste, l'entrée de la LBP du récepteur nucléaire est fermée par l'hélice 12 qui forme une sorte de couvercle au-dessus de la LBP (Figure 20C). Lorsque le LBD n'est pas lié à un ligand, l'hélice 12 est en position ouverte et permet au ligand de pénétrer dans la LBP (Figure 22A). La liaison d'un ligand à la LBP induit un changement conformationnel du LBD qui stabilise l'hélice 12 dans une position précise. L'orientation de l'hélice 12 est la conséquence d'effets allostériques induits par la structure chimique particulière d'un ligand. La position qu'adopte l'hélice 12 définit quel type de corégulateur est recruté par le récepteur nucléaire : un coactivateur si le ligand est un agoniste ou un corépresseur si le ligand est un agoniste inverse ¹²⁸.

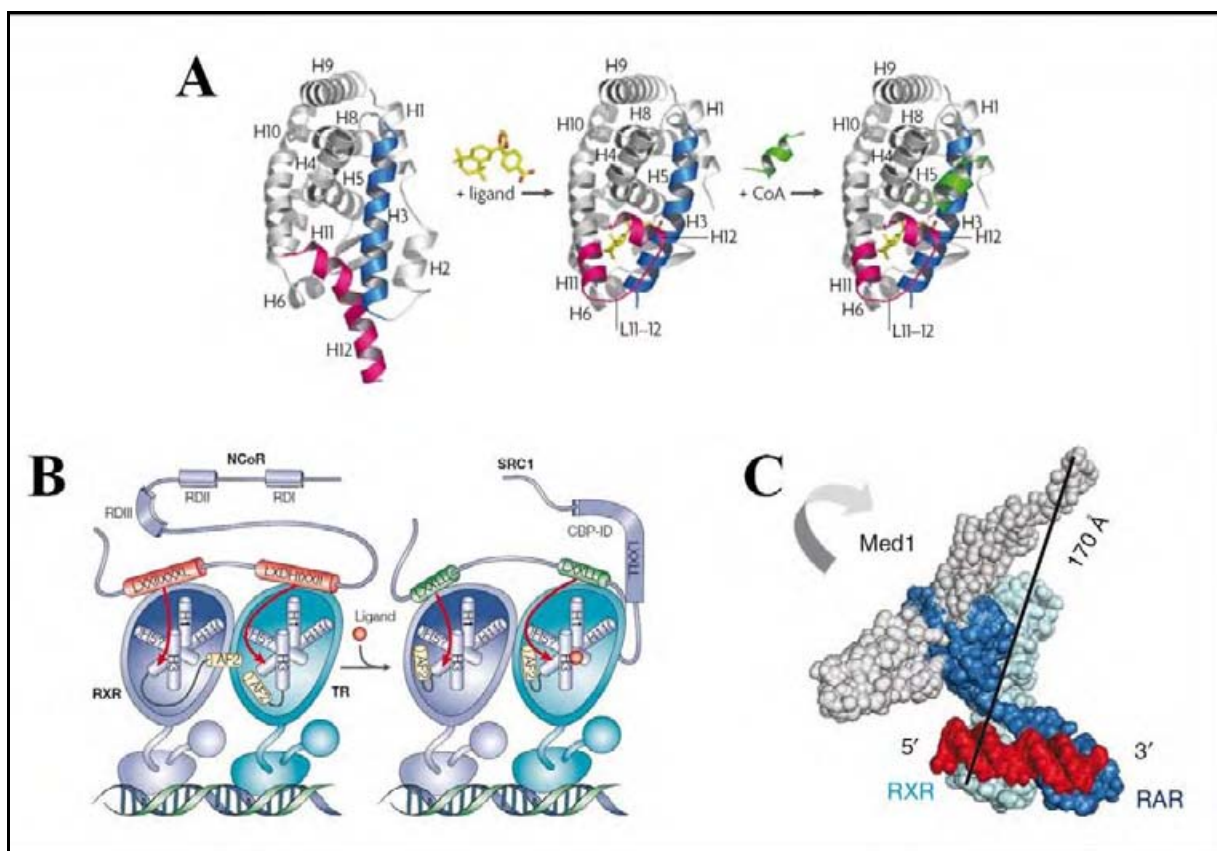


Figure 22 ; Recrutement des corégulateurs transcriptionnels par les récepteurs nucléaires. A. La liaison d'un agoniste sur le LBD d'un récepteur nucléaire (dans cet exemple, RXR) provoque un repliement de l'hélice 12 ce qui permet le recrutement d'un coactivateur ¹⁷³. B. En absence de ligand, des hétérodimères (dans cet exemple, TR/RXR) lient un corépresseur en interagissant avec leur séquence LXXIIXXXL. La liaison d'un ligand provoque un changement conformationnel du LBD qui dissocie son interaction avec le corépresseur et qui permet le recrutement d'un coactivateur en interagissant avec sa séquence LXXLL ¹⁵⁸. C. Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère RAR/RXR lié à son élément de réponse et à la sous-unité Med1 du complexe Mediator qui intervient dans l'activation de la transcription ¹⁶³. NCoR : Nuclear CoRepressor ; SRC1 : Steroid Receptor Coactivator 1 ; RXR : Retinoid X Receptor ; TR : Thyroid hormone Receptor ; RAR : Retinoic Acid Receptor ; Med1 : Mediator subunit 1.

La réponse d'un récepteur nucléaire à un ligand dans un tissu particulier est dictée par l'ensemble de corégulateurs avec lesquels le récepteur nucléaire interagit en fonction de l'exposition de différentes surfaces d'interaction du LBD ¹²⁸. Les surfaces d'interaction du LBD avec les corégulateurs sont formées par les hélices 3, 4 ainsi que l'hélice 12. Le changement de la position de l'hélice 12 consécutivement à la liaison d'un ligand change la topologie de la surface d'interaction qui devient spécifique d'un corégulateur ou d'un type de corégulateur particulier (coactivateur ou corépresseur) ^{128, 173, 174}. Une partie de la surface d'interaction des corépresseurs se superpose avec la surface d'interaction des coactivateurs. Lorsque le LBD n'est pas lié à un ligand, l'hélice 12 adopte une position ouverte, ce qui laisse un sillon hydrophobe sur le LBD propice à sa reconnaissance par un motif peptidique spécifique présent dans les corépresseurs : LxxxIxxxL (avec L = Leucine ; x = acide aminé quelconque ; I = Isoleucine) (Figure 22B). Dans ce cas de figure, le LBD interagit donc avec un corépresseur. La liaison d'un agoniste provoque un changement conformationnel de l'hélice 12 qui déstabilise la liaison du corépresseur et qui permet le repliement de l'hélice 12 sur le LBD, fermant ainsi la LBP. Une nouvelle surface d'interaction est ainsi créée où le sillon hydrophobe est nettement plus court et permet l'interaction d'un motif peptidique présent dans les coactivateurs : LxxLL. L'interaction du LBD avec les coactivateurs est stabilisée par deux acides aminés chargés très conservés : une lysine présente sur l'hélice 3 et un acide glutamique présent sur l'hélice 12. Ces deux acides aminés forment un « charge-clamp » (pince de charge) qui interagit aux deux extrémités du motif LxxLL des coactivateurs. En se repliant sur le LBD, l'hélice 12 rapproche les deux acides aminés du charge-clamp pour qu'il présente l'écartement adéquat pour interagir avec les coactivateurs, et par la suite la liaison d'un coactivateur stabilise la position de l'hélice 12 ^{174, 175}. Les corégulateurs recrutés (Figure 22C) régulent ensuite l'expression des gènes cibles du récepteur nucléaire concerné.

1.4.4) Le cycle des récepteurs nucléaires

Pour activer la transcription de leurs gènes cibles, il a été montré que des récepteurs nucléaires ont une action cyclique sur leurs promoteurs. Par exemple, ER α fixe son ligand et reconnaît son élément de réponse sur le promoteur de son gène cible après s'être dimérisé. Ensuite, il recrute les corégulateurs transcriptionnels et le complexe général de transcription est activé sur le promoteur. Puis le récepteur nucléaire libère le promoteur et il est dégradé par le protéasome ce qui permet l'initiation d'un nouveau cycle sur ce promoteur par un nouveau

récepteur ER α activé par son ligand. La durée de chaque cycle d'activation du promoteur du gène pS2 par ER α lié à l'oestradiol est approximativement de 20 minutes (Figure 23) ¹²⁹.

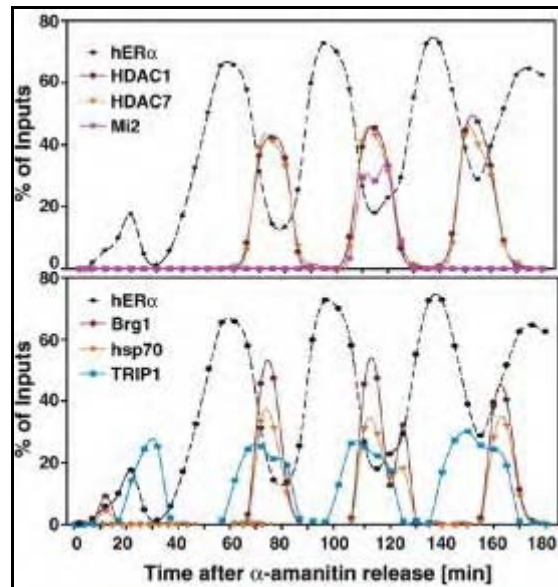


Figure 23 : Recrutement cyclique d'ER α et des corégulateurs transcriptionnels sur le promoteur du gène pS2 en fonction du temps ¹²⁹. Le recrutement des corégulateurs transcriptionnels par ER α lié à son élément de réponse est effectué de manière cyclique et séquentielle en suivant un ordre précis. ER : Estrogen Receptor ; HDAC : Histone Deacetylase ; Brg1 : Brahma-Related Gene 1 ; Hsp70 : Heat shock protein 70 ; TRIP1 : TGF β Receptor-Interacting Protein1.

La libération d'un promoteur activé par un récepteur nucléaire est corrélée avec la dégradation du récepteur par le protéasome ¹⁷⁶. La dégradation d'un récepteur nucléaire est nécessaire pour qu'il active la transcription d'un gène cible, comme le démontre l'inhibition du protéasome qui diminue significativement l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Ce mécanisme est analogue à la dégradation des récepteurs couplés aux protéines G après leur activation à la surface de la cellule pour éviter une désensibilisation du récepteur pour son ligand. Cela permet d'obtenir une réponse biologique qui reste dépendante du ligand qui l'induit. Le signal de dégradation du récepteur nucléaire est greffé sur le LBD et il peut être provoqué par un agoniste comme par un antagoniste ¹⁷⁹. Ce signal est une poly-ubiquitinylation catalysée par des ubiquitine-conjugases et des ubiquitine-ligases qui interagissent avec les corégulateurs transcriptionnels recrutés par le récepteur nucléaire, et qui adressent le récepteur nucléaire au protéasome 26S. Par exemple, l'ubiquitine conjugase UBCH7 a été identifié dans des complexes transcriptionnels impliquant plusieurs récepteurs nucléaires où elle a un rôle de coactivateur ¹⁸⁰.

Il a été montré que LXR subit une déacétylation de la Lysine 432 (LXR α) ou 433 (LXR β) de son LBD par la sirtuine SIRT1. Cette déacétylation stimule l'activité transcriptionnelle de

LXR en rendant la lysine accessible à une polyubiquitinylation de LXR qui permet sa dégradation. En effet, après que LXR ait initié la transcription de son gène cible, son cycle d'activation est terminé. Son adressage au protéasome après sa polyubiquitinylation permet de libérer le promoteur pour qu'un autre cycle d'activation transcriptionnelle soit initié sur ce promoteur par un nouveau récepteur LXR actif. Cela augmente la fréquence d'initiation de la transcription du gène cible et de ce fait l'activité transcriptionnelle de LXR¹⁸¹. La stabilité de LXR est aussi contrôlée avant son activation par un ligand. En absence de ligand, LXR est associé à l'E3 Ubiquitine ligase BRCA1-BARD1 qui ubiquitine LXR et l'adresse au protéasome ce qui maintient un niveau d'expression modéré de LXR dans la cellule. En présence de ligand, LXR se dissocie de BRCA1-BARD1 ce qui le stabilise pour réguler de manière optimale ses gènes cibles¹⁸².

1.4.5) Allostérie des récepteurs nucléaires

Les domaines des récepteurs nucléaires ont une structure hautement modulable par des interactions intra- et intermoléculaire qui influencent leur conformation de façon allostérique¹⁸³. Cette grande flexibilité structurale allostérique confère une forte adaptabilité des récepteurs nucléaires aux différentes combinaisons d'interactions auxquelles ils sont soumis au sein de la cellule¹³⁵.

- ***AF-1*** : La région AF-1 des récepteurs nucléaires se structure essentiellement de façon allostérique. En l'absence d'interaction intramoléculaire et/ou intermoléculaire elle est déstructurée ce qui rend la résolution de sa structure tridimensionnelle par cristallographie aux rayons X actuellement impossible. Plusieurs types d'interactions structurent AF-1 ce qui lui permet ensuite d'interagir avec des corégulateurs transcriptionnels. En présence de l'osmolyte triméthylamine N-oxyde (TMAO), l'AF-1 de GR acquiert des structures secondaire et tertiaire lui permettant d'interagir avec des cofacteurs transcriptionnels comme TBP et SRC-1¹⁸⁴. La liaison du DBD à l'ADN induit une structuration allostérique d'AF-1, et le DBD est un important stabilisateur de la structure d'AF-1 de GR¹⁸⁵. La liaison de cofacteurs sur GR participe aussi à la structuration de son AF-1¹³⁹ puisqu'il a été montré que l'interaction de TBP avec l'AF-1 de GR structure de nouvelles régions d'AF-1 qui facilitent son interaction avec SRC-1¹³⁶. Les différentes interactions qui structurent AF-1 induisent chacune une structuration spécifique appelée conformère. La multiplicité des conformères adoptés par AF-1 en fonction des interactions rencontrées lui permet de s'adapter aux

différents partenaires avec lesquels elle peut interagir dans une situation particulière¹³⁵. Bien que des modes de structuration généraux d'AF-1 puissent être applicables à l'ensemble des récepteurs nucléaires, les interactions spécifiques qui structurent la région AF-1 doivent être définies pour chaque récepteur nucléaire à cause de l'absence de conservation de ce domaine d'un récepteur nucléaire à un autre¹⁴⁷.

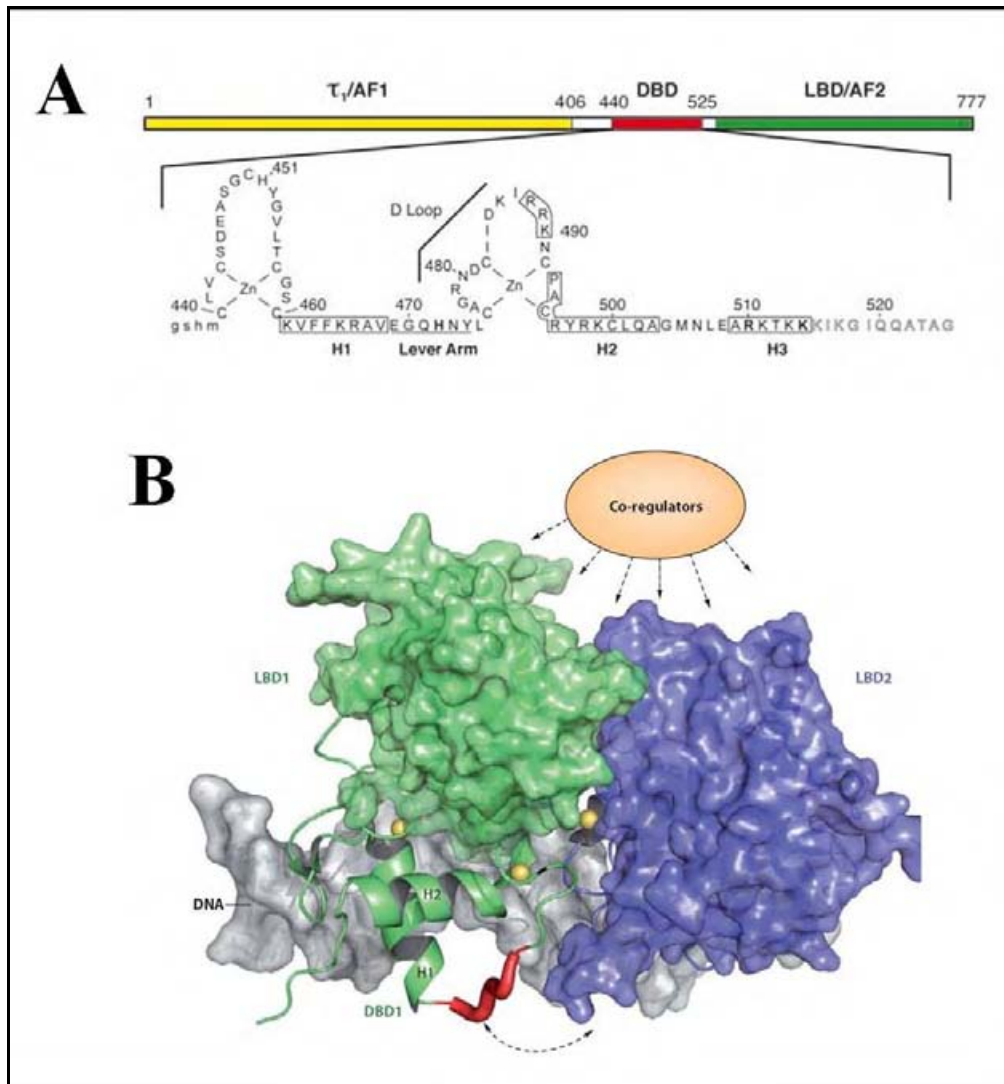


Figure 24 : Le bras levier du DBD des récepteurs nucléaires. A. Le bras levier dans la structure primaire du DBD du récepteur des glucocorticoïdes¹⁸⁶. B. Le bras levier et son repliement après la fixation d'un hétérodimère à son élément de réponse¹⁸⁷. La conformation du bras levier est modulée par la composition de l'élément de réponse et influence le recrutement des corégulateurs transcriptionnels par le récepteur nucléaire. AF : Activation Function ; DBD : DNA Binding Domain ; LBD : Ligand Binding Domain.

- DBD : Il est désormais établi que l'élément de réponse sur lequel se fixe le DBD n'est pas simplement un point d'ancrage du récepteur nucléaire sur le promoteur de ses gènes cibles. L'élément de réponse fonctionne comme un ligand allostérique qui exerce son action sur le récepteur nucléaire par l'intermédiaire du DBD^{135, 186-188}.

L'effet allostérique d'un HRE est indépendant de l'affinité du récepteur nucléaire pour ce HRE. Les changements de séquence du HRE induisent des changements allostériques différents sur un récepteur nucléaire qui stabilisent un conformère du DBD. La conformation adoptée par le bras levier du DBD (Figure 24) communique un signal allostérique au LBD qui recrute différents corégulateurs transcriptionnels selon la séquence du HRE, et cela pour un même ligand. Cela permet d'expliquer les effets promoteur-spécifiques d'un ligand d'un récepteur nucléaire ¹⁸⁶.

Cette influence allostérique sur les récepteurs nucléaires permettrait d'expliquer l'observation de HREs négatifs qui induisent un recrutement de corépresseurs lorsqu'un récepteur nucléaire est lié à un agoniste ^{189, 190}. Pour le récepteur LXR α , deux LXRE (LXR Response Element : élément de réponse de LXR) négatifs ont été identifiés dans les gènes CYP51A1 (Lanostérol 14 alpha-déméthylase) et FDFT1 (Farnésyl diphosphate farnésyltransférase 1). La présence de ces LXREs négatifs dans les promoteurs de ces gènes permet à LXR α de réprimer leur expression et d'inhiber la cholestérogénèse en présence d'agonistes ¹⁹⁰.

- LBD: Le LBD est le récepteur de nombreux signaux allostériques. Comme nous venons de le voir, le DBD communique des signaux allostériques au LBD en fonction de la séquence du HRE lié. Le ligand qui se fixe au LBD induit un changement structural qui permet le recrutement de corégulateurs transcriptionnels. La fixation du ligand induit aussi une augmentation de la stabilité du DBD et la reconnaissance du HRE par le biais de communications allostériques entre le LBD et le DBD, comme cela a été montré pour VDR ¹⁸⁸. Dans les hétérodimères, le partenaire de dimérisation influence le recrutement de corégulateurs par le LBD grâce à des communications allostériques à l'interface de dimérisation qui définissent la permissivité ou la non permissivité des différents hétérodimères impliquant le partenaire RXR ¹⁷¹. Les hétérodimères permissifs sont pour la plupart des senseurs de produits dérivés du métabolisme lipidique. Ces hétérodimères, comme PPAR/RXR, FXR/RXR et LXR/RXR, peuvent être activés par le ligand de RXR, l'acide 9-cis rétinoïque, ainsi que par le ligand du partenaire de RXR. Lorsque les deux ligands sont présents simultanément, ils activent la transcription de manière synergique ¹⁴⁹. La permissivité des hétérodimères est due à un réseau de communications allostériques formé par des résidus conservés qui connecte fonctionnellement l'interface de dimérisation, les régions AF-2, les surfaces d'interaction pour les corégulateurs et les LBPs des

partenaires de l'hétérodimère ¹⁷¹. Par exemple, lorsque l'acide 9-cis rétinolique est lié à RXR dans l'hétérodimère permissif LXR/RXR, le réseau de communications allostérique transmet le signal de fixation à LXR qui recrute des coactivateurs au niveau de son AF-2 ^{164, 171}. Dans cet hétérodimère, seul l'AF-2 de LXR est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle par l'acide 9-cis rétinolique ¹⁶⁴, ce qui montre que la connexion allostérique entre les deux partenaires est essentielle à la permissivité de l'hétérodimère LXR/RXR ^{171, 191}.

1.4.6) Cross-talks des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression génique en se fixant directement à leur HRE mais aussi ils effectuent une part importante de cette régulation en interagissant physiquement ou fonctionnellement avec d'autres facteurs de transcription. Ces interactions s'appellent des cross-talks, qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs de la réponse transcriptionnelle induite par le facteur de transcription avec lequel un récepteur nucléaire interagit. Les cross-talks ajoutent une spécificité cellulaire à l'action des récepteurs nucléaires puisque les facteurs de transcription avec lesquels ils interagissent peuvent avoir un rôle et/ou un impact différent d'un type cellulaire à un autre ¹⁹².

1.4.6.1) Cross-talks de LXR dans l'inflammation

Les cross-talks permettent aux récepteurs nucléaires de réprimer l'activité transcriptionnelle d'un facteur de transcription, dont les plus connus sont les cross-talks avec AP-1 (Activator Protein-1) et NF-κB (Nuclear Factor κB) : ce mécanisme s'appelle la transrépression (Figure 25) ^{127, 192}. La transrépression est effectuée par une interaction du récepteur nucléaire avec le facteur de transcription lié à l'ADN, sans que le récepteur nucléaire interagisse avec l'ADN. Ce mécanisme est dépendant de la fixation du ligand sur le récepteur nucléaire ¹⁹³. Par exemple, des agonistes de LXR sont capables de réprimer l'expression de gènes inflammatoires alors que les promoteurs de ces gènes ne contiennent pas d'élément de réponse de LXR. Dans ce cas, LXR utilise un mécanisme de transrépression de NF-κB lié sur le promoteur de gènes inflammatoires. Ce cross-talk avec NF-κB permet à LXR de coupler le métabolisme des stéroïdes avec la régulation de processus inflammatoires ¹⁹⁴. Le mécanisme moléculaire de la transrépression médiée par LXR est désormais connu. Après la fixation d'un ligand, LXR est SUMOylé par une SUMO E3 ligase qui ajoute un motif SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur une lysine de LXR. LXR SUMOylé interagit ensuite avec le complexe transcriptionnel formé par NF-κB sur ses gènes cibles et empêche l'élimination des

corépresseurs transcriptionnels associés à ce complexe, ce qui maintient les gènes cibles de NF-kB réprimés (Figure 25) ^{195, 196}. GPS2 a été identifié comme un intermédiaire essentiel entre LXR SUMOylé et le complexe de corépresseurs pour permettre la transrépression des gènes inflammatoires par LXR ¹⁹⁷. D'autre part, LXR établit aussi une transrépression de STAT1 sur ses gènes cibles inflammatoires qui est aussi dépendante de la SUMOylation de LXR ¹⁹⁶. Des ligands synthétiques de LXR sont capables de cibler spécifiquement son activité de transrépression de l'inflammation ce qui montre que ce cross-talk peut être une cible pharmacologique intéressante ¹⁹⁸.

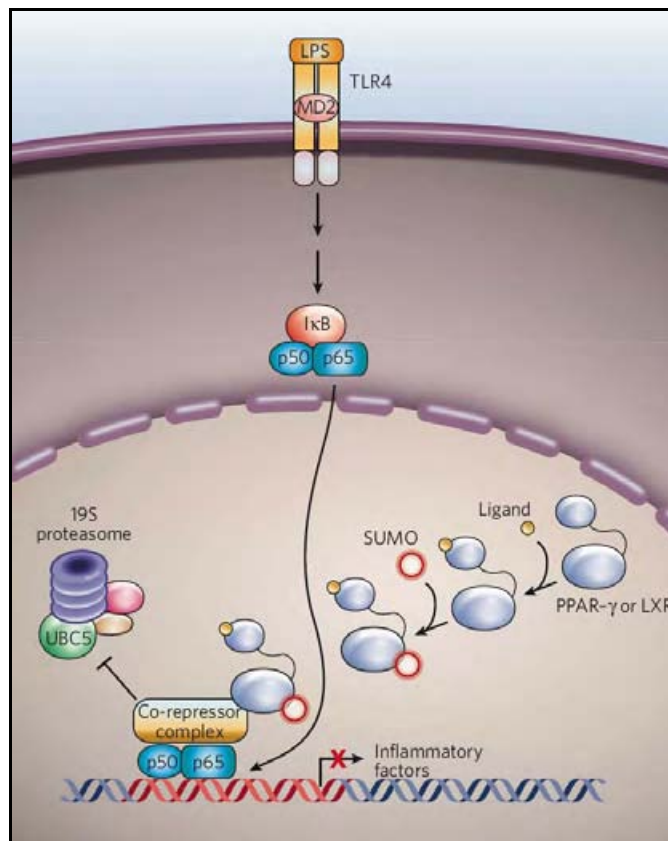


Figure 25 : Transrépression des PPARs et des LXRs sur l'activité transcriptionnelle de NF-kB ¹⁹⁹. Suite à leur SUMOylation, PPAR et LXR interagissent avec le complexe de corépresseurs lié à NF-kB sur le promoteur de ses gènes cibles inflammatoires et empêchent leur dégradation. Cela permet de maintenir NF-kB inactif même en présence de signaux pro-inflammatoires générés par la liaison du LPS à TLR4. LPS : LipoPolySaccharide ; TLR4 : Toll-Like Receptor 4 ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; LXR : Liver X Receptor ; SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier.

LXR est aussi impliqué dans des cross-talks avec des facteurs de transcription intervenant dans l'inflammation mais qui ne s'effectuent pas par un mécanisme de transrépression. LXR est capable d'inhiber dans les macrophages l'expression de l'ostéopontine qui est un facteur pro-inflammatoire. LXR empêche la stimulation de l'expression de l'ostéopontine par AP-1 sous l'action de cytokines en inhibant la fixation d'AP-1 sur le promoteur du gène codant

l'ostéopontine, et en réprimant l'expression de c-Fos et c-Jun qui sont les deux partenaires formant AP-1²⁰⁰. Inversement, LXR est réprimé par un cross-talk avec la signalisation TLR (Toll-Like Receptor) de l'immunité innée. Les TLRs sont des récepteurs scavengers activés après avoir fixé des motifs moléculaires viraux ou bactériens comme le LPS (LipoPolySaccharide), ce qui provoque l'initiation d'une réponse inflammatoire contre les pathogènes. Les TLRs activent le facteur de transcription IRF3 (Interferon-related Factor 3) qui inhibe l'activité de LXR par compétition pour le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. Par conséquent, l'activation des TLRs provoque une perturbation du métabolisme des stérols à cause de son cross-talk inhibiteur avec LXR²⁰¹. LXR est aussi inhibé par l'interferon- γ qui active la voie JAK/STAT1. STAT1 réprime ensuite l'expression de LXR α ce qui provoque une diminution de l'expression d'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol²⁰².

1.4.6.2) Cross-talks de LXR avec des récepteurs nucléaires

De nombreux cross-talks entre les récepteurs nucléaires ont été rapportés. Une étude récente a montré que plusieurs récepteurs nucléaires stéroïdiens inhibent l'activité transcriptionnelle de LXR. Les auteurs se sont focalisés sur le récepteur des androgènes (AR) et ont montré que l'antagonisme de AR sur LXR est causé par une compétition pour le recrutement de coactivateurs transcriptionnels entre les deux récepteurs²⁰³. Le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR), comme LXR, s'hétérodimérise avec RXR et reconnaît un élément de réponse de type DR4 dans le promoteur de ses gènes cibles. Plusieurs cross-talks existent entre TR et LXR. Premièrement, les deux récepteurs sont en compétition pour la liaison sur les mêmes éléments de réponse DR4 mais uniquement pour certains de leurs gènes cibles²⁰⁴⁻²⁰⁶. Cela montre que même si TR et LXR reconnaissent tous les deux des éléments de réponse DR4, ils n'ont pas la même spécificité pour des séquences dégénérées de leurs éléments de réponse, ce qui entraîne une compétition de liaison pour certains gènes uniquement comme le gène codant ABCA1 et le gène de l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC)²⁰⁶. Deuxièmement l'expression de LXR α , mais pas de LXR β , est régulée positivement par TR via un élément de réponse originalement identifié dans l'autorégulation de l'expression de LXR α ^{207, 208}. Troisièmement, LXR régule le métabolisme des hormones thyroïdiennes ce qui lui permet d'interagir avec la signalisation thyroïdienne avant l'activation du TR : c'est une régulation pré-récepteur de TR.

LXR établit d'autres cross-talks de ce type avec d'autres récepteurs nucléaires. LXR effectue une régulation pré-récepteur de la voie de signalisation des oestrogènes en augmentant

l'expression d'une enzyme qui sulfate et inactive les oestrogènes, la sulfotransferase SULT1E1²⁰⁹, ou de la voie de signalisation des glucocorticoïdes en inhibant l'expression de l'enzyme 11 β -HydroxySteroid Deshydrogenase B Type 1 (HSD11B1) qui active le ligand du GR, le cortisol^{210, 211}. Aussi, GR régule l'expression de LXR α en se fixant directement sur le promoteur de LXR α via plusieurs éléments de réponse de GR²¹². Le Pregnane X Receptor (PXR) régule LXR au niveau pré-récepteur en contrôlant l'expression du cytochrome P450 CYP27A1 qui est responsable de la production de 27-hydroxycholesterol²¹³ et de façon indirecte l'expression de CYP3A4²¹⁴ qui produit le 4 β -Hydroxycholesterol et le 25-hydroxycholesterol²¹⁵, des ligands établis de LXR^{216, 217}.

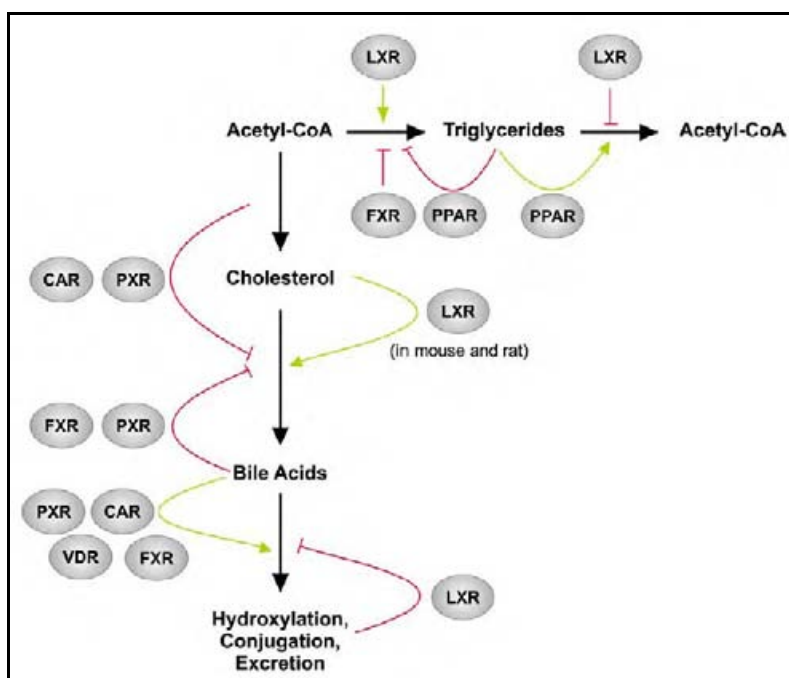


Figure 26 : Cross-talks des LXRs avec d'autres récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme des stérols et le métabolisme lipidique²¹⁸. Ce schéma montre une régulation du métabolisme lipidique et du métabolisme des stérols par LXR qui est opposée à la régulation de ces métabolismes par d'autres récepteurs nucléaires. LXR : Liver X Receptor ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; FXR : Farnesoid X receptor ; CAR : Constitutive Androstane Receptor ; PXR : Pregnane X Receptor ; VDR : Vitamin D Receptor.

LXR effectue un cross-talk important avec les récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Ce cross-talk est mutuellement inhibiteur : PPAR réprime la lipogenèse induite par LXR, et LXR réprime le catabolisme lipidique activé par les PPARs (Figure 26). Le mécanisme mis en évidence dans ce cross-talk est une compétition des deux récepteurs pour les RXRs puisque les LXRs et les PPARs s'hétérodimérisent avec les RXRs pour se lier à leur élément de réponse respectif²¹⁹⁻²²¹. Il a aussi été montré que LXR régule spécifiquement l'expression de PPAR α dans l'intestin²²² et, de façon plus surprenante, que PPAR α se lie à environ 71 à 88% des sites de liaison de LXR identifiés dans le génome. La

liaison de LXR et de PPAR α à ces sites est mutuellement exclusive. Cette étude dévoile un nouveau cross-talk particulièrement étroit entre ces deux types de récepteurs ²²³. Aussi, LXR et PPAR sont capables de s'hétérodimériser, mais la pertinence physiologique de cette interaction n'a jamais été montrée ²²⁴.

LXR effectue aussi des cross-talks mutuellement inhibiteurs avec ROR α et CAR. LXR inhibe les gènes cibles de ROR α et de CAR alors que ROR α ou CAR inhibent la lipogenèse induite par LXR ²²⁵⁻²²⁸. Le récepteur de la Vitamine D (VDR) effectue une transrépression de LXR lorsqu'il est lié à son ligand, la Vitamine D3 ²²⁹. Un cross-talk existe entre Rev-Erba et LXR : LXR stimule l'expression de Rev-Erba et Rev-Erba inhibe la stimulation de l'expression de TLR4 par LXR, ce qui génère un effet de rétrocontrôle négatif sur la régulation de TLR4 par LXR ²³⁰.

1.4.6.3) Autres cross-talks de LXR

Des agonistes synthétiques de LXR sont capables d'inhiber la voie de signalisation sonic hedgehog (shh) dans des cellules stromales de la moelle osseuse. L'inhibition de la voie shh par LXR empêche la différenciation des cellules stromales en ostéoblastes ²³¹. Au contraire, un agoniste naturel de LXR, le 20(S)-hydroxycholestérol, est capable d'activer l'expression de gènes cibles de Notch en activant la voie Shh. Les LXRs sont impliqués dans l'activation des gènes cibles de Notch par le 20(S)-hydroxycholesterol mais dans cette étude les auteurs n'ont pas étudié le lien possible des LXRs avec la voie shh ²³². LXR α augmente l'expression et l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription hypoxique HIF-1 α . LXR α stabilise HIF-1 α par une interaction directe et les deux facteurs de transcription co-stimulent la lipogenèse dans les macrophages. Aussi, des conditions hypoxiques augmentent l'expression de LXR α et de ses gènes cibles lipogéniques ²³³. Les LXRs sont capables d'inhiber par une interaction directe l'activité transcriptionnelle de la beta-Catenin dans un modèle de cancer du côlon, ce qui permet le recrutement des LXRs sur des gènes cibles de la beta-Catenine tel que Myc. Des agonistes synthétiques de LXR sont ainsi capables d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses du côlon en contrôlant l'activité de la beta-Catenine ²³⁴. Aussi, des ligands naturels de LXR sont capables d'inhiber l'expression de gènes myéliniques dans des cellules nerveuses en réprimant l'expression de composants de la voie Wnt et en diminuant le recrutement de la beta-Catenine sur le promoteur des gènes myéliniques, ce qui confirme le contrôle de la voie Wnt/beta-Catenine par les LXRs ²³⁵. L'activation de p53 par un stress génotoxique provoque l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des LXRs par une répression de RXR dépendante de p53 ²³⁶. Ces cross-talks des récepteurs LXRs avec des voies de

signalisation fortement impliquées dans l'oncogenèse suggèrent que les LXR α peuvent participer à des mécanismes oncogéniques majeurs.

1.4.7) Régulations par des modifications post-traductionnelles

L'activité des récepteurs nucléaires est essentiellement régulée par le type de ligand fixé, mais ils peuvent aussi être soumis à des modifications post-traductionnelles qui adaptent leur activité en fonction du contexte général de signalisation cellulaire (Figure 27). Les modifications post-traductionnelles les plus fréquentes sont les phosphorylations qui ciblent essentiellement la région AF-1. En effet, AF-1 étant mal repliée, les phosphorylations participent à l'acquisition de structures secondaires stables dans cette région, ce qui permet au récepteur nucléaire d'interagir avec des cofacteurs transcriptionnels en fonction de la kinase qui catalyse la phosphorylation^{138, 140}. Les phosphorylations d'AF-1 peuvent activer certains récepteurs nucléaires en absence de ligand comme cela a été montré avec le récepteur des oestrogènes (ER) et le récepteur des androgènes (AR)¹⁴⁰. Les sites de phosphorylation sont différents selon la kinase et donc selon la voie de signalisation qui affecte le récepteur nucléaire. Les interactions d'un récepteur nucléaire avec des cofacteurs transcriptionnels dépendent donc des voies de signalisation actives dans la cellule. Le LBD peut aussi être phosphorylé ce qui peut modifier ses interactions avec les corégulateurs transcriptionnels qu'il recrute en présence de ligand^{237, 140}. La phosphorylation du DBD peut conduire à l'inactivation d'un récepteur nucléaire en l'empêchant d'interagir avec son élément de réponse si des résidus responsables de son interaction avec l'ADN sont phosphorylés¹⁴⁰.

LXR α est la cible de plusieurs kinases qui régulent son activité transcriptionnelle, telle que la Protéine Kinase A (PKA), la Protéine Kinase C alpha (PKC α), la Caséine Kinase 2 (CK2), c-Jun N-terminal Kinase (JNK), l'Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) et la p70 ribosomal S6-Kinase 1 (S6K1)²³⁷⁻²⁴⁴. PKA phosphoryle LXR α sur les sérines 195, 196, 290 et 291 c'est-à-dire sur son domaine d'hétérodimérisation et sur son LBD, ce qui empêche LXR α de se lier à l'ADN à cause de son incapacité à s'hétérodimériser avec RXR. Ces phosphorylations favorisent aussi l'interaction de LXR α avec des corépresseurs²³⁹. PKA est ainsi capable d'inhiber l'activation de la lipogenèse par LXR α en l'empêchant d'activer l'expression de SREBP-1c, ce qui constitue un rationnel pharmacologique pour inhiber la lipogenèse dépendante de LXR α grâce à des activateurs de la PKA^{239, 240}. D'autre part, la PKA phosphoryle LXR α sur AF-2 en réponse à une activation par l'AMPc, ce qui entraîne une régulation de l'expression de la rénine et c-Myc par LXR α

sous forme de monomère sur un élément de réponse de type CNRE (cAMP response element and negative response element)²⁴⁵. PKC α phosphoryle LXR α ce qui affecte son activité transcriptionnelle^{237, 241}. La phosphorylation de la sérine 198 de LXR α par CK2 conduit à la répression sélective de gènes cibles de LXR α tel que CCL24 et LPL mais pas ABCA1 et SREBP-1c^{238, 242}. LXR α est aussi phosphorylé par JNK1 ce qui stimule l'activation de SREBP-1c et d'ABCA1 par LXR α dans des hépatocytes traités par l'agoniste synthétique de LXR α le T0901317²⁴³.

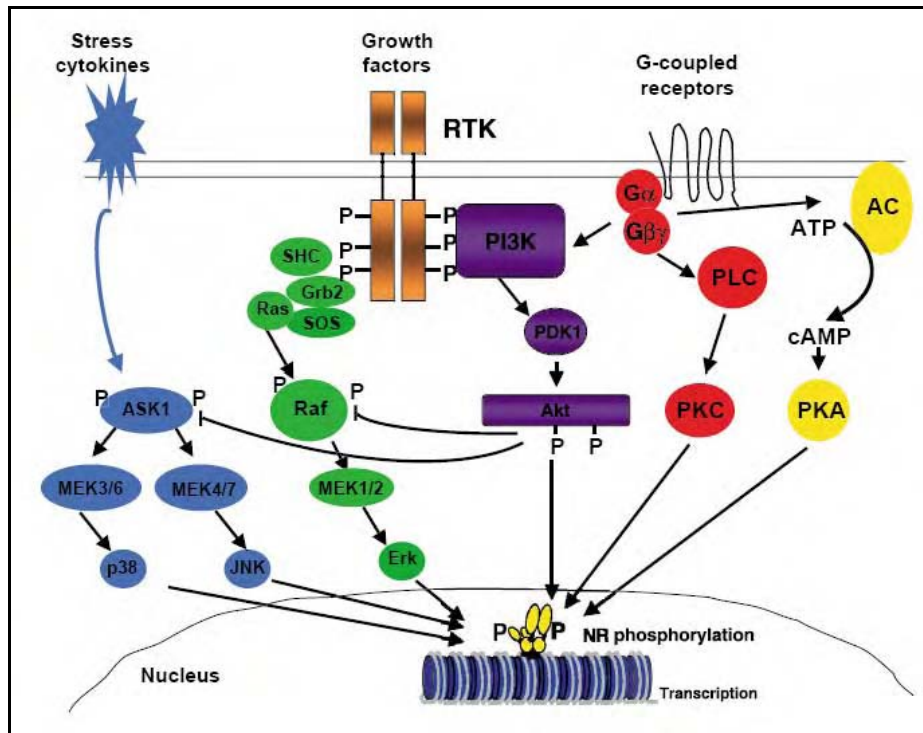


Figure 27 : Régulation des récepteurs nucléaires par phosphorylations¹⁴⁰. L'activité des récepteurs nucléaires peut être régulée par phosphorylation par les voies de stress (p38, JNK), par les voies mitogènes (Erk, Akt) et par les voies activées par les récepteurs couplés aux protéines G (PKC, PKA). RTK : Receptor Tyrosine Kinase ; JNK : c-Jun N terminal Kinase ; ERK : Extracellular signal Regulated Kinase ; PKA : Protein Kinase A ; PKC : Protein Kinase C ; NR : Nuclear Receptor.

Les kinases AMPK et S6K1 phosphorylent LXR α respectivement sur une thréonine et sur une sérine. Ces phosphorylations ont un effet opposé sur l'activité transcriptionnelle de LXR α . La phosphorylation catalysée par AMPK diminue l'activité transcriptionnelle de LXR α alors que la phosphorylation par S6K1 augmente son activité transcriptionnelle dans des hépatocytes²⁴⁴. Une seule phosphorylation a été mise en évidence pour LXR β , catalysée par la kinase ALK-1 qui est un récepteur de TGF β . Cette phosphorylation est spécifique à LXR β car ALK-1 ne phosphoryle pas LXR α ²⁴⁶. Cette phosphorylation induit la relocalisation cytoplasmique de LXR β , et LXR β inhibe la voie de signalisation du TGF β mais le mécanisme de cette inhibition n'a pas été caractérisé²⁴⁶. Il a été montré récemment que JNK et la

Phosphatidylinositol-3 Phosphate Kinase (PI3K) stimulent l'activité transcriptionnelle de LXR sous l'effet de ligands synthétiques et naturels, mais aucun mécanisme n'a été mis en évidence ²⁴⁷.

Les récepteurs nucléaires peuvent être modifiés par acétylation ce qui peut réguler leur activité transcriptionnelle, leur localisation cellulaire, leur liaison à l'ADN ou leur stabilité ²⁴⁸. Les LXRs sont régulés par acétylation au niveau d'une lysine conservée entre les deux isotypes : la lysine 432 pour LXR α et la lysine 433 pour LXR β , localisée juste avant l'hélice 12 du LBD. La déacétylation de cette lysine par la déacétylase NAD⁺-dépendante SIRT1 permet l'ubiquitination des LXRs, ce qui a pour conséquence d'adresser les LXRs au protéasome après leur activation par leur ligand. Par conséquent, la déacétylation des LXRs augmente leur activité transcriptionnelle ¹⁸¹.

Une polyubiquitination est connue pour LXR α . L'E3-Ubiquitine Ligase BRCA1-BARD1 interagit avec LXR α et l'adresse au protéasome en le polyubiquitinant. Les ligands de LXR déstabilise l'interaction de BRCA1-BARD1 avec LXR α , ce qui a pour conséquence d'augmenter la stabilité de LXR α pour qu'il puisse réguler l'expression de ses gènes cibles ¹⁸².

La modification par SUMOylation est impliquée dans l'activité de transrépression de nombreux récepteurs nucléaires comme LXR, FXR, PPAR et PXR ²⁴⁹. LXR α et LXR β sont respectivement SUMOylés par les SUMO E3-Ligases HDAC4 et PIAS1, avec une SUMOylation identifiée pour LXR β sur la lysine 30, ce qui a pour conséquence de participer à la transrépression de STAT1 par les LXRs ¹⁹⁶. Les SUMOylations des LXRs par HDAC4 sur les lysines 328 et 434 du LXR α , et sur les lysines 410 et 448 du LXR β sont impliquées dans l'activité de transrépression des LXRs sur NF-kB sur le promoteur de gènes inflammatoires ^{195, 250}.

Récemment, une étude a montré que les LXRs sont modifiés par O-Gluco-N-Acylation. Cette modification post-traductionnelle est proportionnelle au taux de glucose dans la cellule, et elle agit ainsi comme un senseur du taux de glucose ²³⁷. L'ajout du motif N-acétylglucosamine sur la région AF-1 ou sur le DBD des LXRs est augmenté in vivo avec une forte concentration de glucose, et cela est corrélé avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle des LXRs sur le promoteur de SREBP-1c, ce qui implique les LXRs dans la régulation du métabolisme du glucose par cette modification post-traductionnelle ²⁵¹.

1.5) Pharmacologie des LXRs

La structure d'un ligand d'un récepteur nucléaire détermine le comportement transcriptionnel du récepteur nucléaire sur lequel il se fixe. Le principe biochimique de la modulation de l'activité d'un récepteur nucléaire par son ligand repose sur la génération d'une surface d'interaction spécifique sur le LBD qui conditionne le type de corégulateurs recrutés. Selon le profil de recrutement des corégulateurs sur le récepteur nucléaire, un ligand est un agoniste, un antagoniste, un agoniste inverse ou un modulateur sélectif ^{127, 128, 174, 175}.

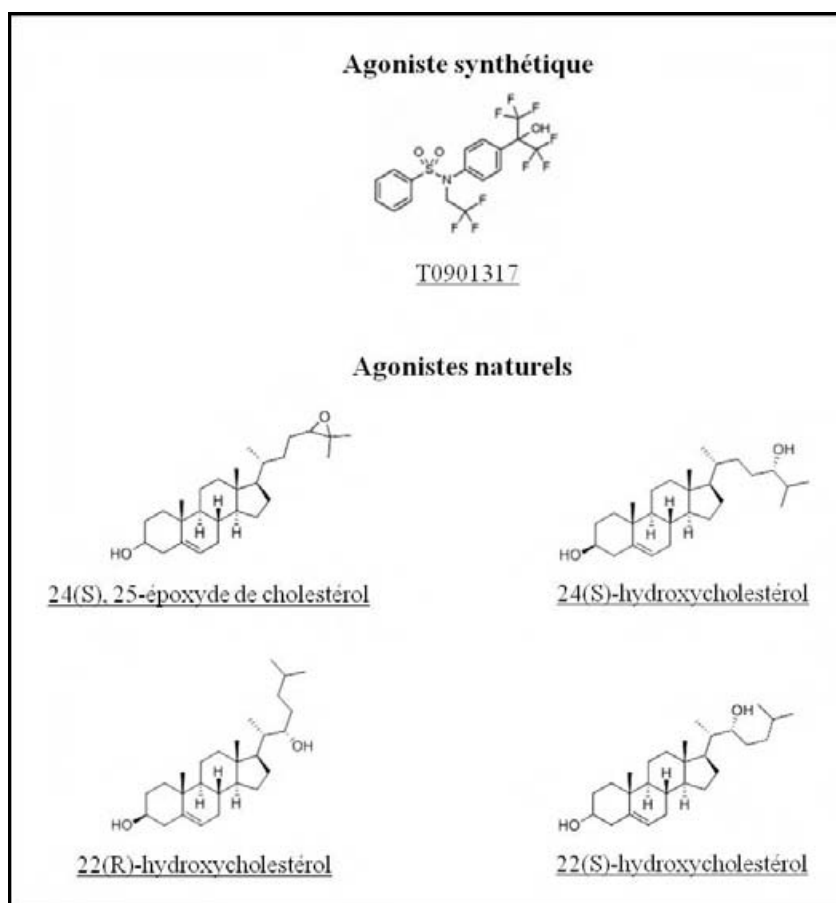


Figure 28 : Agonistes synthétique et naturels des LXR. Le T0901317 est un ligand synthétique des LXR, les ligands naturels des LXR sont des oxystérols.

1.5.1) Les agonistes

D'un point de vue structural, les agonistes sont des ligands qui bloquent le récepteur dans une conformation active. Les principaux changements conformationnels d'un récepteur nucléaire sous l'action du ligand s'effectuent au niveau de l'hélice 12. Un agoniste provoque le repliement de l'hélice 12 sur le récepteur nucléaire de telle sorte que la surface d'interaction est optimale pour le recrutement des coactivateurs et elle est défavorable à la liaison de corépresseurs ^{127, 174}.

Les agonistes naturels des LXR α et LXR β sont des oxystérols (Figure 28) ²¹⁶. Les LXR α et LXR β ont une spécificité fine vis-à-vis des oxystérols qu'ils lient. La position et la fonction chimique de l'oxydation des oxystérols est importante pour leur liaison aux LXR α et LXR β . Par exemple, de nombreux oxystérols possédant une oxydation de la chaîne latérale aliphatique sont des ligands des LXR α et LXR β . En revanche, les oxystérols en position 17 ne sont pas des ligands des LXR α et LXR β . Aussi, la stéréoisomérisation de l'oxystérol est un facteur sélectif pour la liaison aux LXR α et LXR β puisque le 24(S)-hydroxycholestérol se lie aux LXR α et LXR β avec une affinité de 100 nM alors que son stéréoisomère, le 24(R)-hydroxycholestérol, ne se lie pas aux LXR α et LXR β . Certains intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol, notamment les stérols possédant une insaturation en position 24 tels que le desmostérol et le zymostérol, sont des agonistes des LXR α et LXR β . Cela montre que la cholestérogénèse est capable d'activer les LXR α et LXR β ²⁵².

En 2000, un criblage haut débit de 300000 molécules a été réalisé pour identifier un agoniste synthétique des récepteurs LXR, en mesurant la liaison d'un peptide coactivateur fluorescent sur le récepteur. Cette étude a permis l'identification du principal agoniste synthétique utilisé pour activer les LXR α et LXR β : le T0901317 (Figure 28), qui a une affinité pour les LXR α et LXR β de l'ordre du nanomolaire. Le T0901317 active la lipogénèse et l'efflux de cholestérol en se liant au LXR α et au LXR β ²⁵³.

Des études cristallographiques ont identifié les caractéristiques structurales de l'agonisme des LXR α et LXR β . Les LBDs de LXR α et de LXR β liés à un agoniste naturel, le 24(S),25-epoxycholestérol, ou liés à un agoniste synthétique, le T0901317, ont été cristallisés ¹⁵³⁻¹⁵⁵. Dans les différentes structures cristallographiques obtenues, les acides aminés qui interagissent avec les agonistes sont conservés entre LXR α et LXR β , ce qui explique leur affinité et leur spécificité similaire de liaison à leurs ligands. Deux acides aminés sont particulièrement importants pour l'agonisme des LXR α et LXR β : l'histidine 421 (histidine 435 pour LXR β) et le tryptophane 443 (tryptophane 457 pour LXR β). Un groupement polaire du ligand interagit avec la partie imidazole de l'histidine 421/435 de l'hélice 11, l'histidine 421/435 peut ainsi effectuer une interaction électrostatique avec le tryptophane 443/457 de l'hélice 12, ce qui stabilise l'hélice 12 (AF-2) dans une conformation agoniste. Une mutation de l'un de ces deux acides aminés abolit l'activation des LXR α et LXR β par leur ligand, ce qui montre que l'interaction dépendante de la fixation du ligand entre l'histidine 421/435 et le tryptophane 443/457 est cruciale pour l'activation des récepteurs. Cependant, une mutation du tryptophane 443/457 en phénylalanine n'affecte pas l'activation des LXR α et LXR β par le T0901317 contrairement aux oxystérols, ce qui montre une différence d'implication de cet acide aminé pour

l'activation des LXR α selon si l'on est en présence d'un oxystérol ou de l'agoniste synthétique T0901317.

Dans le cas de la liaison des deux énantiomères du 22-hydroxycholestérol à LXR α , il a été montré que la fonction hydroxyle de la chaîne aliphatique du 22(R)-hydroxycholestérol interagit avec l'histidine 421 de LXR α , alors que pour le 22(S)-hydroxycholestérol, cette fonction hydroxyle interagit avec la glutamine 424. Cela explique que le 22(R)-hydroxycholestérol active les LXR α alors que le 22(S)-hydroxycholestérol agit comme un antagoniste. Cela confirme aussi l'importance d'une interaction entre un groupement polaire d'un ligand des LXR α et l'histidine 421/435 pour l'activation de ces récepteurs ainsi que la sélection des ligands selon leur stéréochimie²⁵⁴. La mutation du glutamate 267 de LXR α (281 pour LXR β) impliqué dans la liaison générale des oxystérols provoque une forte diminution de l'activation des LXR α par les oxystérols, ce qui montre que ce résidu est important pour la liaison des oxystérols aux LXR α et leur activation¹⁵⁴.

1.5.2) Les antagonistes

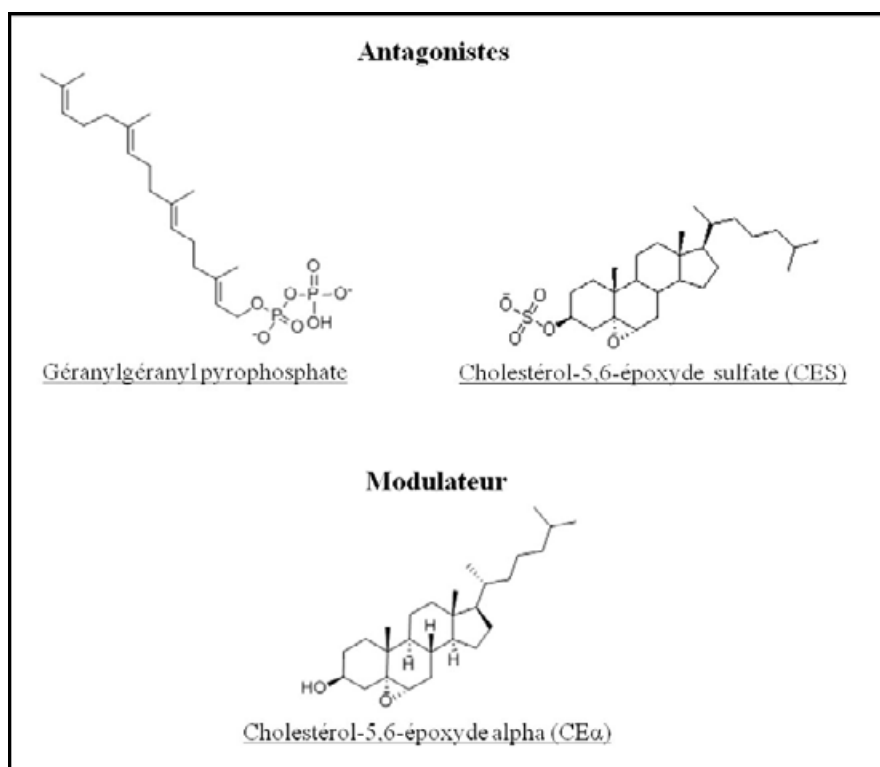


Figure 29 : Antagonistes et modulateur naturels des LXR α .

Un antagoniste est un ligand qui empêche le récepteur nucléaire d'adopter une conformation agoniste ou agoniste inverse en bloquant le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs

par le LBD. Structuralement, un antagoniste empêche l'hélice 12 d'adopter une position agoniste ou agoniste inverse. En occupant la LBP, un antagoniste inhibe compétitivement la modulation transcriptionnelle d'un récepteur nucléaire par un ligand. De nombreux antagonistes possèdent des groupements volumineux qui provoquent une gêne stérique au niveau de l'hélice 12, ce qui l'empêche de se replier sur le LBD pour adopter une position agoniste ¹²⁷. C'est le cas d'un sulfonamide tertiaire, le GSK2033, qui est un antagoniste synthétique des LXR_s. A cause de ses groupements volumineux, sa liaison aux LXR_s empêche la formation d'une surface d'interaction avec des coactivateurs ce qui lui permet d'inhiber la réponse transcriptionnelle induite par un agoniste des LXR_s ²⁵⁵.

Des antagonistes naturels des LXR_s existent tels que certains oxystérols, des dérivés sulfatés d'oxystérols, le géranylgeranyl pyrophosphate (Figure 29) et des acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique. Une activité antagoniste du 27-hydroxycholestérol a été observée dans des cellules musculaires lisses vasculaires lorsqu'elles sont traitées avec des agonistes des LXR_s ²⁵⁶. Cette activité antagoniste est propre à ce type cellulaire puisque dans d'autres modèles cellulaires une activité agoniste du 27-hydroxycholestérol a été décrite ^{216, 257, 258}. Un autre oxystérol, le 22(S)-hydroxycholestérol, possède une activité antagoniste à cause de la position de son hydroxyle sur le carbone 22, la forme stéréochimique inverse (R), étant agoniste ²⁵⁴. Plusieurs dérivés naturels sulfatés d'oxystérols tels que le cholestérol-5,6 alpha-époxyde-3-sulfate (CES), le 7-kétocholestérol-3-sulfate (7-KCS), le 24-hydroxycholestérol-3-sulfate (24-HC-3-S), le 24-hydroxycholestérol-24-sulfate (24-HC-24-S) et le 25-hydroxycholestérol-3-sulfate (25-HC-3-S) ²⁵⁹ sont des antagonistes naturels des LXR_s ^{258, 260, 261}. Leur production se fait par la sulfatation d'un hydroxyle d'un oxystérol par une Stéroïde Sulfotransférase comme SULT2B1b ²⁶². Les concentrations actives de ces antagonistes naturels sont en accord avec leurs concentrations physiologiques ce qui suggère qu'ils ont un rôle physiologique dans la régulation des LXR_s ^{260, 261, 263, 264}. Le géranylgeranyl pyrophosphate, qui est un métabolite intermédiaire de la voie de biosynthèse du cholestérol, est un antagoniste des LXR_s et a été utilisé dans plusieurs études pour inhiber les effets d'agonistes des LXR_s ²⁶⁵⁻²⁶⁷. Les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque sont capables d'inhiber l'activation des LXR_s, ce qui met en évidence une régulation des LXR_s par des métabolites lipidiques ²⁶⁸⁻²⁷⁰. Cependant, aucune étude n'a montré une interaction directe des antagonistes cités avec les LXR_s. Leur action antagoniste sur les LXR_s peut donc être effectuée de manière indirecte, ce qui voudrait dire dans ce cas qu'ils ne seraient pas des antagonistes des LXR_s.

1.5.3) Les agonistes inverses

Un agoniste inverse stimule le recrutement de corépresseurs par le récepteur nucléaire. En effet, l'agoniste inverse positionne l'hélice 12 de manière optimale pour produire une surface d'interaction avec des corépresseurs ¹²⁷. Actuellement, aucun agoniste inverse n'a été décrit dans la littérature pour les récepteurs LXRs. Leur synthèse et leur étude pourraient permettre d'étudier la répression génique par les LXRs afin de mieux comprendre la biologie des LXRs.

1.5.4) Les modulateurs

Les modulateurs, qui sont aussi appelés agonistes partiels ou antagonistes partiels, sont des ligands qui possèdent une activité mixte d'agoniste et d'antagoniste selon le promoteur lié par le récepteur nucléaire et selon le type cellulaire (Figure 30). Les modulateurs induisent un positionnement intermédiaire de l'hélice 12 qui permet le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs par un récepteur nucléaire en fonction du profil d'expression des corégulateurs transcriptionnels dans un type cellulaire. Les positions que peut adopter l'hélice 12 étant multiples, pour un récepteur nucléaire, chaque modulateur sélectif d'un récepteur nucléaire peut induire un positionnement unique de l'hélice 12 et par conséquent une réponse pharmacologique particulière entre l'agonisme et l'antagonisme ¹²⁷.

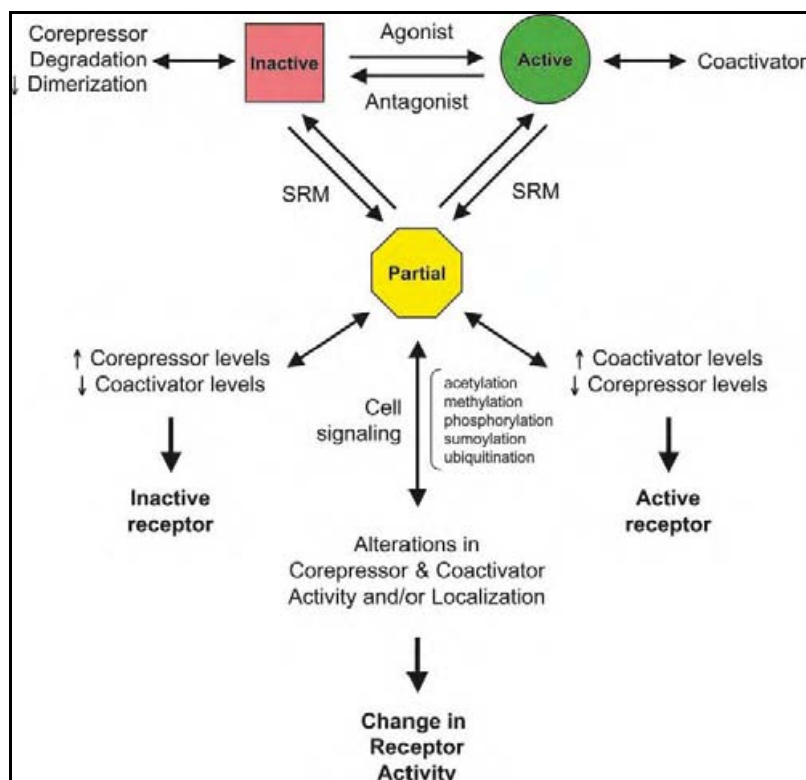


Figure 30: Mode d'action schématique d'un modulateur sélectif d'un récepteur nucléaire ²⁷¹. Un modulateur sélectif provoque une conformation intermédiaire du LBD entre la conformation agoniste et la

conformation antagoniste, appelée dans ce schéma conformation partielle (partial). Selon le contexte cellulaire, le modulateur sélectif a une activité agoniste si le niveau d'expression des coactivateurs est le plus élevé, ou il a une activité antagoniste si les corépresseurs sont les plus exprimés. La signalisation cellulaire dépendante du type cellulaire influence aussi l'activité du récepteur nucléaire par des modifications post-traductionnelles des corégulateurs transcriptionnels. SRM : Selective nuclear Receptor Modulator.

La diversité de réponse biologique que permettent les modulateurs rend cette classe pharmacologique très intéressante pour le développement d'agents thérapeutiques. Le tamoxifène, qui est le traitement hormonothérapeutique de référence pour les cancers du sein hormono-dépendants, est un modulateur sélectif d'ER α . Dans la glande mammaire, le tamoxifène agit comme un antagoniste en réprimant les gènes de la survie et de la prolifération sous le contrôle d'ER α , ce qui constitue les effets recherchés en thérapie anticancéreuse. Au contraire, dans l'utérus, le tamoxifène se comporte comme un agoniste en stimulant l'expression des gènes sous le contrôle d'ER α , ce qui participe aux effets secondaires indésirables de cette molécule. Cela s'explique par une expression plus forte de coactivateurs de la famille SRC (Steroid Receptor Coactivators) dans l'utérus que dans la glande mammaire qui provoque une action agoniste du tamoxifène dans l'utérus. Cela démontre le principe de l'activité tissu-spécifique des modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires et de sa dépendance pour l'expression relative des corégulateurs transcriptionnels ^{271, 272}.

Les agonistes purs des LXRs, comme le T0901317, ont des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme du cholestérol, mais ils ont des effets secondaires qui empêchent une utilisation thérapeutique de ces composés, tels que l'induction d'une hypertriglycémie. La synthèse de modulateurs sélectifs des LXRs qui présenteraient les effets bénéfiques des agonistes des LXRs sans leurs effets secondaires indésirables est une issue activement recherchée pour la génération de nouveaux composés thérapeutiques contre l'athérosclérose ²⁷³. Plusieurs agonistes synthétiques des LXRs ont été synthétisés et certains d'entre eux parviennent à moduler les LXRs de la façon souhaitée pour une utilisation thérapeutique c'est-à-dire en stimulant le transport inverse du cholestérol sans stimuler la lipogenèse ²⁷³⁻²⁷⁶. L'agoniste synthétique GW3965 ainsi que le 22(R)-hydroxycholestérol sont des agonistes partiels des LXRs. En effet, un changement du niveau d'expression des coactivateurs et des corépresseurs parvient à modifier leur activité pharmacologique, ce qui n'est pas le cas pour l'agoniste pur T0901317, et qui définit donc ces ligands comme agonistes partiels. La liaison de ces agonistes partiels sur les LXRs provoque une affinité plus ou moins grande des LXRs pour des coactivateurs et pour des corépresseurs, alors que le T0901317 stimule uniquement

la liaison de coactivateurs sur les LXR_s, et à forte concentration il induit une dissociation complète des corépresseurs²⁷⁷. Une surexpression du corépresseur NCoR provoque une forte diminution de l'activation transcriptionnelle des LXR_s par le GW3965. A l'inverse, une extinction de l'expression de NCoR potentialise l'activité agoniste du GW3965 sur des gènes cibles des LXR_s. L'activation des LXR_s par le T0901317, qui dissocie efficacement la liaison des corépresseurs aux LXR, est nettement moins influencée par une surexpression de NCoR. Cela montre l'importance du profil d'expression des corégulateurs transcriptionnels dans les réponses biologiques induites par les modulateurs des LXR_s, mais pas par des agonistes purs²⁷⁸.

Des ligands naturels des LXR_s ont aussi une activité modulatrice. C'est le cas du 15-ketocholestérol²⁷⁹ et du cholestérol-5,6-époxyde alpha (CE α)¹²⁶. L'activité pharmacologique du CE α varie selon le contexte cellulaire : le CE α est antagoniste dans des lignées cellulaires cancéreuses de foie et de poumon, il est modulateur dans des kératinocytes et agoniste partiel dans des macrophages. Il a une meilleure efficacité pour moduler LXR α que LXR β , et son EC50 est de l'ordre du nanomolaire en accord avec sa concentration dans l'alimentation et dans l'organisme, ce qui permet de considérer le CE α comme un modulateur physiologique des LXR_s. La définition du profil pharmacologique du CE α est discutée plus en détail dans la partie 1.6.4).

1.5.5) Ciblage multiple de ligands des LXR_s

Certains ligands de récepteurs nucléaires sont capables de se lier à d'autres récepteurs nucléaires et de moduler leur activité. Ce facteur est important à considérer puisqu'il suggère que le profil d'expression génique induit par un ligand peut être le reflet de la modulation de plusieurs récepteurs nucléaires. LXR est capable d'être régulé par des ligands d'autres récepteurs nucléaires, et des ligands de LXR_s modulent l'activité d'autres récepteurs nucléaires. Les esters de fibrate comme le fenofibrate, qui sont des agonistes des PPAR_s, ont une activité antagoniste sur les LXR_s. En revanche, les acides de fibrate ont une activité agoniste sur les PPAR_s mais aucune activité sur les LXR_s²⁸⁰. Aussi, les acides gras polyinsaturés, qui seraient des antagonistes des LXR_s, sont des agonistes des PPAR_s^{269, 281} ce qui consolide le cross-talk mutuellement inhibiteur entre les LXR_s et les PPAR_s. Le 24(S)-hydroxycholestérol et le cholestérol-24(S),25-époxyde, qui sont des agonistes naturels des LXR_s, sont des agonistes inverses des récepteurs ROR_s en réprimant la transcription basale des gènes cibles des ROR_s²⁸². Aussi, ROR γ est capable de lier et d'être activé par des

hydroxycholestérols qui sont des agonistes des LXRs, comme le 22(R)-hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol ²⁸³. Ces ciblage multiples par des ligands naturels de récepteurs nucléaires montrent une intégration du signal porté par un ligand par plusieurs récepteurs nucléaires. Cela permettrait peut-être une régulation plus coordonnée d'une réponse biologique à l'accumulation de certains métabolites cellulaires, plutôt que la modulation d'un seul récepteur nucléaire. Par exemple, la régulation négative des LXRs par les acides gras polyinsaturés et l'activation des PPARs par ces métabolites permet d'inhiber la lipogenèse dans un premier temps, et l'activation du catabolisme lipidique dans un second temps. Cela empêcherait une activité simultanée de ces deux métabolismes, qui ont des rôles opposés dans la cellule, grâce à l'intégration du signal porté par les acides gras polyinsaturés par les deux récepteurs nucléaires chargés de contrôler ces métabolismes .

L'agoniste synthétique des LXRs le plus utilisé dans la littérature, le T0901317, est capable de lier de nombreux récepteurs nucléaires. Le T0901317 se fixe et active le récepteur des acides biliaires FXR avec une EC50 de l'ordre du micromolaire ²⁸⁴. Il a une action antagoniste sur les récepteur PXR et AR pour des concentrations nanomolaire et micromolaire respectivement ^{285, 286}. Le T0901317 agit comme un agoniste inverse sur les récepteur RORs pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire ²⁸⁷. Cela veut dire que des connaissances acquises sur les LXRs en utilisant le T0901317 peuvent être biaisées si aucun autre ligand des LXRs n'a été testé, ou si d'autres méthodes de confirmation spécifiques des LXRs, comme l'utilisation de siRNA LXR α et LXR β , n'ont pas été effectuées en parallèle.

1.6) Les corégulateurs transcriptionnels

Les corégulateurs transcriptionnels sont des protéines qui permettent aux récepteurs nucléaires de transmettre l'information qu'ils portent aux promoteurs de leurs gènes cibles ainsi qu'à la machinerie de transcription. Le recrutement des corégulateurs transcriptionnels sur le promoteur du gène cible d'un récepteur nucléaire se fait de manière séquentielle ¹²⁹. Après avoir reconnu son élément de réponse sur un promoteur, le récepteur nucléaire recrute le corégulateur transcriptionnel qui est le mieux adapté après l'intégration de toutes les informations qui lui sont soumises telles que la conformation de sa région AF-1, la séquence de l'élément de réponse reconnu, la structure du ligand lié, éventuellement les informations transmises par son partenaire de dimérisation, les modifications post-traductionnelles qu'il a subies, et le niveau d'expression des corégulateurs dans la cellule où il se trouve. Le corégulateur recruté interagit avec d'autres corégulateurs transcriptionnels, l'ensemble

formant un complexe moléculaire possédant plusieurs activités enzymatiques (Figure 31) dont la nature varie en fonction du corégulateur directement recruté par le récepteur nucléaire. Les activités enzymatiques du complexe remodelent la chromatine du promoteur ce qui modifie son accessibilité par les facteurs généraux de transcription constituant la machinerie de transcription responsable de l'expression des gènes. S'il s'agit de coactivateurs, le complexe de corégulateurs transcriptionnels intervient aussi dans le recrutement direct de la machinerie de transcription en servant d'intermédiaire physique entre un récepteur nucléaire et des facteurs généraux de transcription telle que la TATA-Binding Protein (TBP). Par conséquent, les corégulateurs transcriptionnels sont les effecteurs des récepteurs nucléaires au niveau de l'expression de leurs gènes cibles ^{130, 288}.

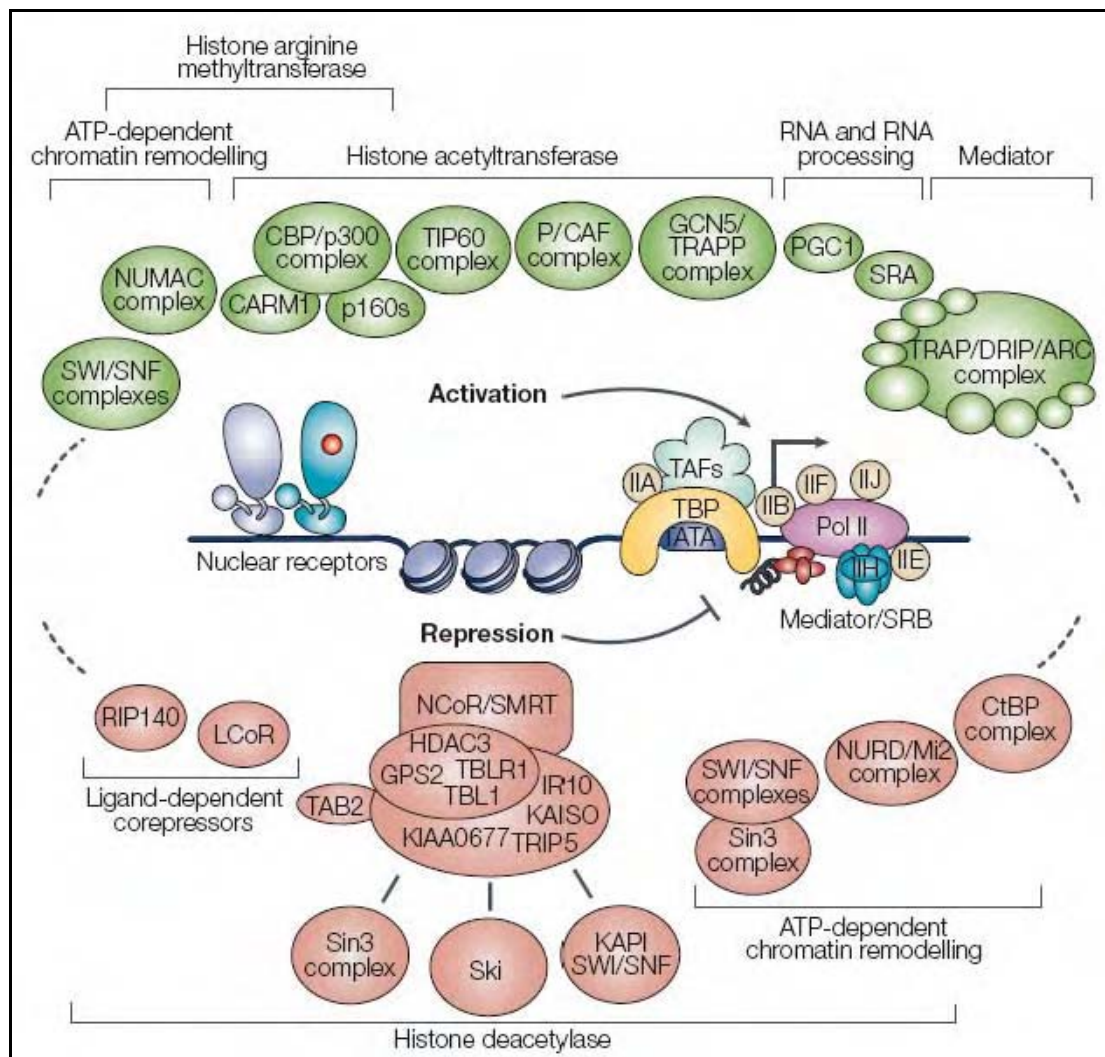


Figure 31 : Corégulateurs transcriptionnels impliqués dans l'activité des récepteurs nucléaires ¹⁵⁸. Les coactivateurs comprennent des histones acétyltransférases et des histones arginine méthyltransférases, et les corépresseurs comptent majoritairement des histones déacétylases.

1.6.1) Les coactivateurs

Les coactivateurs (Figure 31) sont recrutés par un récepteur nucléaire lorsqu'il est dans une conformation agoniste. Dans cette conformation, le récepteur nucléaire présente une surface d'interaction complémentaire avec un motif présent sur les coactivateurs transcriptionnels, il s'agit d'une séquence consensus LxxLL (L = Leucine ; X = acide aminé quelconque), responsable de l'interaction entre un coactivateur et un récepteur nucléaire. Plusieurs types de coactivateurs existent parmi lesquels on compte p160/SRC, TRBP, TRAP et PGC. Chaque type de coactivateurs contient des domaines d'interactions différents avec d'autres corégulateurs transcriptionnels ce qui détermine la composition du complexe de corégulateur formé suivant le coactivateur recruté par un récepteur nucléaire activé. Les corégulateurs recrutés par le coactivateur possèdent des activités enzymatiques et des domaines d'interaction avec d'autres corégulateurs responsables du recrutement séquentiel de l'ensemble des acteurs moléculaires du complexe ¹⁷⁵. Les activités enzymatiques associées aux coactivateurs des récepteurs nucléaires permettent la décondensation de la chromatine pour rendre les séquences promotrices accessibles aux facteurs généraux de transcription. La décondensation de la chromatine est effectuée par des Histone AcétylTransférases (HATs) telle que P300/CBP ou des Histone MéthylTransférases (HMTs) comme CARM1, qui acétylent ou méthylent la queue des histones, ce qui a pour conséquence de diminuer leur affinité pour l'ADN ²⁸⁹. Le complexe SWI/SNF se charge ensuite de l'éviction des histones de l'ADN, ce qui génère des portions d'ADN nu propices à la fixation des facteurs généraux d'initiation de la transcription sur le promoteur à proximité du complexe d'activation du récepteur nucléaire. Le complexe Mediator a un rôle d'intermédiaire en interagissant avec des coactivateurs et en communiquant avec l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de transcription pour le recrutement de la machinerie de transcription sur un promoteur activé par un récepteur nucléaire ²⁹⁰. Après que l'ensemble du complexe général de transcription soit positionné correctement, la transcription du gène cible démarre, conduisant à son expression dans la cellule ^{130, 175, 271, 288}.

1.6.2) Les corépresseurs

Les corépresseurs (Figure 31) sont recrutés par un récepteur nucléaire dans une conformation agoniste inverse ou, pour certains récepteurs nucléaires, lorsqu'il n'est pas lié à un ligand. Les corépresseurs se possèdent un motif peptidique de séquence consensus LxxxIIxxxL, qui reconnaît sur les récepteurs nucléaires un long sillon hydrophobe libéré par l'hélice 12

lorsqu'elle occupe une position agoniste inverse. Les corépresseurs les plus connus sont Nuclear receptor CoRepressor (NCoR) et Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors (SMRT). Ils recrutent des enzymes de remodelage de la chromatine pour la rendre plus compacte au niveau du promoteur et inaccessible au complexe général de transcription, ce qui réprime l'expression du gène concerné. La principale classe d'enzyme concernée est l'Histone DéACétylase (HDAC) qui catalyse la déacétylation des queues d'histones, ce qui favorise l'interaction des histones avec l'ADN. Par conséquent cette modification favorise la formation de nucléosomes qui génèrent une structuration compacte de l'ADN incompatible avec l'expression génique des zones génomiques concernées. Les corépresseurs recrutent aussi le complexe SWI/SNF qui sert à positionner et à mettre en place les nouvelles histones sur le promoteur. La répression de l'expression des gènes par les récepteurs nucléaires est donc essentiellement provoquée par la compaction de la chromatine pour rendre un promoteur inaccessible aux facteurs généraux de transcription^{130, 175, 271, 288}.

1.6.3) Effets tissu-spécifiques des modulateurs des récepteurs nucléaires

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.5.4), les modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires induisent un positionnement intermédiaire de l'hélice 12 qui leur permet d'être agonistes ou antagonistes selon le type tissulaire. En effet, les modulateurs induisent une affinité pour des coactivateurs et aussi pour des corépresseurs. Le récepteur nucléaire lié à un modulateur pourra recruter un type de corégulateur selon son affinité et selon la quantité relative des corégulateurs qu'il a la capacité de recruter. Selon le type tissulaire, le profil d'expression des corégulateurs transcriptionnels varie et il détermine si un modulateur est agoniste ou s'il est antagoniste dans le tissu considéré (Figure 30)^{34, 271}. Par exemple, le tamoxifène qui est un modulateur sélectif d'ER α est antagoniste dans la glande mammaire. Lorsque le coactivateur SRC-1 est surexprimé ectopiquement dans des cellules mammaires, le tamoxifène devient agoniste dans ce type cellulaire. Dans l'utérus, le coactivateur SRC-3 est naturellement plus exprimé que dans la glande mammaire, ce qui conduit à une action agoniste du tamoxifène dans ce tissu. Cela provoque l'effet secondaire le plus indésirable du tamoxifène, c'est-à-dire la promotion du cancer de l'utérus. Ces deux exemples portant sur le tamoxifène démontrent que le profil pharmacologique d'un modulateur sélectif est déterminé par le profil d'expression des corégulateurs transcriptionnels^{34, 54, 271, 272}.

1.6.4) Les corégulateurs dans la pharmacologie des LXR

Des corégulateurs impliqués dans les effets cellulaires et physiologiques des LXRs ont été identifiés (Figure 32). Les coactivateurs de la famille p160, SRC-1 et p300 interviennent dans l'activation de l'expression d'ABCA1 par les LXRs alors que les coactivateurs CARM-1 et P-CAF ne sont pas impliqués ²⁹¹. La Receptor-Interacting Protein 140 (RIP-140) est un corégulateur qui peut se comporter comme un corépresseur ou comme un coactivateur d'un récepteur nucléaire. RIP-140 est un corégulateur physiologique des LXRs en permettant la répression de gènes cibles impliqués dans la néoglucogenèse et en activant l'expression de gènes cibles lipogéniques ²⁹². RIP-140 est aussi impliquée dans la répression de la protéine mitochondriale Uncoupling Protein-1 (UCP-1) par LXR α ce qui inhibe la consommation énergétique ²⁹³. L'Activating Signal Co-integrator 2 (ASC-2) est recruté par les LXRs lorsqu'ils s'hétérodimérisent avec RXR, et ce recrutement est augmenté en présence d'un ligand des RXRs ¹⁹¹. Par conséquent, ASC-2 pourrait être un corégulateur intervenant dans les effets permissifs des ligands des RXRs dans l'hétérodimère LXR/RXR. Le coactivateur PPAR-Gamma Coactivator 1 alpha PGC-1 α est aussi un coactivateur des LXRs ce qui peut participer au cross-talk entre les PPARs et les LXRs ²⁹⁴.

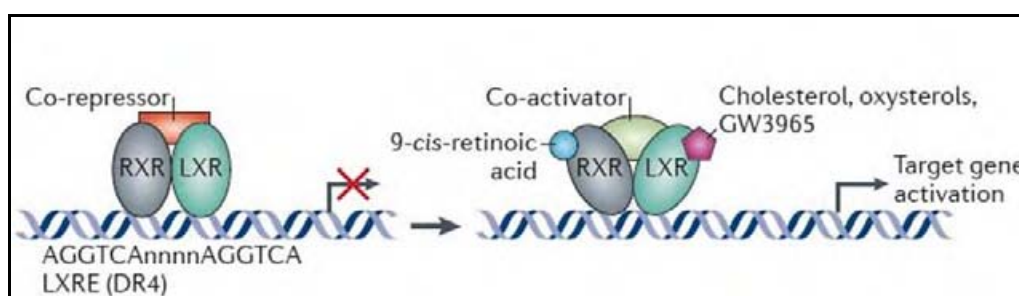


Figure 32 : Recrutement de corégulateurs par les LXRs ²⁹⁵. En absence de ligand, les LXRs sont liés sous forme d'hétérodimère avec RXR sur le promoteur de leur gène cible et ils sont associés à un corépresseur. La liaison d'un ligand des LXRs (GW3965) et/ou la liaison d'un ligand des RXRs (acide 9-cis-rétinoïque) provoque le recrutement d'un coactivateur par LXR/RXR ce qui active l'expression de ses gènes cibles. LXR : Liver X Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor ; LXRE : LXR Response Element ; DR : Direct Repeat.

Le principe moléculaire de l'agonisme partiel chez les LXRs a été défini avec l'agoniste synthétique partiel GW3965. A la différence de l'agoniste pur T0901317 qui ne permet que le recrutement de coactivateur par les LXRs, le GW3965 provoque aussi le recrutement de corépresseurs comme NCoR1 tout en permettant le recrutement des mêmes coactivateurs que le T0901317. Une surexpression du corépresseur NCoR provoque une forte diminution de l'induction de gènes sous contrôle des LXRs par le GW3965 mais pas par le T0901317. Cela montre l'influence du niveau d'expression des corégulateurs sur le profil transcriptionnel

induit par des modulateurs des LXR^s ²⁷⁷. Le CE α , qui est décrit comme un modulateur naturel des LXR^s, confirme les résultats obtenus avec le GW3965. En effet, le comportement pharmacologique du CE α varie lui aussi selon le type cellulaire. Le profil de recrutement de corégulateurs sur les LXR^s par le CE α est différent de celui d'autres modulateurs naturels comme le cholestérol-24,25-époxyde (24,25-CE). Cela peut expliquer les différences de profils transcriptionnels induits par ces deux modulateurs des LXR^s selon le tissu étudié puisqu'ils ne sont pas affectés par l'expression des mêmes corégulateurs. Par exemple, dans les kératinocytes, le CE α réprime l'expression d'ApoE et stimule l'expression de SCD1 et CYP27A1 alors que le 24,25-CE effectue exactement l'inverse du CE α sur ces mêmes gènes ¹²⁶. Par conséquent, la caractérisation de l'affinité d'un récepteur pour des corégulateurs en présence d'un modulateur peut permettre d'appréhender son comportement pharmacologique dans un tissu selon le profil d'expression des corégulateurs transcriptionnels.

2) Rôles cellulaires, physiologiques et physiopathologiques des LXR^s

2.1) Contrôle du métabolisme des stérols

Les LXR^s agissent comme des senseurs de stérols, capables de moduler l'expression de gènes en fonction des stérols qu'ils lient. Grâce à leur capacité à lier différents stérols, les LXR^s permettent l'adaptation du métabolisme des stérols à des situations cellulaires et physiologiques complexes.

2.1.1) Les flux de stérols dans la cellule

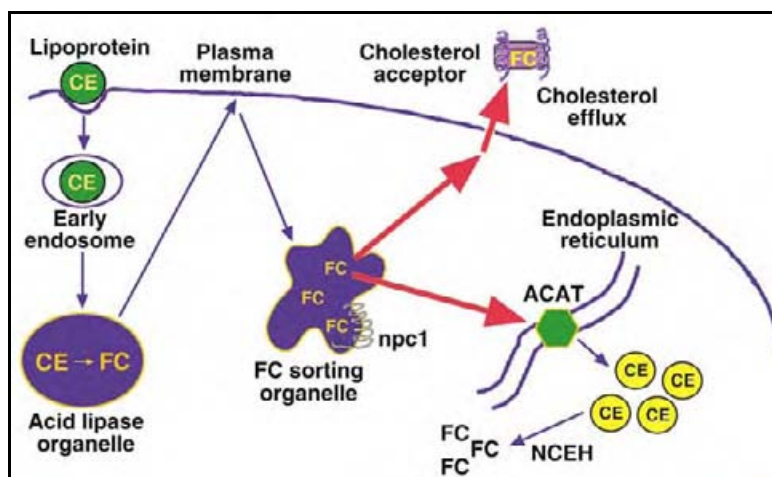


Figure 33 : Flux de cholestérol dans la cellule ²⁹⁶. Le cholestérol est endocyté par la cellule sous forme d'esters de cholestérol (CE) dans des lipoprotéines. Des lipases produisent du cholestérol libre (Free Cholestérol : FC) à partir des esters de cholestérol captés par la cellule. Le cholestérol peut être incorporé à la membrane plasmique, être éflué hors de la cellule par des ABC transporteurs, ou être adressé au réticulum endoplasmique pour être estérifié par l'enzyme ACAT qui permet le stockage intracellulaire du cholestérol dans des gouttelettes lipidiques.

NPC1 : Niemann-Pick type C 1 ; ACAT : Acyl CoA : Acyl cholestérol Transférase. NCEH : Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase.

Le taux de cholestérol doit être finement régulé dans la cellule pour son fonctionnement correct. Si le taux de cholestérol est dérégulé, cela perturbe la composition lipidique des membranes cellulaires, l'activité des protéines membranaires qu'elles portent, ainsi que des voies de signalisations cellulaires, dont celles de récepteurs nucléaires, qui dépendent du taux intracellulaire de cholestérol. Un taux de cholestérol faible peut diminuer la formation de radeaux lipidiques nécessaires à l'activation de protéines comme la kinase mitogène Akt, ce qui affecte la survie des cellules ²⁹⁷. Un taux de cholestérol trop élevé est cytotoxique puisqu'il induit un stress du réticulum endoplasmique qui stimule l'apoptose ²⁹⁸. Les régulations du taux intracellulaire de cholestérol s'opèrent au niveau de l'entrée, de la biosynthèse et de la sortie de cholestérol de la cellule et au niveau de son stockage cellulaire (Figure 33).

2.1.1.1) Entrée de cholestérol dans la cellule

Pour fonctionner correctement, notamment pour le maintien ou la production de leur membrane plasmique, les cellules de notre organisme ont besoin d'un apport extracellulaire de cholestérol. Le cholestérol provient du foie qui est l'organe gestionnaire du cholestérol dans l'organisme, et il est acheminé jusqu'aux tissus périphériques dans des particules lipoprotéiques appelées les LDLs (Light Density Lipoproteins) (Figure 34). Les LDLs sont reconnus par le récepteur LDLR (LDL Receptor) exprimé à la surface des cellules des tissus périphériques. Le complexe LDL-LDLR est internalisé dans une cellule par endocytose dans des puits de clathrine jusqu'aux endosomes tardifs. La particule LDL est hydrolysée par les enzymes lysosomales ce qui permet la libération de cholestérol dans les endosomes tardifs, mais aussi d'autres lipides transportés par les LDLs tels que des triglycérides, des phospholipides et des esters de cholestérol. Le cholestérol est ensuite transporté dans la cellule par voie vésiculaire ou non-vésiculaire, c'est-à-dire par des transporteurs protéiques solubles, entre les différents organites cellulaires ²⁹⁹.

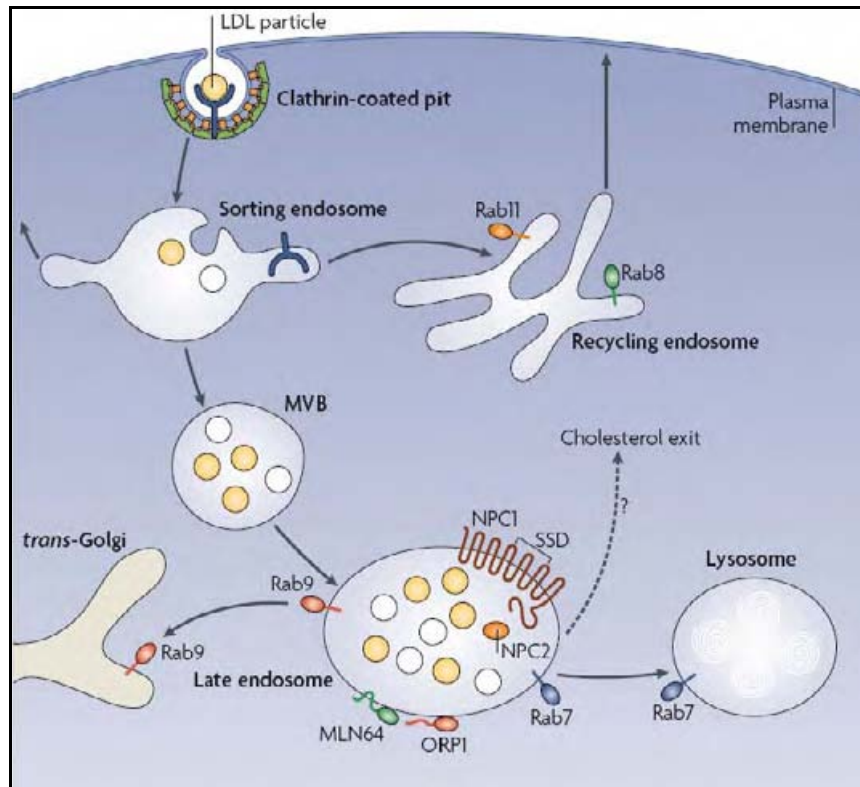


Figure 34 : Mécanisme d'entrée de cholestérol dans la cellule ³⁰⁰. Les particules LDLs transportant le cholestérol sont captées par le LDLR à la surface des cellules qui endocytent les LDLs dans des puits de clathrine. Les vésicules d'endocytose rejoignent l'endosome ou un tri est effectué permettant le recyclage du LDLR à la membrane plasmique et l'adressage du cholestérol à l'endosome tardif. Les protéines NPC1 et NPC2 permettent la sortie du cholestérol de l'endosome tardif pour qu'il soit distribué aux organites nécessitant du cholestérol. LDL : Low Density Lipoprotein ; MVB : Multi Vesicular Body ; NPC : Niemann Pick type C ; SSD : Sterol-Sensing Domain.

Les LXR_s régulent l'entrée de cholestérol en contrôlant la stabilité du LDLR de manière indirecte. En effet, les LXR_s régulent l'expression de l'E3-Ubiquitine Ligase Idol (Inducible Degradation Of LDLR) qui adresse le LDLR au protéasome en l'ubiquitinant. Les agonistes des LXR_s stimulent l'expression d'Idol ce qui contribue à diminuer l'entrée de cholestérol dans la cellule ³⁰¹. Cela est en accord avec l'augmentation parallèle de l'efflux de cholestérol induite par les agonistes des LXR_s qui provoquent de façon générale une diminution du taux de cholestérol intracellulaire. Un autre récepteur est impliqué dans l'entrée cellulaire de stérols, il s'agit de CD36 dont l'expression est régulée par les LXR_s ³⁰² et qui est un récepteur des LDLs oxydés qui contiennent des oxystérols dont certains sont des ligands des LXR_s comme le cholestérol-5,6-époxyde alpha ³⁰³. Par conséquent, les oxystérols apportés par CD36 pourraient jouer un rôle dans la signalisation médiée par les LXR_s. Les LXR_s sont impliqués dans la régulation du trafic intracellulaire du cholestérol en contrôlant l'expression des transporteurs de cholestérol NPC1 (Niemann-Pick type C 1) et NPC2 ³⁰⁴. Les protéines NPC localisées au niveau de l'endosome, sont chargées du transport intracellulaire du cholestérol. Une mutation délétère d'un de ces transporteurs est à l'origine de la maladie génétique

Niemann-Pick type C qui est caractérisée par une surcharge lysosomale provoquant des troubles neurodégénératifs sévères ³⁰⁵. Lors de l'entrée de cholestérol dans la cellule, les protéines NPC permettent le transport du cholestérol vers la membrane plasmique où 60% du cholestérol cellulaire est présent ²⁹⁹. Le cholestérol peut aussi être transporté de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique qui est le principal organe de gestion du cholestérol intracellulaire. En effet, c'est au niveau du réticulum endoplasmique que le cholestérol est estérifié par les enzymes ACAT pour être stocké. Le réticulum endoplasmique est aussi le compartiment de biosynthèse cellulaire du cholestérol, et il a un rôle d'adressage du cholestérol aux différents organites nécessitant du cholestérol comme la membrane plasmique et les mitochondries. Enfin, des régulateurs essentiels du taux intracellulaire de cholestérol sont présents au niveau de cet organe comme c'est le cas du système SREBP-2/SCAP/Insig qui détecte la concentration de cholestérol et qui la contrôle en régulant l'expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol ³⁰⁶.

2.1.1.2) Efflux de cholestérol

L'efflux de cholestérol permet d'éviter son accumulation cellulaire qui est cytotoxique. Pour éliminer le cholestérol en excès, les cellules l'effluent vers des lipoprotéines acceptrices dans le milieu extracellulaire (Figure 35). Une partie du cholestérol accumulé dans une cellule est oxydé ce qui génère des oxystérols. Ces oxystérols sont ensuite capables d'activer les LXRs qui lancent un programme génétique qui vise à réguler le taux intracellulaire de cholestérol pour éviter son accumulation. Les LXRs activent l'expression de transporteurs d'efflux de cholestérol de la famille des ABC (ATP-Binding Cassette) transporteurs qui effectuent un transport actif du cholestérol au niveau de la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule. Parmi ces transporteurs, ABCA1 et ABCG1 sont les principaux acteurs de l'efflux de cholestérol provoqué par l'activation des LXRs ^{307, 308}.

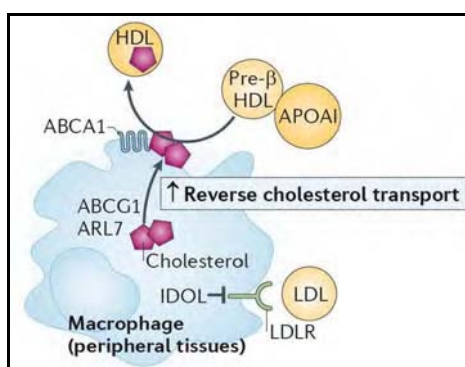


Figure 35 : Efflux cellulaire du cholestérol ²⁹⁵. Le transporteur intracellulaire de cholestérol ARL7 transporte le cholestérol à la membrane plasmique pour qu'il soit efflué par les ABC transporteurs. Les ABC transporteurs

ABCA1 et ABCG1 sont impliqués dans l'efflux de cholestérol vers des apolipoprotéines acceptrices qui forment des particules HDLs. Pour diminuer le taux de cholestérol intracellulaire, l'E3-Ubiquitine Ligase dégrade le LDLR pour empêcher l'entrée de cholestérol dans la cellule. L'expression de l'ensemble de ces protéines est régulée par les LXR. ARL7 : ADP-Ribosylation factor-Like 7 ; HDL : High Density Lipoprotein ; APOA1 : Apolipoprotein A1 ; LDL : Low Density Lipoprotein ; IDOL : Inducible Degradator Of LDLR ; ABCA1 : ATP-Binding Cassette A1 ; ABCG1 : ATP-Binding Cassette G1.

Le transporteur ABCA1 est particulièrement important pour le contrôle de l'homéostasie du cholestérol puisqu'une mutation congénitale de ce gène provoque la maladie de Tangier qui provoque une athérosclérose précoce chez les personnes atteintes ³⁰⁹. Les agonistes des LXRs stimulent aussi l'expression des transporteurs intracellulaires NPC1 et NPC2. Ces transporteurs sont chargés de transporter le cholestérol de l'endosome tardif à la membrane plasmique pour qu'il puisse être éliminé par les ABC transporteurs ³⁰⁴. Les LXRs sont des activateurs directs de l'expression de l'ADP-Ribosylation Factor-Like 7 (ARL7) qui est un transporteur intracellulaire du cholestérol. ARL7 transporte le cholestérol à la membrane plasmique et facilite l'efflux de cholestérol médiée par ABCA1 ³¹⁰. En parallèle, les LXRs activent l'expression d'apolipoprotéines comme ApoA1 ³¹¹ et ApoE ³¹² qui agissent comme des accepteurs extracellulaires de cholestérol en captant le cholestérol expulsé de la cellule par les ABC transporteurs. La fixation du cholestérol par ces apolipoprotéines permet la formation de particules HDLs (High Density Lipoprotein) qui transportent le cholestérol des cellules des tissus périphériques vers le foie qui se charge de l'élimination du cholestérol par son excrétion dans la bile ³¹³.

2.1.1.3) Stockage cellulaire du cholestérol

Une accumulation de cholestérol dans la cellule peut conduire à la stimulation de son efflux et/ou son stockage cellulaire sous forme d'esters, ce qui nécessite l'estérification du cholestérol (Figure 36A). Les esters de cholestérol sont stockés dans des vésicules appelées gouttelettes lipidiques (Figure 36B). Cela permet d'éviter l'insertion du cholestérol accumulé dans les membranes ce qui empêche ses effets cytotoxiques ³¹⁴.

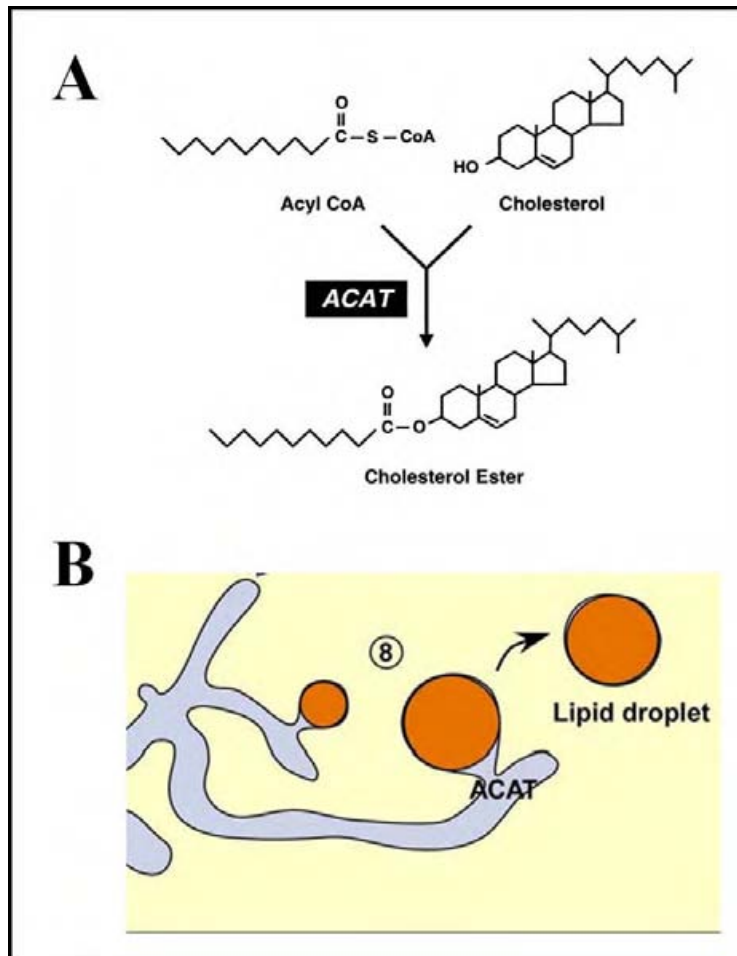


Figure 36 : Le stockage intracellulaire de cholestérol. A. Les enzymes ACAT (Acyl CoA : Acyl cholesterol transférase) catalysent l'estérification du cholestérol avec un acide gras pour produire des esters de cholestérol³¹⁵. B. Les esters de cholestérol produits par les enzymes ACAT au niveau du réticulum endoplasmique sont stockés dans des vésicules qui bourgeonnent du réticulum endoplasmique et qui forment des gouttelettes lipidiques (lipid droplets)²⁹⁹.

Les LXRs facilitent le stockage du cholestérol sous forme d'esters en stimulant la lipogénèse, qui est la production d'acides gras, par l'augmentation de l'expression de SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein-1c) qui est un facteur de transcription contrôlant la lipogénèse²⁵³. En parallèle, les LXRs stimulent l'expression de SCD-1 (Stearoyl Coenzyme A Desaturase) qui est une enzyme qui insature les acides gras en C9³¹⁶. L'augmentation de la lipogénèse couplée à l'augmentation de l'insaturation des acides gras permet d'approvisionner les enzymes ACATs en acide gras insaturés, qui sont les meilleurs substrats pour l'estérification du cholestérol³¹⁷, ce qui favorise la production d'esters de cholestérol et le stockage intracellulaire du cholestérol. Une augmentation de l'efflux de cholestérol causé par l'activation des LXRs provoque une diminution de l'estérification du cholestérol puisque le taux de cholestérol diminue dans la cellule³⁰⁴. A l'inverse, une augmentation de la production d'acides gras insaturés par SCD-1 inhibe l'efflux de cholestérol par ABCA1 dont l'activité est

inhibée par un taux élevé d'acides gras insaturé dans la membrane plasmique³¹⁶. Cela montre que l'efflux de cholestérol et son stockage sont mutuellement inhibiteurs. Les esters de cholestérol ne sont pas efflués par ABCA1, ils doivent d'abord être hydrolysés par des Cholesteryl Ester Hydrolases (CEH) lysosomales qui les transforment en cholestérol libre capable d'être efflué par ABCA1³¹⁸. L'hydrolyse des esters de cholestérol contenus dans les gouttelettes lipidiques constitue l'étape limitante de l'efflux du cholestérol contenu dans ces vésicules lipidiques³¹⁴. Récemment, il a été montré dans les macrophages que les gouttelettes lipidiques sont captées par des vésicules autophagiques qui, après fusion avec le lysosome, permettent l'hydrolyse des esters de cholestérol qu'elles contiennent par les hydrolases lysosomales³¹⁹. Cela veut dire que l'efflux des esters de cholestérol dépend de l'autophagie.

2.1.2) La cholestérogénèse

2.1.2.1) Voie de biosynthèse du cholestérol

La cholestérogénèse est la biosynthèse cellulaire de cholestérol à partir d'acétyl CoA et cette voie métabolique est présente dans toutes les cellules nucléées (Figure 37)³⁰⁰. La cholestérogénèse se déroule dans le réticulum endoplasmique où sont localisées la majeure partie des enzymes impliquées dans le métabolisme des stérols³²⁰. Cette voie de biosynthèse fait intervenir environ 30 enzymes parmi lesquelles la 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme A Reductase (HMGCR) qui catalyse la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate, qui est la réaction limitante de la biosynthèse du cholestérol. Cette enzyme est ciblée par les statines qui sont des agents thérapeutiques de référence pour traiter l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose³²¹. Le premier stérol intermédiaire produit au cours de la cholestérogénèse est le lanostérol qui, après l'intervention de 19 réactions enzymatiques, est transformé en cholestérol³⁰⁰. Même si chez l'adulte une inhibition de la cholestérogénèse par les statines permet de prévenir l'athérosclérose qui est une pathologie majeure, la cholestérogénèse est essentielle au cours du développement. Plusieurs maladies génétiques sont causées par l'inactivation congénitale de gènes codant des enzymes cholestérogéniques. Par exemple, le syndrome Smith-Lemli-Opitz provoqué par une mutation de la 7-déshydrocholestérol réductase (DHCR7), dont les conséquences sont une malformation cranio-faciale ainsi que de plusieurs organes comme le cerveau, le cœur et les poumons, conduit à une mort périnatale ou au début de l'âge adulte. De nombreuses autres enzymes cholestérogéniques ont un rôle majeur puisque leur inactivation conduit à une mort embryonnaire. C'est le cas d'une inactivation de l'HMGCR qui est létale au jour

embryonnaire 8,5 (E 8,5) c'est-à-dire avant l'implantation de l'embryon sur la paroi utérine³²². La voie de biosynthèse du cholestérol partage des produits réactionnels intermédiaires avec d'autres voies métaboliques, dans les premières étapes de la cholestérogénèse. En effet, le geranyl-pyrophosphate sert à la synthèse de monoterpénoïdes et le farnésyl-pyrophosphate permet la prénylation de certaines protéines membranaires périphériques comme la protéine Ras³²³.

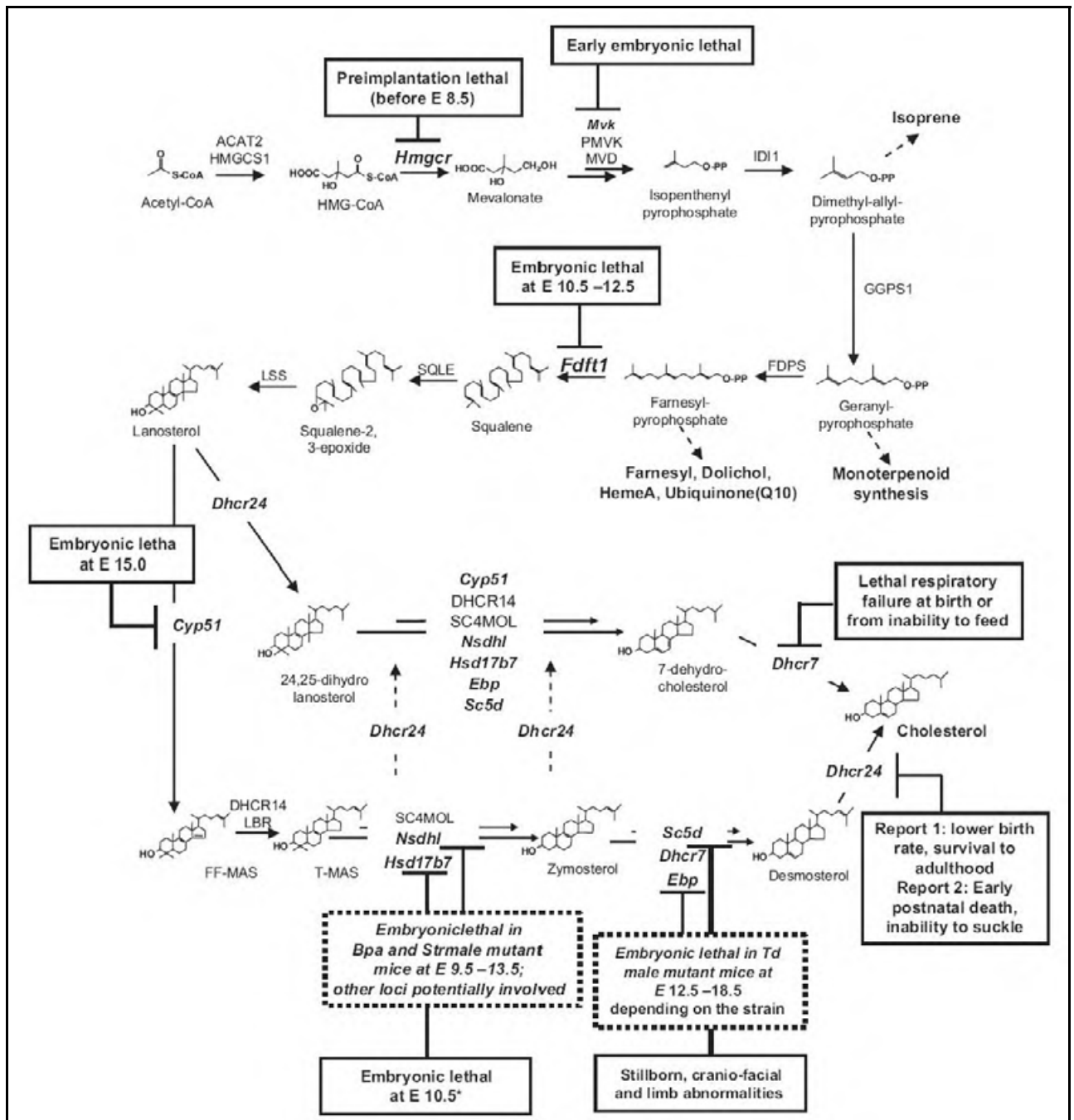


Figure 37 : La cholestérogénèse et l'impact de mutation congénitale d'enzymes cholestérogéniques sur le développement³²². La cholestérogénèse est effectuée par environ 30 réactions enzymatiques. La létalité embryonnaire de mutation congénitale d'enzymes cholestérogéniques montre l'importance de la cholestérogénèse au cours du développement.

2.1.2.2) Régulation de la cholestérogenèse

Des produits intermédiaires de la cholestérogenèse, comme le zymostérol et le desmostérol activent les LXR α ce qui pourrait contribuer à l'homéostasie des stérols dans la cellule en couplant la cholestérogenèse avec la régulation des flux cellulaires de stérols par les LXR α ²⁵². La première étude montrant une régulation constitutive de LXR α par des produits issus de la cholestérogenèse a aussi montré qu'un produit dérivé de cette voie, le géranylgéraniol ou géranylgeranyl-pyrophosphate agit comme un antagoniste sur l'activité transcriptionnelle des LXR α ³²⁴. Le lanostérol qui est le premier stérol généré au cours de la cholestérogenèse n'est pas un ligand des LXR α ²⁵². En revanche, le 24,25-dihydrolanostérol (DHL) qui s'accumule après une répression de CYP51A1 par FOXO4 est un ligand des LXR α qui stimule leur activité³²⁵. Le 14-déméthyl lanostérol qui est le produit de la transformation du lanostérol par CYP51A1 est aussi un ligand agoniste de LXR α ²¹⁶. Les LXR α activent l'expression de la 24-Déshydrocholestérol Réductase (DHCR24) qui catalyse la transformation du desmostérol en cholestérol qui est la dernière étape de la cholestérogenèse³²⁶. Cela suggère que l'activation des LXR α contribue à une diminution du taux de desmostérol ainsi que du taux de zymostérol qui est affecté par l'activité de DHCR24²⁵². DHCR24 est aussi capable d'agir à l'étape du lanostérol en réduisant la double liaison du lanostérol en position 24 ce qui le transforme en DHL, qui est un activateur des LXR α ¹¹⁸. Le DHL subit ensuite les mêmes transformations que le lanostérol pour générer le cholestérol sauf que l'ensemble des intermédiaires est déjà saturé en position 24 et 25, DHCR24 n'intervient donc pas à la fin de ce schéma de biosynthèse³²². Par conséquent il serait intéressant de tester l'effet du desmostérol, du zymostérol et du DHL sur l'activité des LXR α et particulièrement sur la régulation de l'expression de DHCR24 par les LXR α puisque DHCR24 pourrait établir un rétrocontrôle de l'activation des LXR α par ces produits intermédiaires de la cholestérogenèse. Le desmostérol agit aussi sur la cholestérogenèse en empêchant la maturation de SREBP-2 qui active l'expression d'enzymes cholestérogéniques comme HMGCR³²⁷. Par conséquent, le déroulement correct de la cholestérogenèse est contrôlé par des produits intermédiaires capables d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la cholestérogenèse ou de réguler des senseurs du métabolisme des stérols comme les SREBPs et les LXR α .

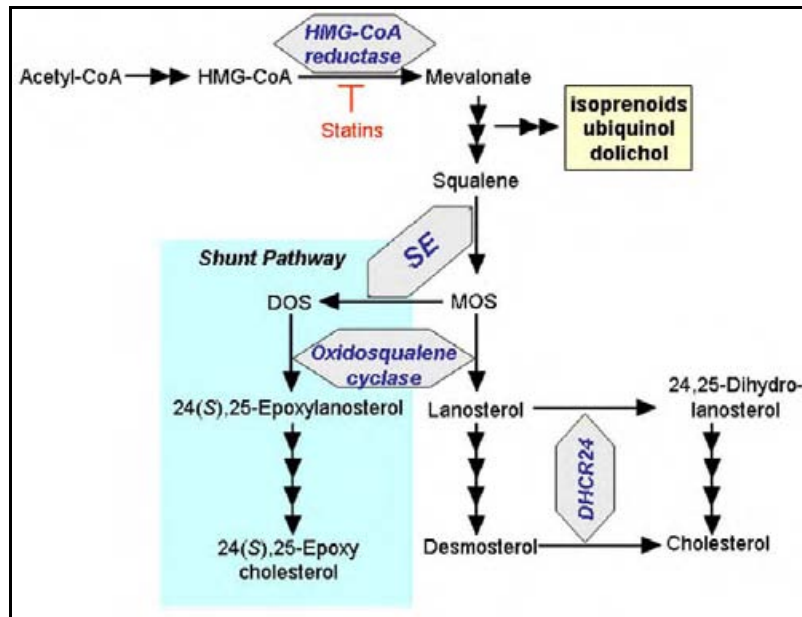


Figure 38 : La voie de dérivation de la cholestérogénèse (Shunt pathway) ¹¹⁸. La voie de biosynthèse du cholestérol peut suivre une dérivation (shunt pathway) au niveau de la MOS, dont le produit final est le 24(S),25-epoxycholesterol. MOS : 2,3(S)-monooxydosqualene ; DOS : 2,3(S);22(S),23-diépoxydosqualene ; SE : Squalene Epoxidase ; DHCR24 : Cholesterol Δ 24 Reductase.

Le précurseur du lanostérol, le 2,3(S)-monooxydosqualene (MOS), peut suivre deux voies métaboliques différentes (Figure 38). Le MOS peut continuer la cholestérogénèse après transformation en lanostérol par l'oxydosqualene cyclase ou lanostérol synthase (LSS) pour finalement générer le cholestérol. Le MOS peut aussi emprunter une voie alternative, après transformation en 2,3(S);22(S),23-diépoxydosqualene par la squalene monooxygénase ou squalene epoxydase (SE) suivi de plusieurs réactions enzymatiques parallèles à la cholestérogénèse mais dont le produit final est le 24(S),25-epoxycholestérol (24,25-EC) ³²⁸. Une inhibition de la LSS favorise l'emprunt de cette voie métabolique alternative en provoquant une accumulation de MOS qui peut alors facilement être pris en charge par la SE, ce qui augmente la production de 24,25-EC ^{329, 330}. Ainsi, le 24,25-EC est un oxystérol qui ne dérive pas du cholestérol ³³¹. Dans la cellule, comme d'autres oxystérols le 24,25-EC inhibe la cholestérogénèse et favorise l'efflux de stérols ¹¹⁸. Premièrement, le 24,25-EC est capable d'inhiber Insig qui est une protéine nécessaire à la maturation et l'activation des SREBPs dont SREBP-2. L'inhibition de SREBP-2 a pour conséquence d'inhiber la cholestérogénèse ainsi que l'entrée de cholestérol exogène par le LDLR. Deuxièmement, le 24,25-EC adresse n alcool avec un asome ce qui a pour conséquence d'empêcher l'initiation de la cholestérogénèse. Troisièmement, le 24,25-EC est un des oxystérols qui présente la meilleure affinité pour les LXRs, et grâce à l'augmentation de l'expression d'ABCA1 il permet l'efflux de stérols accumulés dans la cellule ³³². Plusieurs oxystérols dont le 24,25-EC sont capables

d'inhiber l'expression de deux enzymes cholestérogéniques : la squalene synthase (FDFT1) et la lanostérol 14 α -deméthylase (CYP51A1), en activant LXR α ce qui renforce leur action d'inhibition de la cholestérogénèse¹⁹⁰. En étant produit en même temps que le cholestérol, le 24,25-EC aurait un rôle de régulation rapide de l'activité de la cholestérogénèse pour empêcher une accumulation de cholestérol toxique pour la cellule^{331, 333}. L'importance de ce rôle a été confirmée dans une étude où les auteurs ont surexprimé la LSS pour empêcher la synthèse de 24,25-EC. La surexpression de la LSS conduit à une accumulation forte de cholestérol corrélée avec une activité de biosynthèse de cholestérol fortement accrue³³⁴. Cela place le 24,25-EC comme un oxystérol majeur pour la régulation de la cholestérogénèse.

2.1.2.3) Ciblage pharmacologique de la cholestérogénèse

L'une des principales causes de l'athérosclérose est l'hypercholestérolémie puisqu'une forte concentration de cholestérol dans le sang favorise la formation de la plaque athéromateuse sur la paroi des artères responsable de l'athérosclérose^{321, 335}. Les sources alimentaires de cholestérol apportent environ 337 mg de cholestérol par jour alors que l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme en produisent 1000 mg par jour³³⁵. Pour réduire le taux de cholestérol sanguin la cholestérogénèse est donc une cible pharmacologique de choix. La cible pharmacologique la plus connue de la cholestérogénèse est l'HMGCR qui est inhibée par les statines telles que la lovastatine et la simvastatine (Figure 39A), mais qui est aussi l'enzyme la plus régulée de la cholestérogénèse dans la cellule. Les statines ont prouvé leur efficacité clinique puisqu'elles permettent de réduire de 23% l'incidence des maladies cardiovasculaires³³⁵. Etant donné que la voie métabolique du mévalonate, initiée par la production de mévalonate par l'HMGCR, génère des précurseurs pour des voies métaboliques différentes de la cholestérogénèse, les statines ont des effets secondaires indépendants de l'inhibition de la production de cholestérol³²³. Le ciblage d'étapes plus en aval dans la cholestérogénèse, par exemple des étapes post-lanostérol, pourrait être une alternative thérapeutique aux statines. Par exemple, les LXRs sont capables d'inhiber l'enzyme CYP51A1 qui catalyse une étape post-lanostérol dans la cholestérogénèse grâce à un LXRE négatif sur son promoteur¹⁹⁰. Cela pourrait motiver le développement de ligands des LXRs qui répriment l'expression de CYP51A1. Le resveratrol qui est un stérol naturel retrouvé dans le raisin et qui a des effets athéro-protecteurs est un inhibiteur non compétitif de la squalene epoxydase³³⁶ et il inhibe l'expression de l'HMGCR^{337, 338}. L'émopamil qui est un antagoniste du calcium utilisé contre l'ischémie est un ligand de l'Emopamil-Binding Protein qui est la cholestérol- $\Delta 8, \Delta 7$ -

isomérase (D8D7I), une enzyme de la cholestérogénèse qui catalyse la transformation du zymostenol en lathosterol ³³⁹.

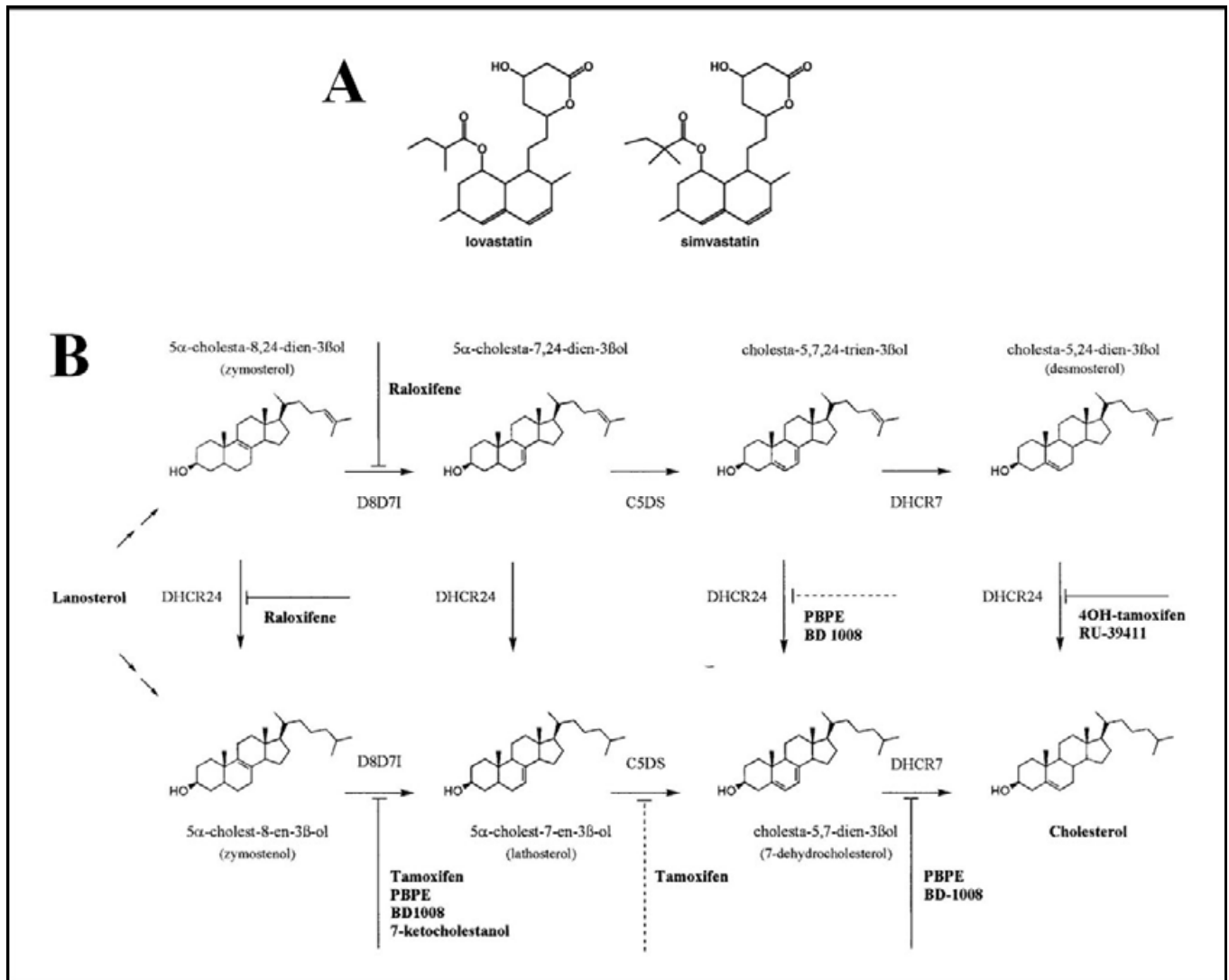


Figure 39 : Ciblage pharmacologique de la cholestérogénèse. A. Les statines inhibent la cholestérogénèse en inhibant l'HMG-CoA réductase. B. Les ligands d'AEBS inhibent plusieurs étapes de la cholestérogénèse ⁹³. D8D7I = 3β-hydroxycholestérol-Δ8, Δ7-isomérase ; DHCR7 = 7-déshydrocholestérol réductase ; DHCR24 : cholesterol Δ24 Réductase ; C5DS : cholesterol Δ5 Desaturase.

Les ligands de l'Anti-Estrogen Binding Site (AEBS), dont le tamoxifène fait partie, sont des inhibiteurs de D8D7I (Figure 39B). Ils provoquent une accumulation des substrats de l'enzyme, le zymostenol et le zymosterol. D8D7I et une autre enzyme cholestérogénique, la 7-Déshydrocholestérol Réductase (DHCR7) forment le site AEBS. Certains ligands d'AEBS sont aussi des inhibiteurs de DHCR7, ce qui provoque une accumulation de 7-déshydrocholestérol, et des antioestrogènes comme le 4-hydroxytamoxifène et le RU-39411 sont des inhibiteurs de la 24-Déshydrocholestérol Réductase (DHCR24) et ils induisent une

accumulation de desmostérol ^{93, 115}. Les stérols intermédiaires de la cholestérogénèse qui s'accumulent sous l'effet inhibiteur des ligands d'AEBS à des concentrations cytotoxiques induisent une autophagie cytoprotectrice dans des cellules cancéreuses mammaires et leur oxydation provoque la mort cellulaire ^{117, 340}. L'oxydation des stérols intermédiaires accumulés sous l'action des ligands d'AEBS à plus faible concentration induit aussi la différenciation cellulaire de cellules cancéreuses mammaires ¹¹⁶. Cela montre que des dérivés oxydés de stérols intermédiaires provenant de la cholestérogénèse peuvent avoir des effets cellulaires complexes qu'il serait intéressant de caractériser.

2.1.3) Les flux de stérols dans l'organisme

L'alimentation apporte une quantité importante de stérols de nature variée à l'organisme. L'organisme met en place des programmes physiologiques de régulation de l'assimilation et de l'élimination des stérols dans lesquels les LXRs interviennent pour contrôler la quantité et la distribution des stérols dans les organes (Figure 40).

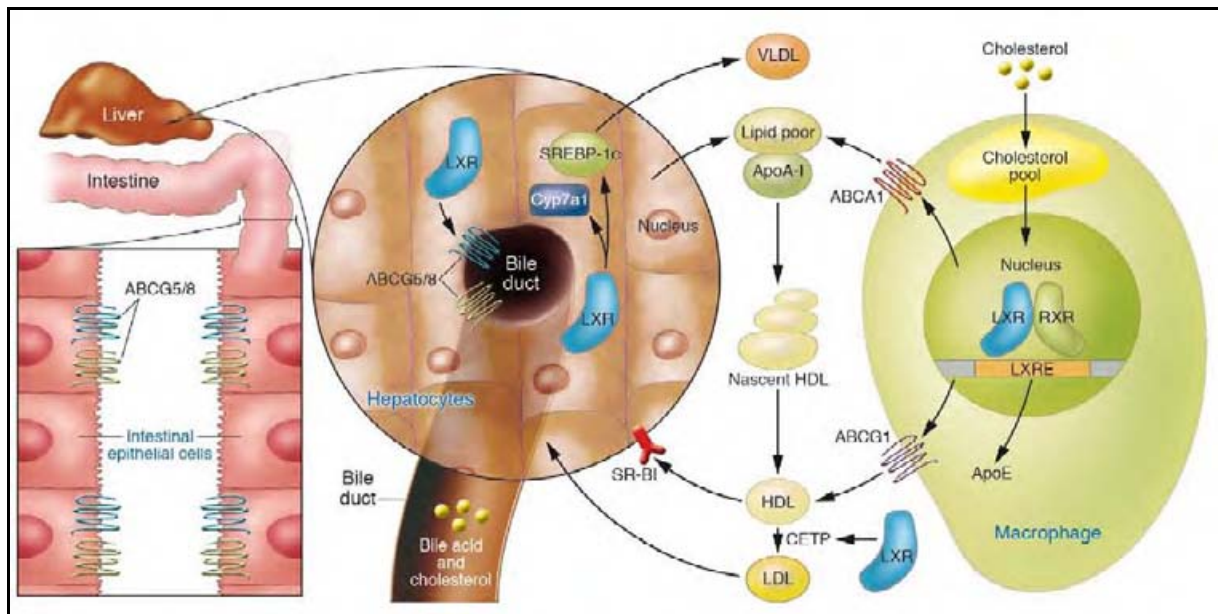


Figure 40 : Contrôle du métabolisme des stérols par les LXRs dans l'organisme ¹⁶⁰. Les LXRs contrôlent l'absorption de cholestérol par l'intestin, le catabolisme du cholestérol au niveau du foie et les flux de cholestérol entre le foie et les tissus périphériques. LXR : Liver X Receptor ; SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c ; CYP7A1 : Cytochrome 7A1 ; HDL : High Density Lipoprotein ; LDL : Low Density Lipoprotein ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; RXR : Retinoid X Receptor ; LXRE : LXR Response Element ; ABC : ATP-Binding Cassette transporters.

2.1.3.1) Absorption intestinale du cholestérol

Les stérols provenant de l'alimentation sont absorbés au niveau des entérocytes qui sont les cellules épithéliales de l'intestin (Figure 41). L'absorption des stérols par l'intestin est limitée

par des ABC transporteurs au niveau des entérocytes qui effluent les stérols dans la lumière intestinale, ce qui participe à l'élimination d'un excès de stérols provenant de la diète ³¹⁸. Les stérols végétaux, dont le plus abondant dans l'alimentation est le β -sitostérol, sont aussi efflués par les entérocytes dans la lumière intestinale, ce qui empêche leur absorption. Cet efflux est effectué par les demi-ABC transporteurs ABCG5 et ABCG8 qui fonctionnent en hétérodimère ³¹⁸.

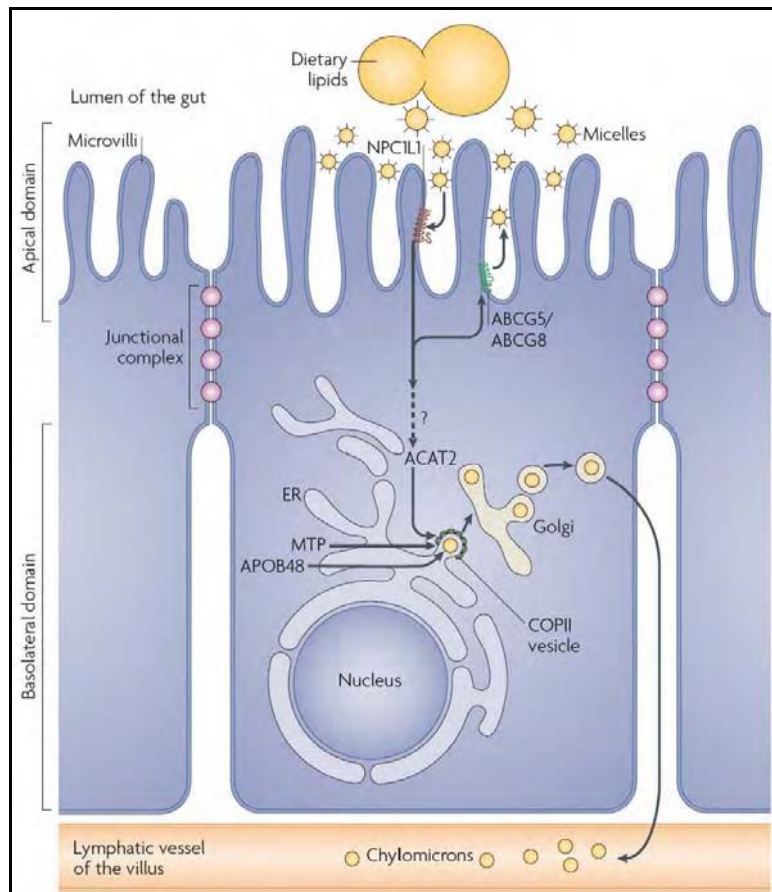


Figure 41 : Mécanisme de l'absorption intestinale du cholestérol ³⁰⁰. Le cholestérol de la diète est absorbé par les entérocytes bordant la lumière intestinale. NPC1L1 (Niemann Pick Type C Like 1) participe à l'entrée de cholestérol dans les entérocytes alors qu'ABCG5 et ABCG8 effluent le cholestérol dans la lumière intestinale ce qui diminue son absorption par l'intestin. Le cholestérol est intégré dans des particules lipoprotéiques appelées chylomicrons qui sont exportés vers le foie par la circulation lymphatique qui draine les villi intestinaux. ABC : ATP-Binding Cassette transporters ; ER : Endoplasmic Reticulum ; MTP : Microsomal Triglyceride transfer Protein ; ACAT2 : Acyl CoA : Acyl cholesterol Transferase.

Une mutation congénitale de l'un de ces demi-transporteurs de stérols provoque la sitostérolémie qui est caractérisé par une hypercholestérolémie, une athérosclérose précoce et une accumulation de β -sitostérol dont l'absorption n'est pas empêchée ³⁴¹. Les LXRs régulent activement l'absorption de stérols au niveau de l'intestin puisque des agonistes des LXRs sont capables de limiter l'absorption du cholestérol en augmentant considérablement l'expression du transporteur ABCA1 dans l'intestin ³⁴². Au niveau de l'intestin, ABCA1 contribue à limiter

l'absorption du cholestérol ^{307, 343}. Les LXR_s régulent aussi l'expression d'ABCG5 et d'ABCG8, ce qui leur permet de contrôler l'absorption intestinale des stérols végétaux ³⁴⁴. Le transporteur intracellulaire NPC1L1 participe activement à l'absorption des stérols par l'intestin, comme le montre son invalidation génétique par knock-out qui réduit de 69% l'absorption de cholestérol chez la souris ³⁴⁵. Des agonistes synthétiques des LXR_s répriment l'expression de NPC1L1 ce qui pourrait participer au contrôle physiologique de l'absorption de cholestérol par les LXR_s ³⁴⁶.

2.1.3.2) Export de cholestérol du foie vers les cellules périphériques

Le cholestérol et les triglycérides provenant de l'absorption intestinale sont captés au niveau du foie dans des chylomicrons (CMR) (Figure 42). Les hépatocytes sécrètent ensuite le cholestérol et les triglycérides dans des particules VLDL assemblées dans le réticulum endoplasmique par la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP) ³⁰⁰.

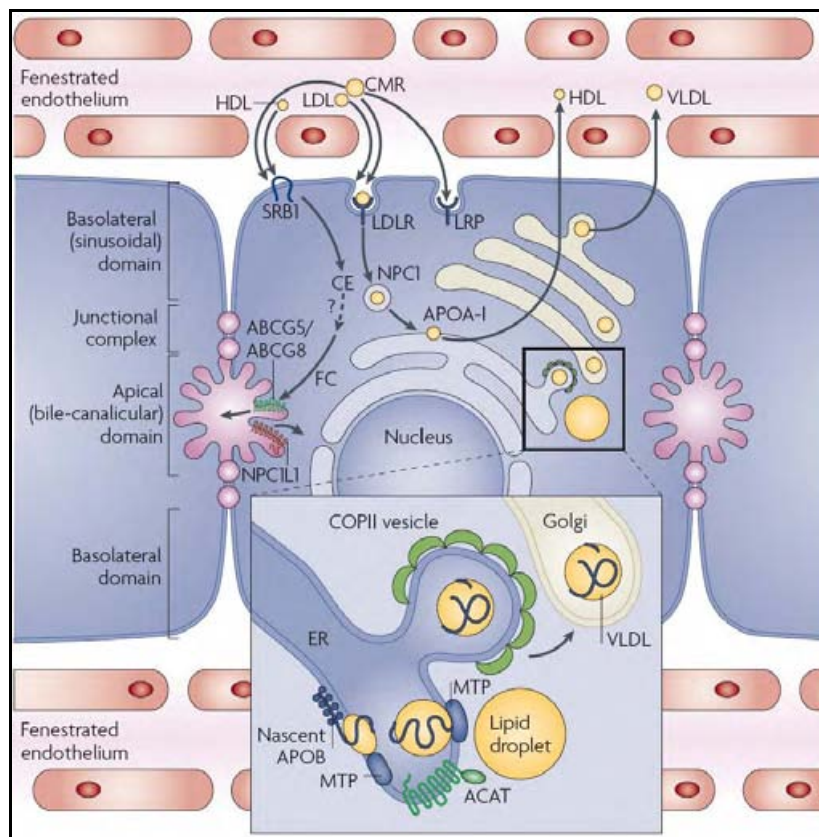


Figure 42 : Gestion du cholestérol par le foie ³⁰⁰. Les hépatocytes captent le cholestérol circulant dans des HDLs (High Density Lipoprotein) et des LDLs (Low Density Lipoprotein) grâce aux récepteurs SRB1 (Scavenger Receptor B1) et LDLR (LDL Receptor) respectivement. Le cholestérol peut ensuite être excrété dans les canaux biliaires par ABCG5/ABCG8 pour l'élimination du cholestérol. Le cholestérol peut aussi être adressé au réticulum endoplasmique et être incorporé à l'apolipoprotéine B pour former des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) qui sont exportés dans la circulation sanguine vers les tissus périphériques. Les hépatocytes peuvent stocker le cholestérol dans des gouttelettes lipidiques. CMR : chylomicron ; ER : Endoplasmic Reticulum ; MTP : Microsomal Triglyceride transfert Protein ; NPC : Niemann Pick Type C.

LXR α régule cette étape puisque son activation provoque une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B (ApoB) qui constitue les VLDLs. Cette augmentation semble liée à l'augmentation de l'expression d'ApoB ainsi qu'à la stimulation de la lipogenèse par les LXRs qui stimule la production de triglycérides favorables à la constitution des VLDL³⁴⁷. Les VLDLs sont ensuite transportés par la circulation sanguine jusqu'aux tissus périphériques. Dans la circulation sanguine, les VLDLs peuvent être maturés en LDL sous l'action de la Lipoprotéine Lipase (LPL) dont l'expression est stimulée par les LXRs³⁴⁸. Les VLDLs et les LDLs sont ensuite reconnus par leur récepteur respectif VLDLR et LDLR exprimés à la surface des cellules des tissus périphériques³⁴⁹. La stabilité de ces récepteurs, et par conséquent l'entrée cellulaire de lipides provenant des VLDLs et des LDLs est contrôlée par Idol qui est sous le contrôle transcriptionnel des LXRs^{301, 350}. Les LXRs régulent donc plusieurs étapes du transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques, et en particulier la captation du cholestérol et des triglycérides au niveau des tissus périphériques.

2.1.3.3) Transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol achemine le cholestérol des tissus périphériques vers le foie suivi de l'élimination du cholestérol par le foie (Figure 43).

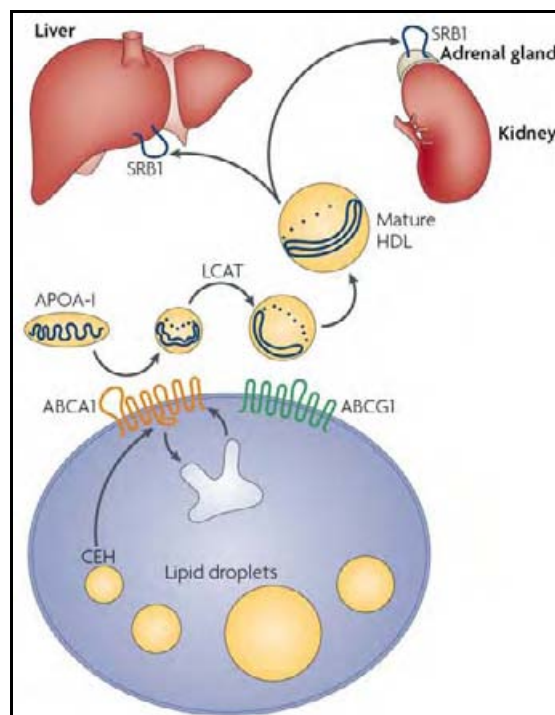


Figure 43 : Le transport inverse du cholestérol³⁰⁰. Les cellules des tissus périphériques effluent le cholestérol vers des apolipoprotéines qui maturent en HDLs (High Density Lipoprotein). Les HDLs sont transportés par la

circulation sanguine et ils peuvent être captés par la glande adrénale et par le foie qui sont deux tissus exprimant SRB1 qui est le récepteur des HDLs. Dans la glande adrénale, le cholestérol ainsi capté peut intégrer la voie de la stéroïdogenèse pour la production d'hormones stéroïdiennes. Dans le foie, le cholestérol peut être éliminé par excrétion dans les canaux biliaires. SRB1 : Scavenger Receptor B1 ; LCAT : Lecithin cholesterol AcylTransferase ; CEH : Cholesterol Ester Hydrolase.

L'élimination du cholestérol au niveau hépatique peut se faire soit par le catabolisme du cholestérol en acides biliaires qui sont ensuite sécrétés dans la lumière intestinale, soit il se fait par l'efflux de cholestérol dans les canaux biliaires qui transportent le cholestérol présent dans la bile dans la lumière intestinale suivi de son excrétion. LXR α en particulier est essentiel au fonctionnement correct du transport inverse du cholestérol au niveau du foie. Un knockout de LXR α provoque une forte augmentation du volume du foie, appelée hépatomégalie, causée par une accumulation d'esters de cholestérol. Le cholestérol s'accumule dans le foie des souris LXR α ^{-/-} en raison d'une incapacité du foie à éliminer le cholestérol dans la bile ainsi qu'à métaboliser le cholestérol en acides biliaires, ce qui provoque son stockage sous forme d'esters de cholestérol³⁵¹. Une invalidation du gène codant LXR β ne provoque pas de perturbation du métabolisme hépatique du cholestérol³⁵². Cela suggère que dans le foie, LXR α parvient à compenser une perte de LXR β . Les souris LXR α ^{-/-} ont un métabolisme hépatique du cholestérol fortement perturbé qui suggère une absence de compensation fonctionnelle par LXR β . Malgré tout, LXR β compense en partie la perte de LXR α puisque les souris LXR α ^{-/-}/LXR β ^{-/-} ont un phénotype hépatique plus grave que les souris LXR α ^{-/-}³¹³. Par conséquent, les souris knockout et double knockout pour les LXRs ont permis de démontrer que les LXRs régulent de façon essentielle le transport inverse du cholestérol avec un rôle prédominant de LXR α au niveau hépatique.

Au niveau des tissus périphériques, l'efflux cellulaire de cholestérol par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 induit la formation de particules HDLs grâce à la fixation du cholestérol par des apolipoprotéines extracellulaires comme ApoE. Comme nous l'avons vu dans la partie 2.1.1.2), ces protéines intervenant dans l'efflux du cholestérol sont transcriptionnellement régulées par les LXRs. Après leur formation, les particules HDLs peuvent subir une modification de leur composition par des enzymes de remodelage dont l'expression est régulée par les LXRs, telles que la protéine de transfert de phospholipides (PLTP)³⁵³, la protéine de transfert d'esters de cholestérol (CETP)³⁵⁴ ou la lipase des lipoprotéines (LPL)³⁴⁸. Le remodelage des lipoprotéines par l'activation des LXRs faciliterait le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie²⁹⁵. Les particules HDLs transportent le cholestérol jusqu'aux hépatocytes présents dans le foie où elles se lient au récepteur SR-B1 (Scavenger Receptor-B1) dont l'expression est régulée par LXR α ³⁵⁵. Le cholestérol

provenant des HDLs peut alors être récupéré par les hépatocytes³⁴⁹. Les hépatocytes gèrent ensuite le cholestérol provenant des particules HDLs en le catabolisant en acides biliaires ou en l'effluant dans la lumière des canaux biliaires. La sécrétion biliaire du cholestérol occupe une position essentielle pour le transport inverse du cholestérol³⁵⁶. ABCA1, ABCG5 et ABCG8 sont exprimés dans le foie où ils éliminent le cholestérol dans la bile³⁵⁷. Les LXRs régulent l'expression de ces trois transporteurs dans les hépatocytes mais seuls ABCG5 et ABCG8 sont importants pour l'élimination biliaire du cholestérol après activation des LXRs^{344, 357-359}. La catabolisation du cholestérol en acides biliaires fait intervenir plusieurs enzymes parmi lesquelles CYP7A1 catalyse la réaction limitante de cette voie catabolique. Chez des souris subissant une diète riche en cholestérol, les LXRs stimulent l'expression de CYP7A1 ce qui stimule la transformation du cholestérol en acides biliaires³⁵¹. Cela rend les souris particulièrement résistante à l'hypercholestérolémie provoquée par ce régime alimentaire. Chez l'Homme, les LXRs ne régulent pas l'expression de CYP7A1 à cause d'une perte de l'élément de réponse des LXRs dans le promoteur humain de CYP7A1, ce qui pourrait rendre l'Homme plus sensible à l'hypercholestérolémie causée par une alimentation riche en cholestérol par rapport aux rongeurs^{360, 361}.

2.1.4) La métabolisation des stérols

2.1.4.1) Oxydation des stérols

Dans l'organisme, la concentration des oxystérols est très fortement inférieure à celle du cholestérol. L'oxydation des stérols peut avoir lieu spontanément dans les cellules sous l'action d'espèces oxygénées réactives qui provoquent l'autoxydation du cholestérol.

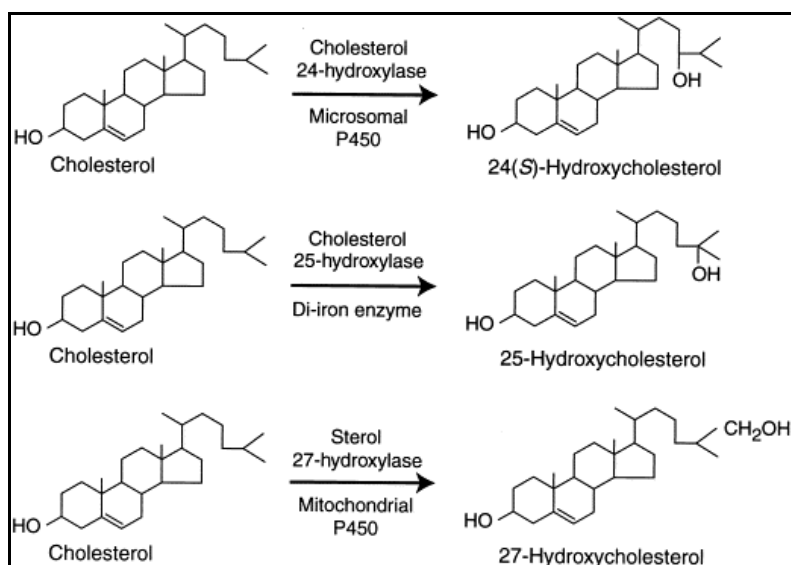


Figure 44 : Exemples d'oxydation enzymatique du cholestérol ³⁶². Les oxystérols peuvent être formés par l'autoxydation du cholestérol ou par l'oxydation enzymatique du cholestérol comme le montre cette illustration.

L'autoxydation des stérols a principalement lieu sur le cycle B du cholestérol sur le carbone 7 ce qui génère du 7-cétocholestérol ou du 7-hydroxycholestérol ¹¹⁸. L'oxydation des stérols peut être effectuée par des enzymes de la famille des cytochromes P450 (Figure 44). L'enzyme CYP3A4 produit du 4 β -hydroxycholestérol, CYP7A1 oxyde le cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol qui est un précurseur de la biosynthèse des acides biliaires, CYP46 est responsable de la production de 24(S)-hydroxycholestérol, CYP27A1 catalyse l'oxydation du cholestérol en 27-hydroxycholestérol et CYP11A1 produit le 20(S)-hydroxycholestérol et le 22(R)-hydroxycholestérol ³⁶³. En revanche, l'oxydation enzymatique du cholestérol en 25-hydroxycholestérol est catalysée par la 25-hydroxylase qui n'appartient pas à la famille des cytochromes P450. Comme nous l'avons vu dans la partie 2.1.2.2), la biosynthèse du 24,25-EC est particulière puisque cet oxystérol est produit au cours de la voie alternative de la cholestérogénèse ^{118, 331}. Plusieurs oxystérols comme le 24,25-EC ont la capacité d'inhiber la cholestérogénèse en provoquant la dégradation de l'HMGR par le protéasome ¹¹⁸. Des oxystérols inhibent la maturation des SREBPs ce qui conduit aussi à une inhibition de la cholestérogénèse. Enfin, les oxystérols sont des ligands des LXRs ce qui contribue à l'homéostasie des stérols dans la cellule. Cependant, la pertinence physiologique des mécanismes d'action des oxystérols actuellement décrits est ambiguë. En effet, les concentrations en oxystérols généralement utilisées pour décrire leurs rôles biologiques sont largement supérieures aux concentrations retrouvées dans les tissus et le plasma ^{118, 364}. Pour les LXRs, la majorité des études n'utilisent pas les oxystérols connus pour se lier et activer les LXRs. Des agonistes synthétiques de forte affinité pour ces récepteurs, tels que le T0901317 et le GW3965 leur sont préférés. Cependant, les activités décrites avec les ligands synthétiques ne reflètent peut-être pas les activités des oxystérols sur les LXRs aux concentrations physiologiques auxquelles ils sont retrouvés. Une étude a montré que des oxystérols sont des modulateurs des LXRs en surexprimant la sulfotransferase SULT2B1 qui sulfate les stérols en C3 ce qui, d'après les auteurs, inactive les oxystérols vis-à-vis des LXRs ²⁶³. Sa surexpression empêche l'activation des LXRs par le 24,25-EC mais pas par le T0901317 qui, contrairement au 24,25-EC, n'est pas sulfaté par SULT2B1. Les auteurs ont ensuite utilisé un modèle de souris qui ne produit pas de 24(S)-hydroxycholestérol, du 25-hydroxycholestérol ni du 27-hydroxycholestérol, des ligands des LXRs, à cause d'une inactivation génétique des enzymes produisant ces oxystérols à partir du cholestérol. Dans ce modèle, contrairement au modèle de souris sauvage, une alimentation riche en cholestérol

n'active pas tous les gènes cibles des LXR_s testés ce qui suggère que les oxystérols dont la production est inactivée font partie des activateurs des LXR_s *in vivo*²⁶³. Peu d'enzymes produisant des oxystérols ont été décrites pour être sous le contrôle des LXR_s : CYP7A1 qui génère un précurseur des acides biliaires, le 7 α -hydroxycholestérol, et CYP27 qui produit le 27-hydroxycholestérol qui est un ligand des LXR_s³⁶⁵. L'intérêt d'étudier les régulations possibles par les LXR_s d'autres enzymes qui oxydent le cholestérol ou d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif est fort puisque ces enzymes pourraient contribuer à une régulation pré-récepteur des LXR_s. Leur régulation par les LXR_s pourrait constituer un rétrocontrôle de l'activité de ces récepteurs.

2.1.4.2) Estérfication des stérols

Les stérols sont estérifiés par les enzymes ACATs (Acyl-coenzyme A : Cholestérol Acyltransférase 1) qui sont localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'estérfication des stérols génère des gouttelettes lipidiques dans la cellule qui sont des vésicules contenant des esters de cholestérol. Les stérols sont estérifiés sur la fonction alcool en C3 par l'enzyme ACAT1 exprimée dans de nombreux tissus et l'enzyme ACAT2 exprimée spécifiquement dans le foie et l'intestin. Ces enzymes greffent un acide gras insaturé comme l'acide oléique sur les stérols³⁶⁶. L'enzyme Stearoyl CoA Desaturase 1 (SCD1) catalyse une insaturation en C9 sur les acides gras ce qui permet la formation d'acide oléique et d'acide linoléique. Une perte de cette enzyme provoque une incapacité à former des esters de cholestérol ce qui montre que l'insaturation des acides gras est essentielle à l'estérfication du cholestérol³¹⁷.

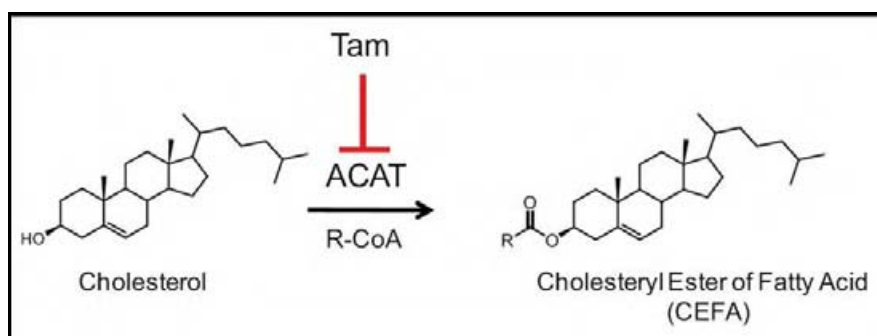


Figure 45 : Inhibition de l'estérfication du cholestérol par le tamoxifène¹¹⁵. L'enzyme d'estérfication du cholestérol ACAT (Acyl CoA : Acyl cholesterol Transferase) est une cible du Tam (tamoxifène) qui inhibe son activité enzymatique.

Le tamoxifène partage un pharmacophore commun avec le Sah-58035 qui est un inhibiteur des ACATs³⁶⁷. Cette homologie structurale conduit à une pharmacologie commune entre ces deux molécules puisque le tamoxifène qui est un SERM est capable d'inhiber ACAT et par

conséquent l'estérification du cholestérol (Figure 45)³⁶⁷, alors que le Sah-58035 qui est un inhibiteur des ACATs est un agoniste du récepteur des oestrogènes³⁶⁸. L'inhibition de l'estérification du cholestérol par le tamoxifène pourrait expliquer ses effets athéroprotecteurs. En effet, l'accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages les transforme en cellules spumeuses qui sont responsables de la formation de la plaque athéromateuse³⁶⁷. Les esters de cholestérol sont retransformés en cholestérol par des Cholesteryl Ester Hydrolases (CEH) et cette transformation est nécessaire pour l'efflux de cholestérol par les ABC transporteurs de la cellule³⁶⁹. Les esters de cholestérol n'ont jamais été décrits comme des ligands des LXRs. La fonction alcool en C3 est importante à la liaison des oxystérols sur les LXRs¹⁵⁴. L'estérification engage cette fonction alcool avec un acide gras ce qui suggère que les esters de cholestérol ne peuvent pas se lier aux LXRs. L'estérification pourrait être un moyen d'inactiver des ligands potentiels des LXRs ou d'empêcher la génération de ligands des LXRs mais jusqu'à présent cela n'a pas été étudié. Actuellement, c'est la sulfatation des oxystérols qui est considérée comme un moyen d'inactivation des ligands naturels des LXRs^{263, 264}.

2.1.4.3) Sulfatation des stérols

Les stérols peuvent être sulfatés sur leur hydroxyle en C3 par des Stéroïdes Sulfotransférases (SULT) qui sont localisées dans le cytosol. Certains oxystérols peuvent être sulfatés sur un autre hydroxyle comme c'est le cas du 24-hydroxycholestérol qui peut être sulfaté en C3, en C24 ou sur les deux carbones ce qui forme un oxystérol disulfate²⁶¹. La stéroïde sulfotransférase SULT2B1 sulfate le cholestérol mais aussi des oxystérols tels que le cholestérol-5,6-époxyde et le 25-hydroxycholestérol³⁷⁰. Dans la littérature, il a été montré que les LXRs contrôlent l'expression de SULT2B1³⁷¹ ce qui permettrait d'inhiber physiologiquement l'activation des LXRs par des oxystérols en les sulfatant et ainsi établir un rétrocontrôle négatif des LXRs. En effet, la sulfatation des oxystérols est considérée comme étant inactivatrice des ligands naturels des LXRs^{263, 264}. Cependant, la modulation des LXRs par des sulfates d'oxystérols a été décrite par plusieurs groupes qui montrent que ces oxystérols agissent comme des antagonistes sur les LXRs malgré l'absence de démonstration d'une liaison directe de ces sulfates d'oxystérols sur les LXRs^{258, 260, 261}. Cela suggère que la sulfatation des oxystérols ne les inactive pas mais plutôt change leur classe pharmacologique : les oxystérols sont des agonistes partiels des LXRs alors que leurs analogues sulfatés sont des antagonistes. La sulfatation des oxystérols pourrait donc avoir un rôle physiologique important via les LXRs autre qu'une simple inactivation des ligands des LXRs. La sulfatation

ne peut pas se faire sur les esters de stérols étant donné que l'estérification des stérols est aussi effectuée en C3, ce qui veut dire que l'estérification ou la sulfatation sont mutuellement exclusives. Toutefois, l'existence d'un oxystérol sulfaté sur un autre hydroxyle que celui en C3, comme le 24-hydroxycholestérol-24-sulfate, n'exclut pas qu'il soit estérifié en C3 mais cela reste à montrer. Les sulfates de stérols peuvent être désulfatés par les Stéroïde Sulfatases (STS) qui effectuent l'action inverse des SULTs ³⁷². L'activité de ces deux familles d'enzymes détermine le rapport entre les formes sulfatées et non sulfatées de stéroïdes ce qui permet de réguler leur activité biologique. La sulfatation des stéroïdes est généralement associée à leur inactivation, comme c'est le cas pour la sulfatation des oestrogènes qui les inactivent vis-à-vis du récepteur des oestrogènes. Par conséquent, la désulfatation est un moyen d'activer des stéroïdes sulfates présents dans la cellule. Par exemple, une suractivation de STS dans des cellules oestrogéno-dépendantes est associée à une stimulation de la signalisation des oestrogènes grâce à la désulfatation des oestrogènes sulfates ³⁷³. Cela est aussi le cas pour les androgènes et la signalisation androgénique. L'action des STS sur les cellules hormono-dépendantes a une relevance pharmacologique puisqu'elle motive le développement d'inhibiteurs de STS utilisés en thérapie anti-cancéreuse contre des cancers hormono-dépendants ³⁷³. Le rôle des STS sur la signalisation des LXRn n'a jamais été regardé, pourtant sa caractérisation serait complémentaire de la mise en évidence du rôle de SULT2B1 in vivo sur l'activité des LXRn ²⁶³. Cependant, il faudrait d'abord établir si la STS est impliquée dans la désulfatation des oxystérols sulfatés.

2.1.5) Métabolisme des hormones stéroïdiennes

2.1.5.1) La stéroïdogénèse

La signalisation endocrinienne régulée par les hormones stéroïdiennes est essentielle au cours du développement et pour l'homéostasie en général. La synthèse des hormones stéroïdiennes s'appelle la stéroïdogénèse et elle a lieu dans les tissus stéroïdogéniques c'est-à-dire principalement dans les gonades et la glande adrénale (Figure 46) ³⁷⁴.

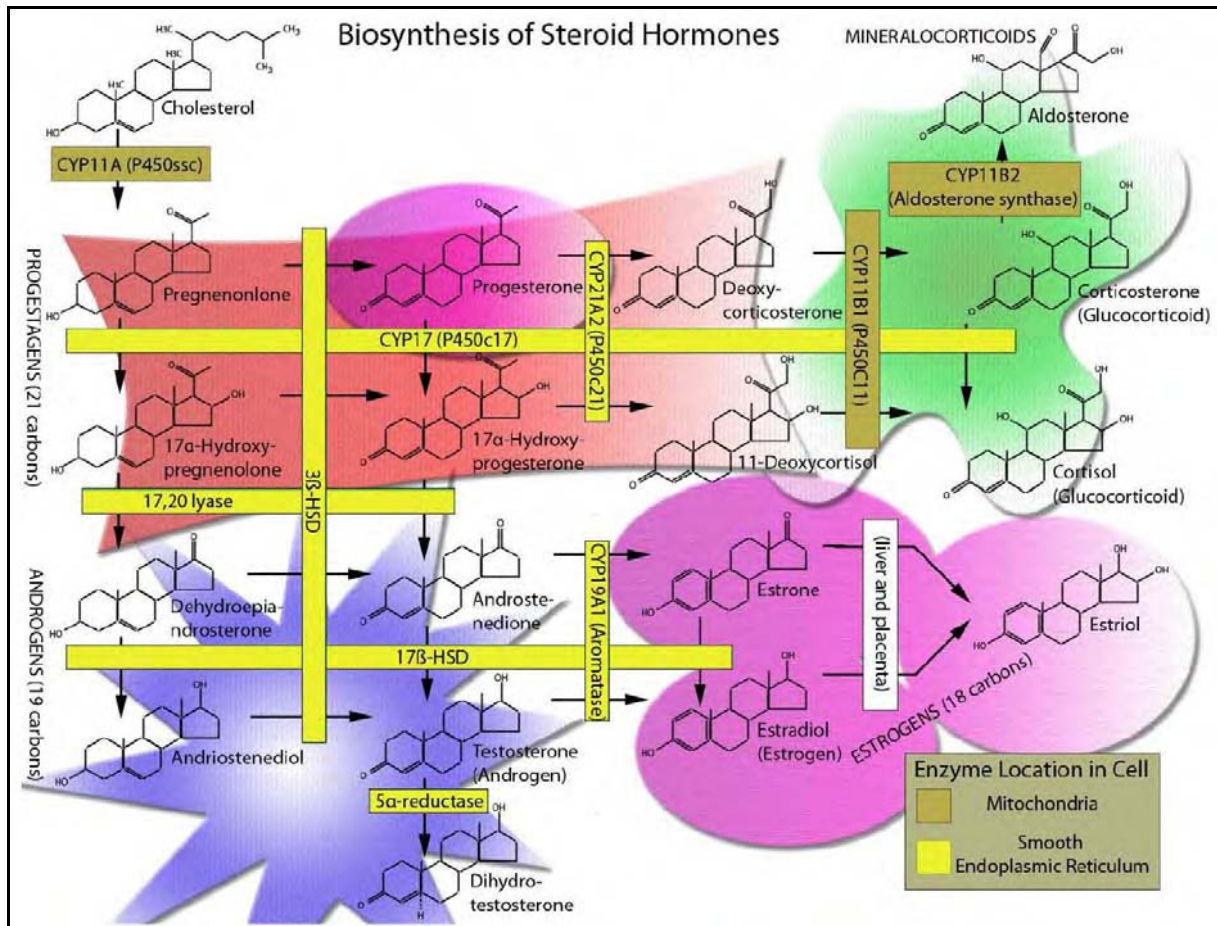


Figure 46 : La stéroïdogénèse ³⁷⁴. La stéroïdogénèse est responsable de la production des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol. Parmi ces hormones, on compte la progestérone, les androgènes, les oestrogènes, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. CYP : Cytochrome ; HSD : HydroxySteroid Deshydrogenase ; P450_{ssc} : Cytochrome P450 side chain cleavage.

Cinq classes d'hormones stéroïdiennes existent : les androgènes (testostérone), les oestrogènes (oestradiol), la progestérone, les glucocorticoïdes (cortisol) et les minéralocorticoïdes (aldostérone). Ces hormones sont capables d'activer leurs récepteurs nucléaires respectifs : le récepteur des androgènes (AR), le récepteur des oestrogènes (ER), le récepteur de la progestérone (PR), le récepteur des glucocorticoïdes (GR), et le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) ^{162, 375}. Le cholestérol sert à la synthèse des hormones stéroïdiennes, le métabolisme du cholestérol des tissus stéroïdogéniques est donc adapté à cette activité de biosynthèse. Le cholestérol nécessaire à la stéroïdogénèse provient de plusieurs sources. La première source est la cholestérogénèse dans le réticulum endoplasmique. La cellule peut aussi mobiliser ses réserves de cholestérol en hydrolysant les esters de cholestérol des gouttelettes lipidiques grâce à l'action de CEHs. Les cellules des tissus stéroïdogéniques sont capables de capter des LDLs ainsi que des HDLs puisqu'elles expriment le LDLR et le SR-BI qui apportent du cholestérol provenant du foie via les LDLs

mais aussi provenant du transport inverse du cholestérol via les HDLs ³⁷⁴. La première étape de la stéroïdogénèse est effectuée dans la mitochondrie qui est un organite contenant peu de cholestérol. Le cholestérol est apporté au niveau de la membrane interne mitochondriale grâce à la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) qui est impliquée dans le transport du cholestérol de la membrane externe mitochondriale à la membrane interne ²⁹⁹. Dans la membrane interne mitochondriale, l'enzyme CYP11A1 ou P450SCC (P450 Side Chain Cleavage) catalyse la première réaction de la stéroïdogénèse qui est aussi l'étape limitante de la stéroïdogénèse et elle génère la pregnenolone à partir du cholestérol en clivant sa chaîne latérale ³⁰⁰. La pregnenolone est le précurseur des hormones stéroïdiennes qui sont synthétisées sous l'action d'enzymes présentes dans le réticulum endoplasmique lisse, et dans la mitochondrie pour la synthèse des corticostéroïdes (glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes) ³⁷⁴.

2.1.5.2) Régulation du métabolisme des hormones stéroïdiennes

La biosynthèse des hormones stéroïdiennes est principalement régulée par des hormones peptidiques. La corticotrophine (ACTH : adrenocorticotrop hormone) stimule la production de corticostéroïdes, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) contrôle la biosynthèse de la progestérone et des oestrogènes et l'hormone lutéinisante (LH) régule la biosynthèse de la progestérone et des androgènes dans des cellules stéroïdogéniques spécialisées ³⁷⁴. La métabolisation des hormones stéroïdiennes est aussi un moyen de contrôler leur activité (Figure 47). Par exemple, la sulfatation des stéroïdes est fréquemment utilisée pour les inactiver comme nous l'avons vu dans la partie 2.1.4.3). Les oestrogènes peuvent être sulfatés par l'oestrogène sulfotransférase (EST ou SULT1E1) qui les inactive ³⁷⁶, et les androgènes sont sulfatés par SULT2A1, ce qui les inactive aussi ³⁷⁷. D'autres enzymes provoquent des modifications structurales mineures qui inactivent les hormones stéroïdiennes, comme c'est le cas de la 11 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase type 2 (HSD11B2) qui convertit le cortisol, qui est un agoniste de GR, en cortisone chez l'homme ou en corticostérone chez la souris, qui sont des glucocorticoïdes inactifs vis-à-vis de GR. Le transporteur StAR est une cible majeure de la réponse stéroïdogénique aiguë provoquée par des hormones peptidiques qui induisent une forte expression de la protéine StAR pour stimuler rapidement la production d'hormones stéroïdiennes ³⁷⁸.

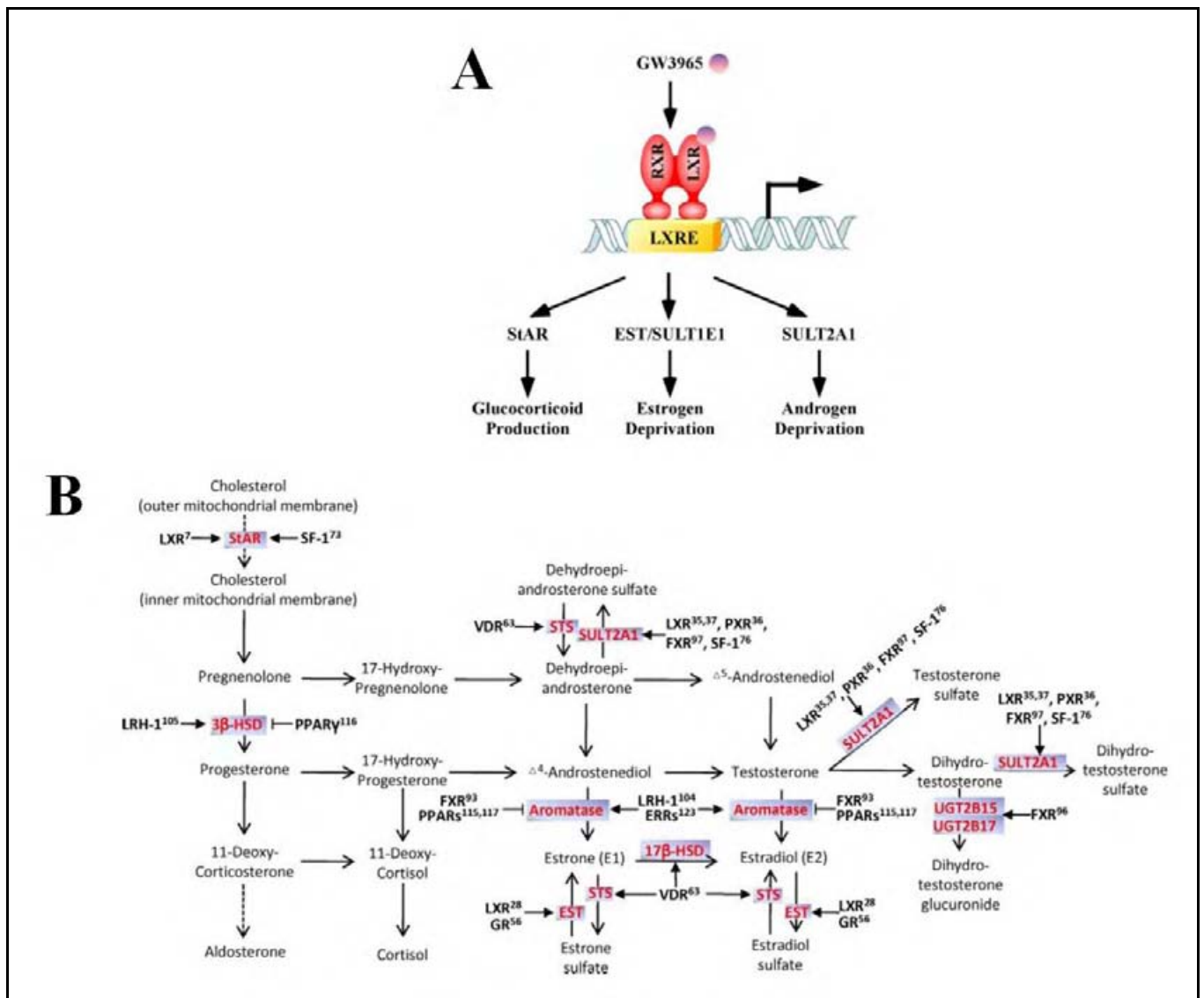


Figure 47 : Régulation du métabolisme des hormones stéroïdiennes par les LXRs (A) et par des récepteurs nucléaires (B) ³⁷⁹. Les récepteurs nucléaires contrôlent le métabolisme des hormones stéroïdiennes, ce qui constitue aussi un contrôle de l'activité des récepteurs nucléaires qui lie des hormones stéroïdiennes, leurs précurseurs ou leurs dérivés. StAR : Steroidogenic Acute Regulatory ; EST : Estrogen Sulfotransferase ; SULT : Steroid Sulfotransferase ; HSD : HydroxySteroid Deshydrogenase ; STS : Steroid Sulfatase.

Cummins *et al.* a montré que le T0901317, un agoniste synthétique pur des LXRs, augmente in vivo la synthèse de glucocorticoïdes par la glande adrénale. Le T0901317 stimule l'expression de StAR, CYP11A1 et la 3β-Hydroxystéroïde Déshydrogénase (3β-HSD) responsables de la synthèse d'hormones stéroïdiennes, et StAR est un gène cible de LXRα ³⁸⁰. Une étude de Nilsson *et al.* a montré des résultats contraires sur des cellules humaines de la glande adrénale en culture où un traitement par le GW3965, un agoniste partiel des LXRs, inhibe la stéroïdogénèse ³⁸¹. Cette différence pourrait être due au fait que Cummins *et al.* ont utilisé le T0901317 sur des animaux et sur des cellules de la glande adrénale en culture, alors que Nilsson *et al.* ont traité les cellules de la glande adrénale avec le GW3965. Le T0901317

et le GW3965 ont une pharmacologie différente puisque le premier est un agoniste pur alors que le deuxième est un agoniste partiel. Ils n'induisent pas le même profil transcriptionnel à cause d'une différence au niveau du recrutement des corégulateurs transcriptionnels²⁷⁷ qui peut expliquer la stimulation de l'expression de StAR par le T0901317 contrairement au GW3965 qui l'inhibe. Aussi, Cummins *et al.* utilisent des cellules adrénales de souris alors que Nilsson *et al.* observent leurs effets sur des cellules adrénales humaines, la différence entre les deux études peut donc être expliquée par des divergences entre l'Homme et la souris³⁷⁹. Nilsson *et al.* montrent aussi que le GW3965 et le T0901317 inhibent l'expression de HSD11B1 dans la glande pituitaire qui est responsable de l'activation du GR en produisant le cortisol. L'activation de GR réprime l'expression de l'ACTH dans la glande pituitaire qui est responsable de l'activation de la stéroïdogénèse dans la glande adrénales. HSD11B1 participe donc à un rétrocontrôle négatif de la stéroïdogénèse dans la glande adrénales par la glande pituitaire en inhibant la production d'ACTH. Par conséquent, la répression de HSD11B1 par l'activation des LXR_s inhibe ce rétrocontrôle négatif et augmente le taux d'ACTH ce qui pourrait stimuler la stéroïdogénèse de la glande adrénales mais cela n'a pas été testé *in vivo*, et le comparatif entre GW3965 et T0901317 n'a été effectué qu'au niveau de la glande pituitaire où les deux molécules ont les mêmes effets³⁸¹. Une étude a montré que l'activation des LXR_s par le T0901317 stimule l'expression de la proopiomelanocortine qui est un précurseur de l'ACTH et qui est un gène cible des LXR_s, ce qui pourrait participer à l'augmentation du taux d'ACTH³⁸².

Les LXR_s régulent des enzymes qui métabolisent les hormones stéroïdiennes ou leur précurseur (Figure 47). L'enzyme HSD11B1 active indirectement GR en transformant la cortisone ou corticostérone en cortisol qui est le ligand de GR. L'activation des LXR_s inhibe l'expression de HSD11B1 ce qui affecte la signalisation des glucocorticoïdes en empêchant la formation de cortisol²¹¹. Les LXR_s réguleraient aussi des enzymes de la stéroïdogénèse telles que HSD17B2 qui est inhibée par le T0901317 et HSD17B5 qui est activée par le T0901317³⁸³. Cependant dans cette étude les auteurs n'ont testé que le T0901317 à une concentration de 10 µM à laquelle il est capable d'activer d'autres récepteurs nucléaires comme PXR, FXR, ROR et AR. En l'état actuel, ces régulations ne peuvent pas être assignées aux LXR_s sans tests supplémentaires plus spécifiques des LXR_s. En revanche, il a été clairement établi que les LXR_s régulent l'expression de la 3β-Hydroxystéroïde Déshydrogénase (3β-HSD ou AKR1C4) qui est responsable de l'inactivation des hormones stéroïdiennes dans le foie en les réduisant en 3β-hydroxystéroïdes, puisque les hormones stéroïdiennes sont des 3β-

céto-stéroïdes³⁸⁴. Le T0901317 active l'expression d'AKR1C4 et cela est dépendant de l'expression de LXR α ce qui montre que l'effet du T0901317 est bien dépendant des LXRs. Les LXRs contrôlent l'expression d'EST (SULT1E1) qui est responsable de l'inactivation de l'oestradiol en le sulfatant. L'activation des LXRs inhibe la prolifération oestrogéno-dépendante de cellules épithéliales utérines. La régulation d'EST par les LXRs a lieu dans le foie qui métabolise les oestrogènes et les inactive grâce à l'action d'EST²⁰⁹. La sulfotransférase SULT2A1 est responsable de la détoxification des acides biliaires ainsi que de l'inactivation des androgènes en les sulfatant. Les LXRs contrôlent l'expression de SULT2A1³⁸⁵. Une activation génétique ou pharmacologique des LXRs active son expression ce qui conduit à une déprivation en androgènes causée par leur sulfatation par SULT2A1³⁸⁶. En parallèle, les LXRs inhibent l'expression de la Stéroïde Sulfatase (STS) qui est responsable de la réactivation des androgènes en les désulfatant. L'inhibition de STS empêche les cellules de la prostate de réactiver les androgènes inactivés par SULT2A1. In vivo, l'activation des LXRs cause une déprivation en androgène qui empêche la régénération de la prostate, ce qui montre que ce mécanisme a une pertinence physiologique.

2.2) Contrôle du métabolisme lipidique

Lors de la découverte et de la caractérisation du T0901317, les auteurs ont montré que les LXRs sont des activateurs de la lipogénèse in vivo (Figure 48)²⁵³. Le T0901317 active l'expression de SREBP-1c qui est un facteur de transcription primordial dans le contrôle de la lipogénèse. Les LXRs régulent directement l'expression de SREBP-1c en se fixant à deux LXREs présents dans le promoteur de SREBP-1c³⁸⁷. Une alimentation riche en cholestérol provoque une stimulation de l'expression de SREBP-1c par les LXRs³⁸⁸. L'activation basale des LXRs est nécessaire à l'expression de SREBP-1c puisque lorsque la synthèse de cholestérol est inhibée au niveau de l'HMGCR, l'expression de SREBP-1c est fortement diminuée. Son expression est rétabli par l'ajout de mévalonate, de 22(R)-hydroxycholestérol ou de T0901317, ce qui montre que la production de ligands endogènes des LXRs est nécessaire à l'expression de SREBP-1c³⁸⁹.

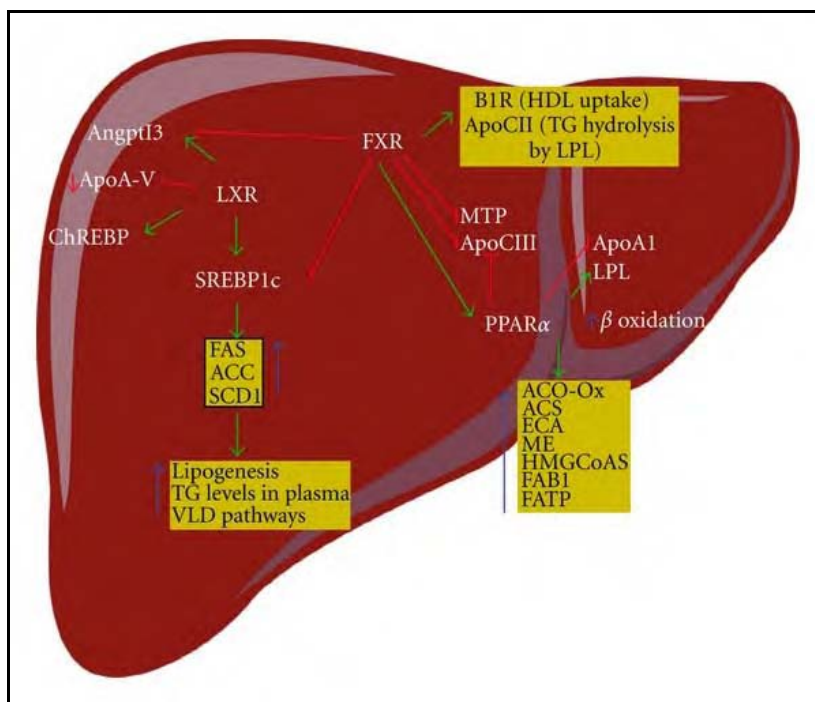


Figure 48 : Régulation de la lipogenèse par les LXRs ³⁹⁰. Les LXRs régulent la lipogenèse dans le foie en augmentant la production d'acide gras ce qui conduit à une augmentation du taux de triglycérides plasmatique. Les récepteurs FXR et PPAR ont une action opposée aux LXRs dans le foie en augmentant le catabolisme des acides gras par la β -oxydation. LXR : Liver X Receptor ; SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c ; FAS : Fatty Acid Synthase ; ACC : Acetyl CoA Carboxylase ; SCD1 : Stearoyl CoA Desaturase ; FXR : Farnesoid X Receptor ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; TG : Triglycérider.

Cela a été confirmé par l'inactivation génétique des LXRs qui provoque une absence d'expression de SREBP-1c ^{253, 391}. Aussi, la stimulation de l'expression de SREBP-1c par l'insuline est dépendante des LXRs ²⁷⁰. Récemment, un microARN (miRNA) régulant l'expression de LXR α humain a été découvert. Il s'agit de hsa-miR-613 qui se lie à une région en 3'-UTR (3'-Untranslated Region) de l'ARNm de LXR α et qui inhibe son expression. L'expression de hsa-miR-613 est directement stimulée par SREBP-1c ce qui suggère un rétrocontrôle négatif de la stimulation de la lipogenèse induite par LXR α par l'extinction de son expression ³⁹². SREBP-1c contrôle l'expression de gènes lipogéniques comme l'acétyl coA carboxylase (ACC) qui permet la formation de malonyl coA, qui est le précurseur des acides gras, à partir d'acétyl coA, et l'acide gras synthase (FASN : Fatty Acid Synthase) qui est responsable de la synthèse de palmitate à partir de malonyl coA. L'expression d'ACC et de FASN est aussi sous le contrôle des LXRs ce qui consolide le contrôle de la lipogenèse par les LXRs ^{393, 394}. Une étude récente a montré que MIG12 (Midline-1-Interacting G12-like protein), qui est un partenaire protéique et un activateur d'ACC, est sous le contrôle des LXRs. L'extinction de MIG12 diminue la néosynthèse d'acide gras par des agonistes des LXRs ce qui montre que l'activation de MIG12 participe aux effets lipogéniques des LXRs ³⁹⁵. L'augmentation de la lipogenèse causée par l'activation des LXRs cause une

augmentation de la production de VLDL³⁹⁶ qui sont des particules lipoprotéiques riches en triglycérides, et les agonistes des LXR_s provoquent une hypertriglycéridémie chez l'animal^{253, 396}. Des gènes sous le contrôle des LXR_s ont été identifiés pour être responsables de l'hypertriglycéridémie causée par les agonistes des LXR_s. L'angiopoïétine-like 3 (Angptl-3) est un régulateur important du métabolisme lipidique³⁹⁷ qui est sous le contrôle transcriptionnel des LXR_s³⁹⁸. Le traitement de souris Angptl-3^{-/-} par le T0901317 n'induit pas d'hypertriglycéridémie ce qui montre l'implication de ce gène dans l'hypertriglycéridémie causée par l'activation des LXR_s³⁹⁹. La Stéaroyl CoA Désaturase 1 (SCD1) est une enzyme qui catalyse une insaturation en C9 sur l'acide stéarique ce qui permet la production d'acide gras insaturés qui servent à estérifier le cholestérol ou à produire des triglycérides³¹⁷. SCD1 est un gène cible des LXR_s et une invalidation génétique de SCD1 empêche l'hypertriglycéridémie provoquée par le T0901317 chez l'animal⁴⁰⁰. Le rôle de SCD1 dans les effets des LXR_s semble important à plusieurs niveaux. L'activation des LXR_s induit une lipogenèse forte, ce qui se traduit par une forte production d'acide palmitique. L'accumulation d'acide palmitique est toxique pour la cellule, et son insaturation par SCD1 permet de lever cette toxicité^{401, 402} ce qui pourrait permettre aux LXR_s de stimuler la lipogenèse sans menacer la survie des cellules affectées. Les LXR_s diminuent aussi la toxicité lipidique en augmentant l'expression d'AKR1B7 qui empêche la peroxydation des lipides⁴⁰³. Les SCDs permettent aussi l'estérification du cholestérol par des acides gras insaturés comme l'acide oléique, et une inhibition des SCDs provoque une hypercholestérolémie chez l'animal alimenté avec une diète riche en cholestérol. D'après les auteurs, l'hypercholestérolémie observée est due à une incapacité à stocker le cholestérol sous forme d'esters ce qui conduit à une augmentation du taux de cholestérol libre circulant⁴⁰⁴. La stimulation de SCD1 par les LXR_s en réponse à une alimentation riche en cholestérol pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie du cholestérol par les LXR_s dans l'organisme. Les LXR_s et les PPAR_s ont un effet inverse sur le métabolisme lipidique : les LXR_s stimulent la lipogenèse alors que les PPAR_s activent le catabolisme des lipides. Ces deux types de récepteurs nucléaires effectuent un cross-talk mutuellement inhibiteur dans lequel l'activation des LXR_s inhibe l'expression des gènes du catabolisme lipidique sous le contrôle des PPAR_s alors que l'activation des PPAR_s inhibe l'expression de SREBP-1c qui est régulé par les LXR_s^{219, 220}. Les souris LXR^{-/-}, sont résistantes à l'obésité induite par une alimentation riche en lipides et en cholestérol⁴⁰⁵. Cela ne provient pas de leur incapacité à stimuler l'expression de SREBP-1c puisque des souris SREBP-1c^{-/-} ne sont pas résistantes à l'obésité. En revanche, dans les souris LXR^{-/-}, le catabolisme des lipides est fortement activé grâce à une augmentation de l'expression d'UCP-

2 (Uncoupling Protein 2) qui active la dépense énergétique. L'expression d'UCP-2 permet une élimination catabolique des lipides provenant de l'alimentation et explique pourquoi ces souris sont résistantes à l'obésité. Par conséquent, les LXR α contrôlent aussi la dépense énergétique, il pourrait donc être des cibles pharmacologiques à étudier pour lutter contre l'obésité.

2.3) Contrôle du métabolisme glucidique

En accord avec leur implication dans la régulation de la dépense énergétique, les LXR α sont aussi impliqués dans le contrôle du métabolisme glucidique (Figure 49). Dans un modèle de souris insulino-résistante, le GW3965 diminue dans le foie l'expression de gènes qui participent à la néoglucogenèse comme la PhosphoEnolPyruvate Kinase (PEPCK), le coactivateur PGC-1 α et la glucose-6-Phosphatase⁴⁰⁶. Il a été montré dans une autre étude que la régulation de la glucose-6-phosphatase par les LXR α est indirecte⁴⁰⁷. L'inhibition de la néoglucogenèse par l'activation des LXR α contribue à limiter le taux de glucose sanguin en diminuant la libération de glucose provenant du foie dans la circulation sanguine. Dans le tissu adipeux, le GW3965 stimule l'expression du transporteur de glucose GLUT4 qui est responsable de l'entrée de glucose dans les adipocytes et qui est sous le contrôle direct des LXR α ^{406, 408}. Cela permet aussi de diminuer la concentration en glucose sanguin en favorisant son transport de la circulation sanguine vers le tissu adipeux⁴⁰⁶. Un autre groupe a obtenu des résultats similaires avec le T0901317 ce qui suggère que les LXR α pourraient être des cibles pharmacologiques intéressantes pour le traitement du diabète⁴⁰⁹. Le T0901317 stimule l'entrée de glucose dans les cellules musculaires squelettiques en activant l'expression de GLUT4 et GLUT1, et l'oxydation du glucose est aussi stimulée avec une augmentation de l'expression d'UCP-2 et UCP-3 impliqués dans la dépense énergétique. La stimulation par les LXR α de l'utilisation du glucose par les muscles squelettiques peut aussi contribuer à la diminution du taux de glucose sanguin⁴¹⁰. Aussi, le T0901317 est capable de stimuler la sécrétion d'insuline dépendante du glucose dans les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas⁴¹¹. Les LXR α semblent importants dans l'homéostasie du glucose d'autant plus que le glucose stimule l'expression de LXR β par le biais des facteurs de transcriptions mitogènes Elk1 et SRF (Serum Responsive Factor) qui se lient au promoteur de LXR β et activent son expression⁴¹². De plus, l'activation des LXR α stimule directement l'expression de la protéine ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) qui est un facteur de transcription impliquée dans la réponse au glucose⁴¹³. Cependant, Denechaud *et al.* ont montré *in vivo* que l'activation des LXR α n'est pas essentielle pour l'induction de

l'expression de gènes de réponse au glucose tels que des gènes lipogéniques pour le stockage énergétique ou des gènes de la glycolyse tels que la pyruvate kinase ⁴¹⁴. En revanche, l'expression de ChREBP est suffisante et essentielle pour la réponse au glucose.

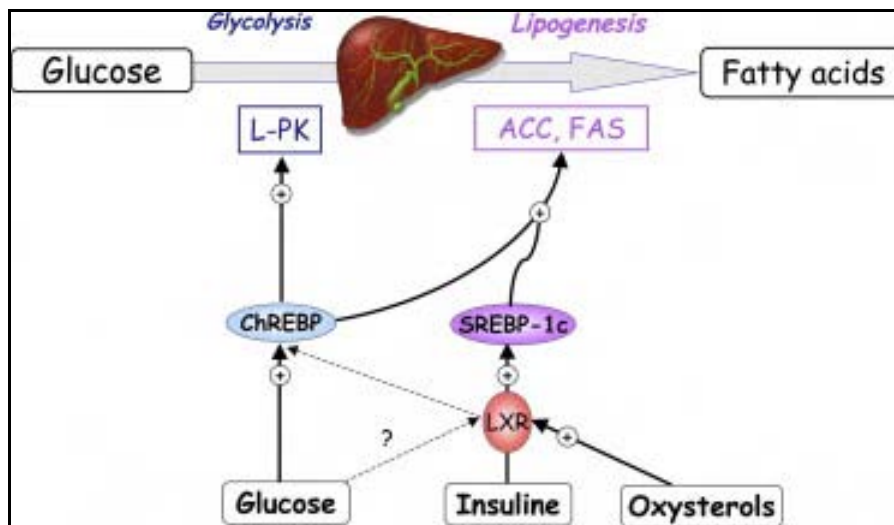


Figure 49 : Régulation du métabolisme glucidique par les LXRs ⁴¹⁵. Les LXRs (Liver X Receptor) régulent le métabolisme glucidique en régulant l'expression de la protéine de liaison à l'élément de réponse au glucose (ChREBP : Carbohydrate Response Element Binding Protein). Aussi, la régulation de l'expression de SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) par l'insuline nécessite LXR. Actuellement, la régulation de ce métabolisme par la liaison directe du glucose aux LXRs n'est pas claire. L-PK : L-type Pyruvate Kinase ; ACC : Acetyl CoA Carboxylase ; FAS : Fatty Acid Synthase.

Il a été montré dans une étude de Mitro *et al.*, désormais controversée par Denechaud *et al.*, que le glucose est un ligand des LXRs avec une affinité de l'ordre du millimolaire qui correspond aux concentrations physiologiques du glucose ⁴¹⁶. Denechaud *et al.* ont effectué une analyse du recrutement de corégulateurs transcriptionnels par les LXRs et n'ont pas vu de recrutement de corégulateur en présence de glucose ce qui infirme que le glucose soit un ligand des LXRs ⁴¹⁴. L'absence de démonstration d'un rôle physiologique de la liaison du glucose aux LXRs depuis la publication de l'étude de Mitro *et al.* ainsi que sa controverse remet en question sa pertinence et sa validité physiologique ²⁹⁵. Malgré cela, la régulation pharmacologique du métabolisme glucidique par les LXRs peut permettre le développement d'agents pharmacologiques qui ciblent les LXRs pour le traitement du diabète de type 2 ⁴¹⁷.

2.4) Contrôle du système immunitaire

2.4.1) Contrôle de l'immunité innée par les LXR

En 2003, le groupe de Peter Tontonoz établit pour la première fois un lien entre les LXR et la régulation du système immunitaire (Figure 50). Il montre que le GW3965 est capable d'inhiber l'induction de l'expression de gènes pro-inflammatoires par le lipopolysaccharide, qui est une molécule de la paroi des bactéries Gram – qui active l'immunité innée. In vivo, l'activation des LXRs par le GW3965 réduit l'inflammation pathologique dans un modèle de dermatite et d'athérosclérose, ce qui suggère que les LXRs ont une action anti-inflammatoire¹⁹⁴. La régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation par les LXRs est indirecte puisque ces gènes ne possèdent pas de LXRE dans leur promoteur. Les LXRs inhibent l'activation de ces gènes en effectuant un cross-talk avec NF- κ B en empêchant la libération des corépresseurs liés à NF- κ B sur le promoteur de gènes de l'inflammation^{194, 195}. Les LXRs inhibent aussi l'inflammation en transréprimant STAT1 par un mécanisme analogue à la transrépression de NF- κ B¹⁹⁶.

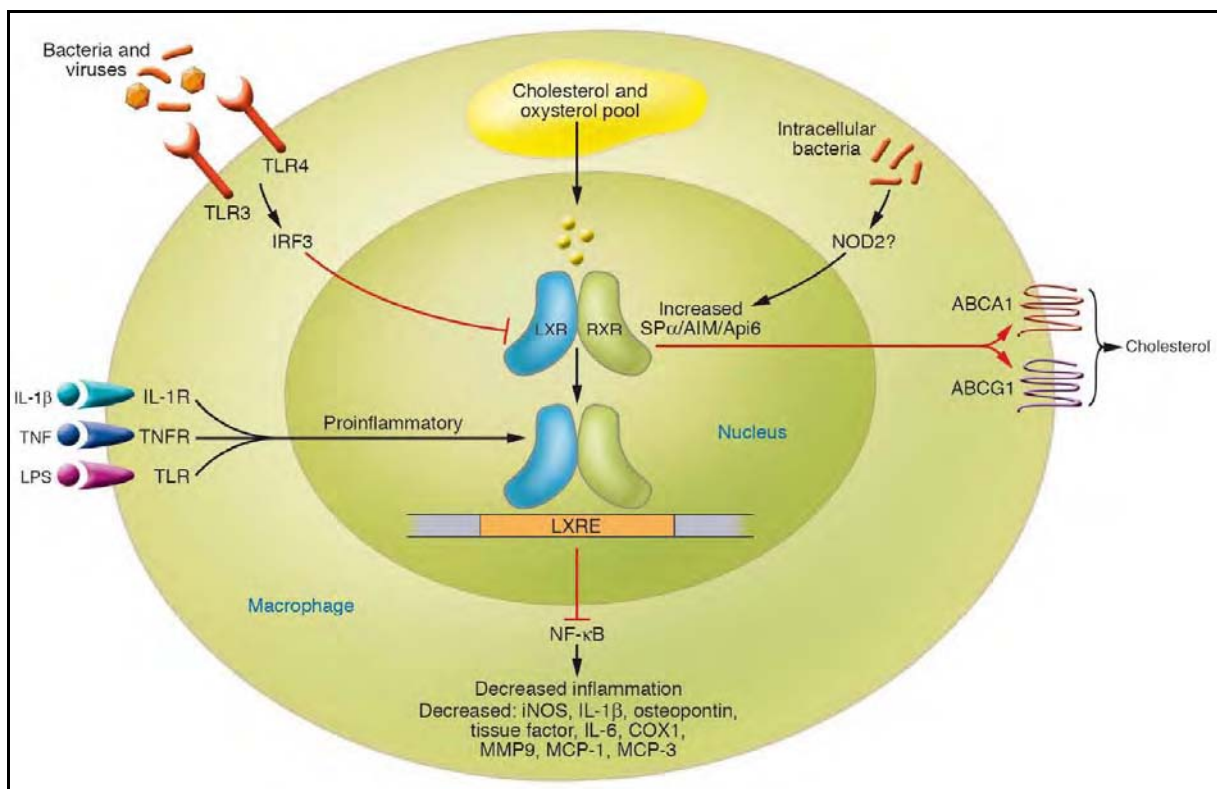


Figure 50 : L'inflammation et les LXRs¹⁶⁰. Les LXRs empêchent l'expression de gènes inflammatoires induite par des signaux pro-inflammatoires. La signalisation inflammatoire qui passe par l'activation d'IRF3 (Interferon-Related Factor 3) inhibe l'activité des LXRs. TLR : Toll-Like Receptor ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; IL : Interleukin ; LPS : LipoPolySaccharide ; IRF3 : Interferon Related Factor 3 ; LXR : Liver X Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor ; NF- κ B : Nuclear Factor kappa B ; ABC : ATP-Binding Cassette transporter.

Les LXRs sont inhibés par certaines voies de signalisation de l'inflammation. L'activation des récepteurs Toll-Like (TLR : Toll-Like Receptor) TLR3 et TLR4 qui sont des récepteurs de molécules bactériennes et virales et qui induisent une réponse immunitaire innée, inhibent l'activation de gènes cibles des LXRs comme ABCA1 et ABCG1^{160, 201}. Les voies de signalisation activées par le TNF, IL-1 β et le LPS qui se lie à leur récepteur respectif TNFR, IL-1R et TLR ne sont pas capables d'inhiber l'activité transcriptionnelle des LXRs. TLR3 et TLR4 ont la particularité d'activer le facteur de transcription IRF-3 qui entre en compétition avec les LXRs pour le recrutement de coactivateurs, ce qui explique pourquoi l'activation des TLR3/4 inhibe les LXRs. Les gènes cibles des LXRs étant importants pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol, leur inhibition par l'activation de TLR3 et TLR4 expliquerait l'augmentation de l'incidence des maladies cardio-vasculaires par des infections bactériennes chroniques²⁰¹.

Plusieurs rôles des LXRs dans la régulation de l'immunité innée ont été caractérisés. L'expression des LXRs est essentielle à la fonctionnalité de l'immunité innée puisque des souris n'exprimant pas les LXRs sont très susceptibles à une infection par le bacille *Listeria monocytogenes*³¹⁰. Plus précisément, les LXRs sont essentiels à la survie des macrophages soumis à une infection par *L. monocytogenes* car ils permettent l'expression du facteur de survie SP α qui stimule la survie des macrophages lors d'une infection bactérienne⁴¹⁸. Cette étude a été confirmée par Valledor *et al.* qui ont montré que l'activation des LXRs augmente la survie des macrophages lors d'une infection par *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*¹²⁰. Les agonistes des LXRs inhibent la prolifération des macrophages en réprimant l'expression des cyclines B1 et D1 ainsi que des Cyclin-Dependent Kinases (CDK) 2 et 4 ce qui provoque le blocage des macrophages en phase G0/G1⁴¹⁹. L'activation des LXRs pourrait donc contribuer à la régulation de l'immunité innée en contrôlant le nombre de macrophages en plus de la transrépression des gènes pro-inflammatoires régulés par NF-kB. Les LXRs sont essentiels pour la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages⁴²⁰. Dans les macrophages, les LXRs activent l'expression de la tyrosine kinase Mer qui est nécessaire à la phagocytose des cellules apoptotiques. D'autre part, les LXRs inhibent la réponse inflammatoire qui est normalement activée par les macrophages lors de la phagocytose de corps étrangers. Les auteurs ont montré que les corps apoptotiques sont responsables de l'activation de Mer et de la répression des gènes pro-inflammatoires par les LXRs dans les macrophages. L'activation des LXRs dans les macrophages par les cellules apoptotiques permet une tolérance immunitaire qui pourrait

empêcher l'apparition de maladies auto-immunes puisque des souris dans lesquelles les LXRs sont inactivés développent des maladies auto-immunes. Les auteurs émettent l'hypothèse que les produits de dégradation des corps apoptotiques apportent des ligands des LXRs dans les macrophages qui activent les LXRs. Cela permettrait à l'immunité innée de discriminer les cellules apoptotiques, qui contiennent du cholestérol dans leur membrane et qui ne représentent pas de menace pour l'organisme, des bactéries qui ne possèdent pas de cholestérol dans leur membrane et qui peuvent causer une infection ⁴²⁰. Dans le cas des bactéries, probablement que leur phagocytose par les macrophages n'active pas les LXRs qui ne peuvent donc pas réprimer l'expression des gènes inflammatoires, ce qui permet l'activation de l'inflammation en réponse aux pathogènes.

2.4.2) Contrôle de l'immunité acquise par les LXRs

L'activation de lymphocytes T qui reconnaissent spécifiquement un antigène provoque leur multiplication grâce à la prolifération cellulaire : cela s'appelle l'expansion clonale. L'activation des lymphocytes T active l'enzyme SULT2B1 ce qui provoque l'inhibition des LXRs. Une invalidation de LXR β provoque une stimulation de la prolifération des lymphocytes, ce qui montre que LXR β a un rôle dans le contrôle de la prolifération lymphocytaire. L'activation de LXR β par un agoniste stimule l'efflux de stérols par ABCG1 qui est responsable d'une inhibition de la prolifération de lymphocytes T activés. La survie des lymphocytes T n'est pas affectée par l'activation des LXRs. Cet effet suggère qu'une diminution du cholestérol dans les lymphocytes empêche leur prolifération. Cela explique pourquoi l'activation des lymphocytes T active SULT2B1 qui métabolise les oxystérols endogènes ce qui les empêcheraient d'activer l'expression des gènes de l'efflux de cholestérol par le biais de LXR β ⁴²¹. L'inhibition des LXRs permettrait de maintenir le niveau de cholestérol adéquat dans les lymphocytes T pour que leur prolifération soit possible. Il serait intéressant d'étudier si ce mécanisme d'inactivation de LXR β lors de la prolifération cellulaire est spécifique aux lymphocytes T ou s'il est retrouvé dans d'autres types cellulaires. Un mécanisme analogue a été découvert dans les lymphoblastes et dans des cellules leucémiques lymphoblastiques où l'activation des LXRs par le T0901317 inhibe la prolifération de ces cellules induite par les cytokines IL-2 et IL-7. Dans les cellules leucémiques, l'activation des LXRs diminue leur survie contrairement aux lymphoblastes où la survie n'est pas affectée, et l'expression de LXR α est plus forte dans les cellules leucémiques lymphoblastiques que dans les lymphoblastes ⁴²². Les LXRs ont aussi un rôle dans les cellules dendritiques dans lesquelles des agonistes synthétiques empêche leur

maturation induite par le lipopolysaccharide. L'effet passe par une inhibition de l'expression de la fascine, qui est une protéine du cytosquelette impliquée dans la formation de la synapse immunologique qui permet l'activation des lymphocytes T par des cellules dendritiques matures ⁴²³. De façon générale, les agonistes des LXRs auraient donc une action inhibitrice sur le système immunitaire acquis en inhibant l'activation des lymphocytes par les cellules dendritiques et en empêchant la prolifération des lymphocytes activés.

2.5) Les LXRs dans les cancers

2.5.1) Contrôle de la prolifération

Le contrôle de la prolifération cellulaire est dérégulé très tôt au cours de l'oncogénèse. La prolifération incontrôlée est une caractéristique majeure de tous les cancers (Figure 51) ²⁹.

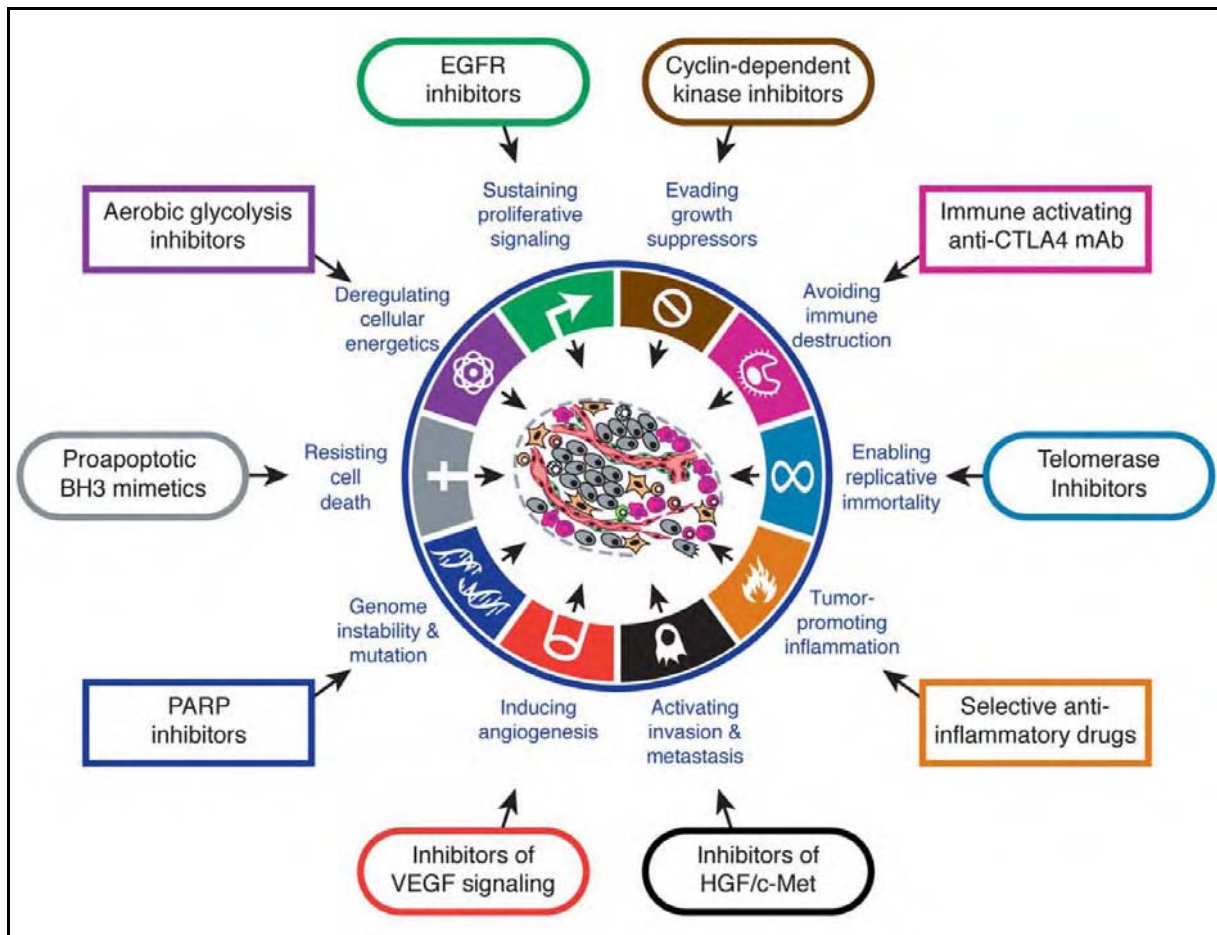


Figure 51 : Les caractéristiques majeures des cancers et leur ciblage thérapeutique potentiel ²⁹. Les propriétés qui caractérisent les cancers sont une prolifération cellulaire continue, l'évasion du contrôle par les gènes suppresseurs de tumeurs, l'échappement à la réponse immunitaire, l'immortalité répliquative, l'inflammation pro-tumorale, l'invasion et les métastases, l'induction de l'angiogenèse, l'instabilité génétique, la résistance à la mort cellulaire et la dérégulation du métabolisme énergétique. L'ensemble de ces caractéristiques peuvent être ciblées par des agents thérapeutiques pour lutter contre les cancers

Plusieurs études ont montré que les LXR α sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans des cellules saines et dans des cellules cancéreuses. Dans des cellules pancréatiques qui sécrètent de l'insuline, l'activation des LXR α inhibe la prolifération cellulaire en augmentant l'expression de p21 et en stabilisant la protéine p27 qui sont des inhibiteurs de CDKs^{424, 425}. Dans des cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation des LXR α inhibe la prolifération cellulaire de manière analogue en empêchant la dégradation de p27 par des agents mitogènes⁴²⁶. Cette étude précise le mécanisme moléculaire qui passe par une inhibition de l'expression de Skp2 par l'activation des LXR α . Skp2 est responsable de la dégradation de p27 lors d'une stimulation mitogénique. Le contrôle de la prolifération cellulaire par les LXR α par la répression de Skp2 a aussi été observé dans des cellules cancéreuses mammaires⁴²⁷, tandis que l'inhibition de la prolifération par l'augmentation de p21 et p27 a été mise en évidence dans des cellules cancéreuses ovariennes et prostatiques⁴²⁸⁻⁴³¹. Au niveau physiologique, il a été montré que des souris mâles LXR α ^{-/-} développent une hyperplasie de la prostate ventrale à cause d'une prolifération accrue des cellules épithéliales de la prostate⁴³². Comme nous l'avons vu dans la partie 2.4.2), des souris LXR β ^{-/-} ont une prolifération accrue des lymphocytes⁴²¹. A l'inverse, l'activation des LXR α par un agoniste inhibe la prolifération des lymphocytes chez des souris exprimant les LXR α , ainsi que la prolifération des lymphoblastes et de cellules leucémiques lymphoblastiques soumis à l'action pro-proliférative de cytokines⁴²². De façon générale, l'activation des LXR α a une action anti-proliférative dans des cellules saines et cancéreuses. En accord avec cette observation, une étude a montré que lors de la régénération du foie après une hépatectomie partielle, les LXR α sont inactivés durant le processus de régénération qui nécessite une forte activité de prolifération des hépatocytes⁴³³. En parallèle, la biosynthèse de cholestérol est stimulée. L'inactivation des LXR α passe par une forte diminution de la quantité d'oxystérols capables d'activer les LXR α comme le 24(S)-25 cholestérol époxyde. L'ajout d'un agoniste synthétique des LXR α pendant la régénération hépatique provoque une diminution de la prolifération des hépatocytes, ce qui inhibe la régénération du foie corrélée à une diminution de la biosynthèse du cholestérol. Cela montre que le taux de cholestérol intracellulaire doit être supérieur pendant la prolifération des hépatocytes, ce qui nécessite l'inactivation des LXR α qui, en empêchant l'accumulation de cholestérol en activant l'efflux de cholestérol, inhibent la prolifération des hépatocytes.

Toutefois, une exception existe puisque les agonistes des LXR α stimulent indirectement la prolifération des cellules endothéliales en augmentant l'expression du VEGF⁴³⁴. Cette

régulation est intéressante puisque le VEGF est en partie responsable du switch angiogénique qui survient lors de l'oncogenèse avec une expression constitutive du VEGF, et qui permet à une tumeur de se vasculariser et de ne plus avoir de limite d'approvisionnement pour sa croissance ⁴³⁵. Des ligands des LXR capable d'inhiber l'expression du VEGF pourrait constituer des molécules thérapeutiques d'intérêt pour le traitement des cancers.

Même si un mécanisme commun du contrôle de la prolifération par les LXR a été identifié pour de nombreux types cellulaires sains et cancéreux, impliquant l'augmentation de p21 et p27, d'autres mécanismes ont été caractérisés. Dans des cellules cancéreuses de la prostate et mammaires, des agonistes des LXR inhibent l'expression transcriptionnelle et protéique des cyclines A et D1 ^{427, 431}, dans des cellules lymphoblastiques ils inhibent l'expression de la cycline B1 ⁴²² tandis que dans les macrophages l'expression des cyclines B1 et D1 sont inhibées par l'activation des LXR ⁴¹⁹. Dans les macrophages, les agonistes des LXR inhibent aussi l'expression de CDK2 et CDK4, ce qui renforce probablement le contrôle de la prolifération par les LXR dans ce type cellulaire. Il a été montré que l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses de la prostate par l'activation des LXR dépend d'une activité lipogénique puisqu'un knockdown de SREBP1 et FASN diminue le contrôle de la prolifération par des agonistes des LXR ⁴³¹. Dans des cellules cancéreuses mammaires, le knockdown de SREBP1 a montré que le contrôle de la prolifération par LXR est indépendant de la lipogenèse ⁴²⁷. Cependant le knockdown de SREBP1 n'affecte presque pas le contrôle de la prolifération par les LXR dans les cellules cancéreuses prostatiques, contrairement au knockdown de FASN qui l'inhibe fortement. Dans les cellules cancéreuses mammaires, seul le knockdown de SREBP1 a été effectué, on ne peut donc pas écarter définitivement l'implication de la lipogenèse dans l'inhibition de la prolifération de ces cellules cancéreuses par les LXR. Les LXR interagissent directement avec la beta-Caténine et inhibent son activité transcriptionnelle de manière ligand-dépendante. Grâce à cette interaction, les agonistes des LXR sont capables d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses du colon, ce qui fait des LXR des cibles particulièrement intéressantes pour le traitement des cancers du colon dont l'étiologie dépend fréquemment de la suractivation de la voie Wnt-beta-Caténine ⁴³⁶.

2.5.2) Mort cellulaire

L'implication des LXR dans la mort cellulaire a été mise en évidence pour la première fois dans des macrophages soumis à une infection bactérienne ¹²⁰. L'inactivation des LXR

conduit à la mort cellulaire des macrophages tandis que leur activation par des agonistes stimulent leur survie. Le facteur SP α est impliqué dans la stimulation de la survie par les LXRs où une augmentation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-xL est observée. Dans des cellules pancréatiques, le T0901317 stimule l'apoptose induite par l'accumulation d'acides gras libres ce qui se traduit par une augmentation de l'activité des caspases effectrices 3 et 7⁴²⁴. Un mécanisme intéressant d'apoptose induite par les LXRs a été caractérisé dans des cellules cancéreuses prostatiques²⁹⁷. Cette étude montre que l'activation des LXRs provoque l'efflux de cholestérol par une stimulation de l'expression d'ABCG1. Il en résulte une déplétion de cholestérol des radeaux lipidiques ce qui inhibe l'activité de la kinase Akt. Akt est impliquée dans le maintien de la survie et son inhibition empêche la génération de signaux de survie dans les cellules cancéreuses prostatiques ce qui provoque leur mort par apoptose. Les glioblastomes, qui sont des cancers du cerveau, stimule la prolifération cellulaire et la survie grâce à la suractivation de la voie de l'EGF qui augmente l'expression du LDLR⁴³⁷. Le GW3965 stimule l'expression d'IDOL qui dégrade le LDLR, et en parallèle il augmente l'expression d'ABCA1 ce qui provoque l'efflux de cholestérol des cellules de glioblastomes. Par ce mécanisme, l'activation des LXRs induit la mort des cellules de glioblastomes. Ainsi, comme pour les cellules cancéreuses prostatiques, l'activation des LXRs diminue le taux intracellulaire de cholestérol dans les cellules de glioblastomes ce qui provoque l'apoptose. Cela suggère que la survie des cellules cancéreuses dépend fortement du taux intracellulaire de cholestérol. Le métabolisme des stérols peut constituer une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses puisque la concentration intracellulaire de cholestérol semble déterminer la prolifération cellulaire et la survie des cellules cancéreuses qui sont actuellement les deux principales caractéristiques visées par les chimiothérapies.

2.5.3) Cross-talks avec la voie de signalisation du TGF β

Il a été rapporté que des souris LXR^{-/-} ont une hyperplasie stromale de la prostate ventrale où les cellules épithéliales canalaire sont positives pour le marqueur de prolifération Ki67 alors que les cellules stromales sont négatives pour Ki67, ce qui montre que seules les cellules épithéliales prolifèrent⁴³². Cela paraît contradictoire avec l'analyse histologique qui montre que l'hyperplasie de la prostate ventrale est stromale. Dans les cellules épithéliales des prostatites LXR^{-/-}, la voie du TGF β est active ce qui est mis en évidence par l'augmentation de l'expression de Smad3/4 et Snail. Snail est un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui est un programme cellulaire qui entraîne la transformation

d'une cellule épithéliale en cellule stromale ou mésenchymateuse. Cela suggère que l'inactivation des LXRs conduit à une prolifération des cellules épithéliales prostatiques qui subissent ensuite l'EMT, se transformant ainsi en cellules stromales, ce qui provoque une hyperplasie stromale prostatique chez les souris $LXR^{-/-}$. D'autres études ont caractérisé une régulation croisée entre la voie de signalisation du TGF β et les LXRs. Dans des souris femelles $LXR\beta^{-/-}$, mais pas dans des souris $LXR\alpha^{-/-} LXR\alpha\beta^{-/-}$, les oestrogènes provoquent l'apparition de cancers de la vésicule biliaire ⁴³⁸. La voie de signalisation du TGF β est impliquée dans l'apparition de ces cancers puisqu'une activité nucléaire des protéines Smads est observée dans ces cellules cancéreuses corrélée avec une perte de l'expression de l'E-cadhérine et une augmentation du taux de TGF β sérique spécifiquement observée dans les souris femelles $LXR\beta^{-/-}$ affectées par ces cancers. Dans des souris sauvage, des lésions précancéreuses de la vésicule biliaire sont observés. Cela suggère que l'inactivation de $LXR\beta$ permet une évolution vers la malignité en stimulant la voie du TGF β qui provoque l'EMT et peut rendre les cellules cancéreuses invasives. Ce mécanisme est analogue à celui observée dans les cellules épithéliales prostatiques où la perte de $LXR\beta$ stimule la voie de signalisation du TGF β et favorise l'apparition d'un profil cellulaire mésenchymateux avec la perte de l'expression de l'E-cadhérine ⁴³². Dans les souris $LXR\beta^{-/-}$, l'activité de la voie du TGF β dans la vésicule biliaire est dépendante de la production endogène d'oestrogènes puisqu'après une ovariectomie, les protéines Smads ne sont pas actives dans les cellules de la vésicule biliaire, et cela est accompagné d'une absence de cancers de la vésicule biliaire chez ces souris ⁴³⁸. Il pourrait être intéressant de voir si, de manière analogue, l'activation de la voie du TGF β dans les cellules épithéliales prostatiques de souris $LXR^{-/-}$ est dépendante de la production d'hormones stéroïdiennes comme les androgènes.

Au niveau cellulaire, des études ont aussi identifié une relation entre les LXRs et la voie du TGF β . Dans des cellules pancréatiques, les LXRs inhibent la prolifération cellulaire en augmentant considérablement l'expression de Smad3 ainsi que Smad4 qui font partie de la voie de signalisation du TGF β et qui inhibent la transition G1/S du cycle cellulaire ⁴²⁴. Dans des cellules endothéliales, le récepteur du TGF β ALK-1 phosphoryle $LXR\beta$ ce qui provoque sa relocalisation cytoplasmique ²⁴⁶. Contrairement aux cellules pancréatiques, l'activation des LXRs dans les cellules endothéliales inhibe la voie de signalisation du TGF β . L'effet des LXRs sur la voie de signalisation du TGF β semble donc être dépendant du type cellulaire. Aussi, les LXRs régulent directement l'expression de l'endoglin qui entre dans la composition du complexe récepteur du TGF ⁴³⁹. Dans des cellules de choriocarcinome, l'activation des

LXR stimule l'expression de l'endoglin, ce qui peut stimuler la voie de signalisation du TGF β dans ces cellules. Une étude a aussi montré que l'activation simultanée des LXRs et de la voie du TGF β induit une stimulation synergique de l'expression d'ABCG1 et de l'activité d'un gène rapporteur sous le contrôle des LXRs⁴⁴⁰. Etant donné que le coactivateur RAP250 est capable d'interagir avec les Smads et avec les LXRs, grâce à deux domaines LXXLL, les auteurs suggèrent que la stimulation synergique observée résulte de la formation d'un complexe transcriptionnel impliquant les LXRs, RAP250 et les protéines Smads sur un promoteur sous le contrôle des LXRs. Cependant, les mécanismes moléculaires grâce auxquels les LXRs et le TGF β contrôlent mutuellement leurs voies de signalisation ne sont pas encore vraiment définis.

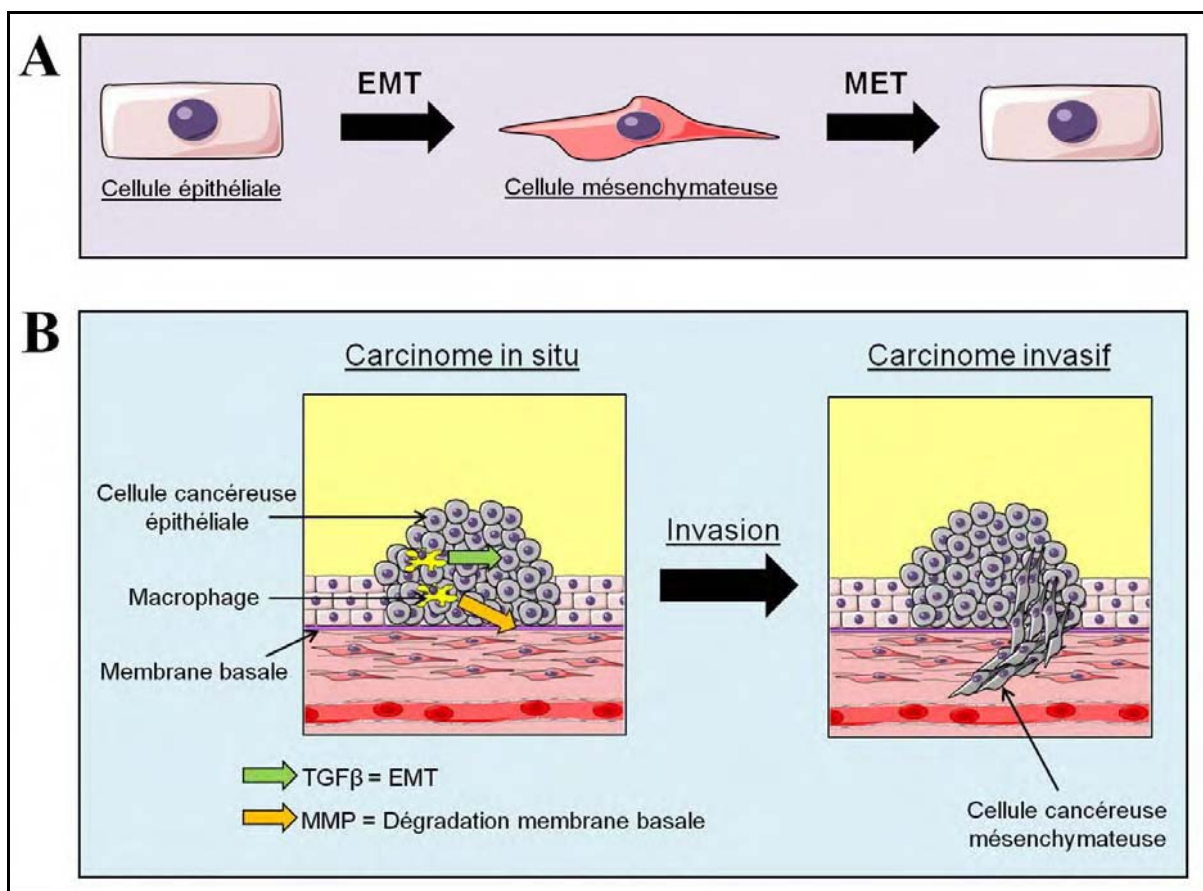


Figure 52 : Implication de la voie du TGF β dans l'invasion tumorale. A. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la transition mésenchymo-épithéliale (MET). B. Le TGF β (Transforming Growth Factor β) stimule l'EMT des cellules cancéreuses qui acquièrent temporairement un phénotype mésenchymateux leur permettant d'envahir les tissus adjacents et atteindre la circulation sanguine. L'acquisition d'un caractère invasif provoque l'évolution d'un carcinome in situ vers un carcinome invasif qui est considéré comme le premier stade cancéreux. MMP : Matrix Metalloproteinase. © Grégory Ségala (Futura-Sciences).

Le TGF β occupe une position extrêmement importante au cours de l'oncogénèse, et plus particulièrement lors des stades avancés de l'oncogénèse (Figure 52). En permettant aux

cellules cancéreuses d'effectuer l'EMT, le TGF β favorise l'invasivité et la formation de métastases ⁴⁴¹. En effet, les cellules mésenchymateuses sont mobiles contrairement aux cellules épithéliales dont dérivent les cellules de carcinomes. L'EMT confère aux cellules de carcinomes des propriétés de cellules mésenchymateuses qui leur permettent de quitter la tumeur primaire et de migrer jusqu'aux vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Ce programme cellulaire est en partie responsable de la progression d'un carcinome in situ, qui est une lésion pré-cancéreuse, vers un carcinome invasif qui est un cancer. Le contrôle de la voie de signalisation du TGF β par les LXR pourrait donc être intéressant à étudier pour le développement de thérapies anticancéreuses ciblant les LXRs. Cependant, le TGF β peut aussi avoir des effets suppresseurs de tumeurs puisqu'il est capable d'inhiber la prolifération cellulaire. Les effets pro- ou anticancéreux du TGF β étant dépendant du type cellulaire ou du type de cancer, le développement de thérapies ciblant la voie de signalisation du TGF β doit prendre en considération ces effets opposés selon le cancer visé.

2.5.4) Echappement des tumeurs à l'immunosurveillance

Les cellules cancéreuses doivent échapper à la surveillance du système immunitaire pour pouvoir former une tumeur ⁴⁴². En effet, au cours de l'oncogenèse, les cellules cancéreuses subissent de nombreuses mutations génétiques qui modifient des séquences protéiques. Des fragments de protéines mutées sont présentés à la surface des cellules cancéreuses et ils sont reconnus par les cellules du système immunitaire comme des antigènes du non-soi appelés antigènes tumoraux. Par conséquent, les cellules cancéreuses sont reconnues étrangères par le système immunitaire qui déclenche une réponse immune anti-tumorale. Pour échapper au système immunitaire, les cellules cancéreuses favorise leur tolérance par le système immunitaire en empêchant son activation contre la tumeur. Parmi les moyens mis en œuvre pour l'échappement de l'immunosurveillance, la tumeur génère un microenvironnement immunosuppresseur qui perturbe le fonctionnement normal du système immunitaire à l'encontre de la tumeur ^{442, 443}. Il a été montré que les cellules cancéreuses produisent des oxystéroïls capables d'agir dans les cellules dendritiques infiltrées dans la tumeur et d'inhiber leur capacité à activer des lymphocytes dans les ganglions sentinelles ^{264, 443}. Le mécanisme passe par une inhibition de l'expression de CCR7, qui est nécessaire pour la migration des cellules dendritiques jusqu'aux ganglions où se situent les lymphocytes naïfs pour la présentation antigénique qui active les lymphocytes. Une inhibition de la biosynthèse de cholestérol ou une surexpression de SULT2B1 qui sulfate les oxystéroïls générés dans la tumeur lèvent ce mécanisme d'inhibition de la fonction des cellules dendritiques et restaure

une réponse immune anti-tumorale. Actuellement, ce mécanisme est le seul impliquant les LXR dans l'échappement tumoral à l'immunosurveillance. Il est désormais bien décrit que les LXR ont généralement un rôle immunosuppresseur en inhibant l'inflammation¹⁹⁴ et en inhibant l'immunité acquise⁴²¹⁻⁴²³. Cela suggère que les LXR pourraient être des cibles pharmacologiques intéressantes pour la prévention des cancers grâce à leurs effets anti-inflammatoires, ou éventuellement pour la restauration ou la mise en place d'une immunosurveillance antitumorale. Cependant pour ce dernier point, le rôle des LXR nécessite d'être largement clarifié étant donné que son implication dans l'immunité antitumorale n'a été mise en évidence que par une seule étude.

2.5.5) Les LXR dans les cancers hormono-dépendants

Les LXR régulent le métabolisme des hormones stéroïdiennes, il paraît donc logique que les LXR puissent être impliqués dans les cancers hormone-dépendants. Les LXR sont impliqués dans les cancers de la prostate dont certains sont hormono-dépendants. Dans des souris castrées, les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP deviennent progressivement androgéno-indépendantes pour leur prolifération⁴⁴⁴. Un traitement avec le T0901317 retarde la dérive des cellules LNCaP vers un phénotype d'indépendance aux androgènes. Cependant, le résultat de cette étude est à prendre avec précaution puisque seul le T0901317 a été utilisé pour conclure que les LXR sont impliqués dans le retardement de l'acquisition d'une indépendance aux androgènes. Or, il a été montré que le T0901317 est aussi un antagoniste d'AR, ce qui a pu biaiser l'étude²⁸⁶. Le lycopène, qui est un caroténoïde présent dans les tomates, est capable d'inhiber la prolifération des cellules LNCaP en activant l'expression des LXR qui réduisent le taux intracellulaire de cholestérol²⁶⁶. De manière analogue à la prolifération d'hépatocytes lors de la régénération du foie, les cellules cancéreuses prostatiques semblent dépendre d'un taux suffisamment élevé de cholestérol pour proliférer. Dans le cas des cellules LNCaP, on peut supposer qu'une partie du cholestérol est transformée en androgènes pour une stimulation autocrine de la prolifération cellulaire, ce qui peut être empêché par l'efflux de cholestérol provoqué par l'activation des LXR. Les LXR activent l'expression de la sulfotransférase SULT2A1 responsable de l'inactivation des androgènes par sulfatation, et ils inhibent l'expression de la sulfatase STS qui réactive des androgènes sulfatés en les désulfatant. Cela permet une inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques dépendantes des androgènes par des agonistes des LXR³⁸⁶. Un cross-talk a été caractérisé entre AR et LXR et de façon plus générale entre tous les récepteurs des hormones stéroïdiennes et les LXR. En se liant à AR,

les androgènes inhibent l'activité transcriptionnelle des LXR α probablement par compétition pour des coactivateurs, ce qui se traduit par une augmentation du taux intracellulaire de cholestérol²⁰³. Même si ce mécanisme n'a été caractérisé que pour les androgènes et AR, considérant l'effet mitogénique des hormones stéroïdiennes comme les oestrogènes et les androgènes, on peut supposer que l'inhibition des LXR α par ces hormones permet une augmentation du taux de cholestérol intracellulaire pour favoriser la prolifération des cellules cibles. Cela est en accord avec les études citées précédemment concernant la stimulation de la prolifération des hépatocytes et l'effet anti-prolifératif du lycopène qui nécessitent respectivement un taux de cholestérol plus élevé ou plus faible, ce qui passe par une régulation de l'activité des LXR α .

Comme cela a été abordé dans la partie 2.5.1), les LXR α empêchent l'apparition de cancers de la vésicule biliaire dépendants des oestrogènes. Même si le mécanisme étiologique semble être une augmentation de l'activité de la voie du TGF β , le lien entre les oestrogènes et les LXR α n'a pas été établi dans cette étude. Dans des cellules cancéreuses mammaires, l'activation des LXR α provoque une déprivation des oestrogènes puisqu'elle augmente l'expression de la sulfotransférase SULT1E1 qui inactive les oestrogènes en les sulfatant²⁰⁹. Cela permet d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes.

2.5.6) Les LXR α dans la biologie de l'épiderme

Des oxystérols qui sont des ligands des LXR α , comme le 22(R)-hydroxycholestérol, sont capables d'induire la différenciation de kératinocytes murins et humains in vitro et in vivo chez la souris en activant LXR β , ce qui provoque une inhibition de la prolifération cellulaire^{445, 446}. L'induction de la différenciation des kératinocytes humains par les LXR α semble impliquer les facteurs de transcription AP-1⁴⁴⁵. L'expression de Fra-1, c-Fos et Jun-D qui sont des protéines AP-1 est régulée par des agonistes naturels et synthétiques des LXR α ⁴⁴⁷. Les protéines AP-1 ont des gènes cibles impliqués dans la différenciation des kératinocytes, comme l'involucrine. D'autre part, une analyse des cistromes de LXR β et d'AP-1 a montré que dans les kératinocytes, 77% des sites de liaison à l'ADN de LXR β présentent des sites de liaison d'AP-1 adjacents⁴⁴⁸. L'étude montre aussi que LXR β interagit directement avec des protéines AP-1. Ces résultats expérimentaux suggèrent que LXR β induit la différenciation cellulaire des kératinocytes en interagissant avec les facteurs de transcription AP-1. Les LXR α activent l'expression de SULT2B1b dans les kératinocytes³⁷¹. Le cholestérol sulfate produit

par cette enzyme est décrit pour induire la différenciation des kératinocytes ⁴⁴⁹, les effets différenciants des ligands des LXRs peuvent donc être en partie dépendant de la sulfatation des stéroïdes.

Dans des modèles de pathologie de l'épiderme, l'activation des LXRs a une action thérapeutique. La dermatose et le psoriasis sont des maladies inflammatoires de l'épiderme provoquant une irritation de la peau. Un traitement de souris souffrant de dermatose par des agonistes des LXRs permet de réduire l'inflammation sur les sites lésés grâce à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires ^{450, 451}. Dans des kératinocytes prélevés sur des psoriasis de patients, la réactivation de LXR α permet de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de gènes de la prolifération suggérant l'utilisation d'agonistes des LXRs pour traiter cette affection très fréquente de la peau ⁴⁵². L'activation des LXRs permet de diminuer le photo-vieillessement de la peau en diminuant l'expression de gènes de remodelage de la matrice extracellulaire et de l'inflammation, et en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes ⁴⁵³. La peau de souris dans lesquelles LXR β est inactivé présente un profil moléculaire semblable à celui de la peau humaine âgée. Cela suggère que LXR β pourrait être impliquée dans des processus de vieillissement.

Les effets des LXRs dans les kératinocytes, et de façon plus générale dans l'épiderme suggèrent que les LXRs pourraient constituer des cibles pour la prévention de cancers de la peau provoqués par des inflammations chroniques et par le photo-vieillessement. De plus, l'activité de différenciation des LXRs dans les kératinocytes peut constituer un rationnel fort pour des thérapies anti-cancéreuses puisque la redifférenciation des cellules cancéreuses est un but recherché dans les thérapies antitumorales, comme les inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) ⁴⁵⁴. Dans la peau, seule l'implication des LXRs dans la biologie des kératinocytes a été étudiée. Néanmoins, une très brève étude a observé une expression transcriptionnelle et protéique de LXR α et LXR β dans des mélanocytes, avec une expression de LXR α plus forte dans des mélanocytes provenant de zones adjacentes de vitilligos que dans des mélanocytes normaux ⁴⁵⁵. Cela suggère que LXR α a un rôle dans cette pathologie. L'étude du rôle des LXRs dans les mélanocytes pourrait être intéressante afin de savoir s'ils ont une implication dans l'apparition de mélanomes qui sont les cancers de la peau les plus agressifs.

III) Objectifs de la thèse

La Dendrogénine A (DDA) est une molécule découverte et synthétisée par l'équipe de Marc Poirot sur la base d'une hypothèse métabolique postulant qu'une réaction s'effectue, au niveau du site de liaison des anti-oestrogènes, entre le cholestérol-5,6-époxyde alpha et l'histamine qui produit le 6-histaminylcholestane-3,5-diol appelé Dendrogénine A (DDA) (Figure 53). La DDA possède une activité différenciante dans plusieurs types cellulaires cancéreux. Par exemple, dans des cellules de mélanome métastatique murin et humain la DDA induit à des concentrations cytostatiques une production de mélanine dans des vésicules appelées mélanosomes, qui est une caractéristique de différenciation retrouvée dans les mélanocytes sains de la peau. A des concentrations plus élevées, la DDA a une activité cytotoxique sur tous les types cancéreux testés lors de sa découverte, ce qui concerne des lignées cellulaires de cancer du sein, de cancer du côlon, de cancer du poumon, de glioblastomes, de leucémies, et de mélanome métastatique d'origines murine et humaine. La DDA fait partie d'une nouvelle classe de molécules qui est la famille des alkylaminooxystérols qui n'ont jamais été identifiés chez les mammifères et pour lesquels aucun mécanisme d'action n'a été caractérisé jusqu'à présent. Le premier objectif de ma thèse a été de caractériser le mécanisme d'action cytotoxique de la DDA dans des cellules de mélanome métastatique murin et humain et d'identifier la cible moléculaire de la DDA.

Les anti-oestrogènes de la famille des SERMs se fixent sur une cible microsomale appelé le site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS, AntiEstrogen Binding Site) (Figure 53). L'équipe de Marc Poirot a établi que les ligands d'AEBS, dont les SERMs, induisent la différenciation de cellules cancéreuses mammaires en provoquant la sécrétion de triglycérides, qui est un processus cellulaire retrouvé au cours de la lactation dans les cellules mammaires lumineales. Les ligands d'AEBS provoquent aussi la mort cellulaire par apoptose. AEBS est constitué de deux protéines qui sont des enzymes cholestérogéniques : la 7-déshydrocholestérol réductase (DHCR7) et la 3 β -hydroxycholestérol- Δ 8, Δ 7-isomérase (D8D7I). L'équipe a montré que les ligands d'AEBS provoquent une accumulation de stérols ainsi qu'une production d'espèces oxygénées réactives (ROS, Reactive Oxygen Species). Les stérols accumulés sont oxydés par les ROS en oxystérols. Les activités anti-cancéreuses des ligands d'AEBS sont entièrement dépendantes de l'accumulation de ROS puisque la vitamine E, qui est un antioxydant naturel qui empêche la production de ROS, inhibe totalement l'induction de la différenciation et de la mort cellulaire par les ligands d'AEBS. Cela suggère que la formation d'oxystérols est

déterminante dans le mécanisme d'action des ligands d'AEBS. Le deuxième objectif de ma thèse est d'identifier la nature des oxystérols qui s'accumulent dans les cellules traitées avec les ligands d'AEBS et de caractériser les mécanismes par lesquels les oxystérols accumulés induisent la différenciation et la mort des cellules cancéreuses mammaires.

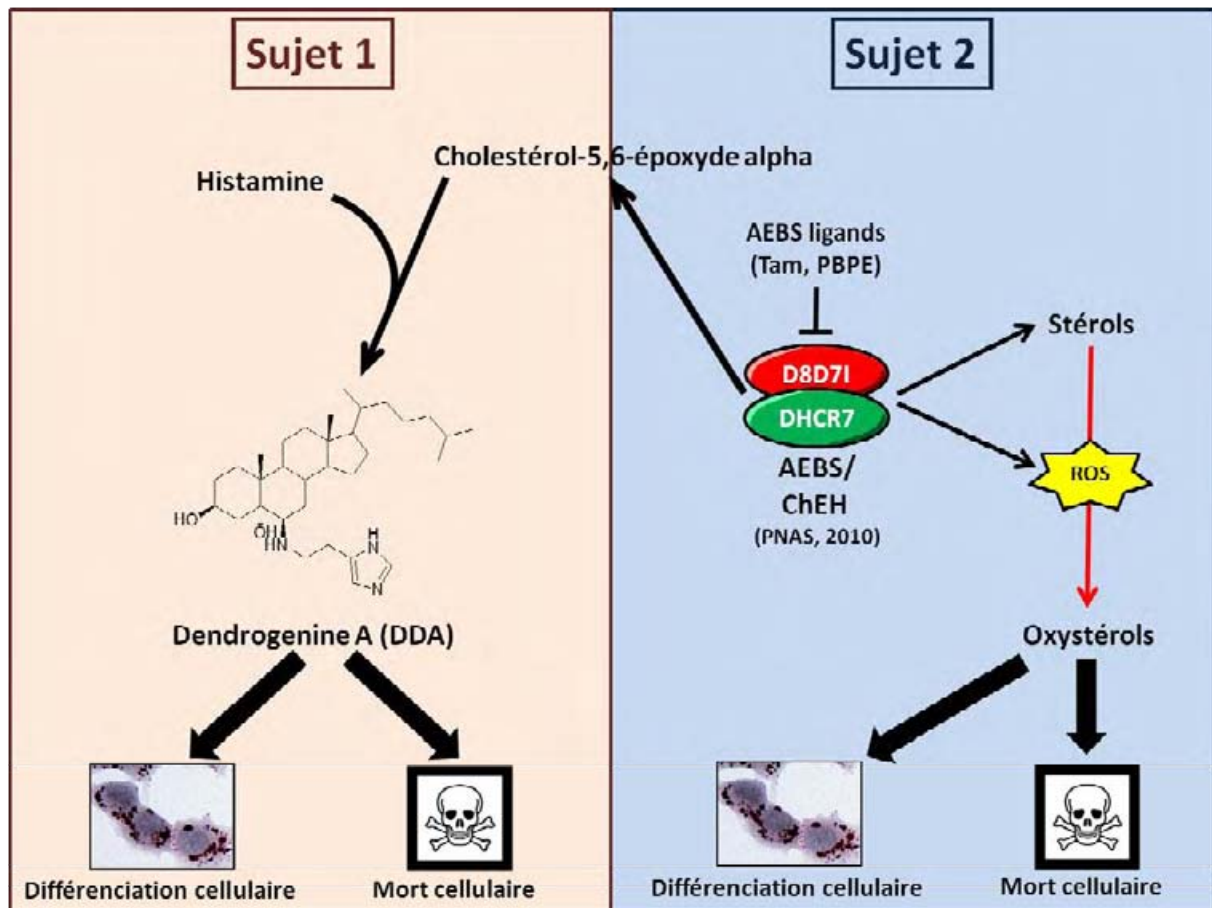


Figure 53 : Schéma général de l'état des connaissances des deux sujets de recherche avant la thèse. Pour le sujet 1, nous savons que la DDA (Dendrogenine A) est produite à partir du cholestérol-5,6-époxyde alpha et de l'histamine et qu'elle a des propriétés différenciantes et cytotoxiques sur des cellules cancéreuses. Pour le sujet 2, nous savons que les ligands d'AEBS provoquent une accumulation de stérols et de ROS ce qui conduit à la formation d'oxystérols. Ces oxystérols induisent la différenciation et la mort des cellules cancéreuses mammaires. AEBS = AntiEstrogen Binding Site ; ChEH = Cholestérol-5,6-époxyde hydrolase ; D8D7I = 3 β -hydroxycholestérol- Δ 8, Δ 7-isomérase ; DHCR7 = 7-déshydrocholestérol réductase Tam = Tamoxifène ; ROS = Reactive Oxygen Species.

MATÉRIELS ET
MÉTHODES

1) Matériels

La DDA a été produite par Sigma-Aldrich, le T0901317 provient de Cayman Chemicals et le GW3965 provient de GlaxoSmithKline. L'ensemble des autres molécules utilisées proviennent de Sigma-Aldrich.

2) Culture cellulaire

Les cellules B16F10 et SK-MEL28 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et elles sont cultivées jusqu'au passage 25 pour les B16F10 et jusqu'au passage 35 pour les SK-MEL28. Les cellules B16F10 sont cultivées dans du milieu RPMI1640 supplémenté par 10% de sérum de veau foetal et par 2mM de L-Glutamine. Les cellules SK-MEL28 sont cultivées dans du milieu RPMI1640 supplémenté par 10% de sérum de veau foetal inactivé par un traitement d'une heure à 55°C, et supplémenté par 2 mM de L-Glutamine. Lors des passages, le milieu des cellules est aspiré, les cellules sont lavées au PBS puis elles sont incubés pendant quelques minutes avec de la trypsine. Les cellules sont décrochées avec leur milieu complet respectif, comptés par numération automatique avec un Coulter, et elles sontensemencées dans leur milieu complet à la concentration souhaitée. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% en dioxyde de carbone.

3) Transfection de siRNA

Les expressions de NOR1, Nur77, ATG7, Vps34, Beclin1 et LXR β sont éteintes par un pool de 4 siRNAs spécifiques de chaque ARNm codant les protéines murines (siNOR1 ; Nur77 ; ATG7 ; Vps34 ; Beclin1 ; LXR β) ou humaines (siNOR1 ; Nur77 ; ATG7 ; Vps34 ; Beclin1 ; LXR β) accompagnées d'une transfection témoin d'un siRNA contrôle (siSC). Les cellules B16F10 et SK-MEL28 sontensemencées respectivement à 300000 cellules et à 500000 cellules par boîtes 10 cm. Quatre heures après l'ensemencement, le milieu complet est aspiré, les cellules sont lavées une fois au PBS et 1,8 ml de milieu OptiMEM sont déposés sur les cellules. Pour chaque boîte 10 cm, une solution I contenant les siRNAs est préparée en diluant 7,5 μ l d'une solution de siRNAs à 20 μ M dans 600 μ l d'OptiMEM et homogénéisée en vortexant. Une solution II contenant l'agent de transfection est préparée en diluant 6 μ l de DharmaFECT1 (Dharmacon) dans 600 μ l d'OptiMEM et homogénéisée par agitation douce par retournement. Une solution de transfection est préparée à partir du mélange de 607,5 μ l de solution I avec 606 μ l de solution II, elle est homogénéisée par agitation douce par retournement et incubée à T.A. pendant 20 minutes. La solution de transfection est déposée sur les cellules et homogénéisée par basculement de la boîte 10 cm. Les cellules sont incubées

pendant 5 heures à 37°C puis la solution de transfection est aspirée et remplacée par du milieu complet.

4) Coloration cellulaire au Bleu Trypan

Les cellules B16F10 et SK-MEL28 sontensemencées dans des plaques 6 puits à 60000 cellules par puits dans du milieu complet et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les cellules sont traitées avec les molécules pendant 24, 48 ou 72 heures. Après le temps de traitement voulu, les cellules surnageantes sont récupérées et les cellules adhérentes sont décrochées par incubation de 10 minutes à 37°C avec de l'EDTA à 1 mM dans du PBS. Les cellules adhérentes et surnageantes sont rassemblées dans un même tube et soumises à une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est aspiré incomplètement en laissant environ 100 µl de surnageant au-dessus des culots. 10 µl de Bleu trypan sont ajoutés à chaque culot qui est resuspendu par aspiration et refoulement doux. Les cellules sont déposées sur une cellule de Mallassez et comptées au microscope photonique. Le pourcentage de cellules mortes est défini en divisant le nombre de cellules bleues par le nombre total de cellules comptées. Le pourcentage de mort cellulaire avec la DDA est corrigé par la soustraction du pourcentage de mort cellulaire dans le contrôle correspondant.

5) Etude du cycle cellulaire en cytométrie de flux

Des cellules B16 F10 et SK-MEL28 sont respectivementensemencées à 300000 cellules et à 500000 cellules par boîte 10 cm. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées avec la DDA pendant 24, 48 ou 72 heures. Le milieu des cellules est récupéré, et les cellules adhérentes sont décrochées avec du PBS 1 mM EDTA pendant 10 minutes. Les cellules sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les culots sont resuspendus avec du PBS et 600000 cellules sont culotées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les culots sont resuspendus avec 600 µl de PBS, les cellules sont dissociées avec une seringue 0,5 ml et les cellules sont fixées dans 1,5 ml d'éthanol absolu pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS et colorées avec de l'iodure de propidium (100 µg/ml de RNase A dans du PBS, 0,25% Tween 20, 50 µg/ml d'iodure de propidium) pendant une heure à 37°C. Les cellules sont analysées avec le cytomètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson). La proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire est calculée avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences) à partir de la mesure du taux de fluorescence à 530 nm de 100000 cellules.

6) Marquage cellulaire Annexin V-FITC / Iodure de Propidium

Des cellules B16 F10 et SK-MEL28 sont respectivementensemencées à 300000 cellules et à 500000 cellules par boîte 10 cm. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées avec la DDA pendant 24, 48 ou 72 heures. Le milieu des cellules est récupéré, et les cellules adhérentes sont décrochées avec du PBS 1 mM EDTA pendant 10 minutes. Les cellules sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les culots sont resuspendus avec du PBS et 600000 cellules sont culotées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont resuspendus dans du tampon de liaison (10 mM Hepes pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 0,1% albumine sérique bovine). Les cellules sont ensuite incubées avec l'Annexin V-FITC dans la glace pendant 15 minutes. 380 µl de tampon de liaison sont ajoutés avec 0,5 mg/ml d'iodure de propidium (IP) juste avant l'analyse avec le cytomètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson). Le pourcentage de cellules positives pour Annexin V-FITC/IP est déterminé avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

7) Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial et des ROS

Des cellules B16 F10 et SK-MEL28 sont respectivementensemencées à 300000 cellules et à 500000 cellules par boîte 10 cm. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées avec la DDA pendant 24, 48 ou 72 heures. Le milieu des cellules est récupéré, et les cellules adhérentes sont décrochées avec du PBS 1 mM EDTA pendant 10 minutes. Les cellules sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Pour mesurer la différence de potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), les cellules sont incubées avec 40 nM de DiOC6(3) (Molecular Probes) avec ou sans 100 mM carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) pendant 15 minutes à 37°C. Pour déterminer la génération d'anion superoxide, les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 37°C en présence de 10 mM de HE (Molecular Probes). Après incubation avec le DiOC6(3) ou le HE, les cellules sont immédiatement analysées avec le cytomètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson). Le DiOC6(3) est excité à 488 nm et l'émission de fluorescence est détectée à 525 nm. Le HE est excité à 490 nm et détecté à 620 nm. Les résultats sont analysés avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

8) Western Blot

Les cellules sont récupérées par grattage directement dans leur milieu et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est aspiré et les culots sont lysés avec le tampon de lyse I (Tris-HCl 12 mM pH 6,8, 0,4% SDS, 2% glycérol, 1% cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)) pour analyser l'expression de PARP et LXR β ou le tampon de lyse II (1%

Triton X-100, 5mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 10% glycerol, 1mM NaF, 1% cocktail inhibiteur de protéase) suivi d'une incubation de 5 minutes dans la glace. Chaque lysat est vortexé 2 fois pendant 5 secondes, soniqué 2 secondes et centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré, il constitue l'extrait cellulaire. Les concentrations protéiques des extraits cellulaires sont dosées par la méthode de Bradford en dosant 1 µl d'extrait cellulaire dans du réactif de Bradford (Bio-Rad). Pour déterminer la concentration protéique, une gamme étalon est préparée avec des concentrations croissantes en albumine bovine sérique avec 1 µl de tampon de lyse dans chaque tube de la gamme étalon et le réactif de Bradford. Les absorbances sont mesurées au spectrophotomètre à 595 nm et les concentrations déterminées à partir de la droite étalon. Du tampon de charge Laemmli contenant 1 mM de DTT est ajouté aux extraits cellulaires qui sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 5 minutes.

Les extraits sont déposés à quantité de protéine égale sur des gels de polyacrylamide dénaturants avec gel de concentration. La migration des protéines est effectuée dans du tampon de migration (192 mM Glycine, 50 mM Tris, 0,1% SDS) en appliquant un courant de 80V dans le gel de concentration et de 150V dans le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PolyVinylDiFluoridène (PVDF) dans un tampon de transfert (192mM Glycine, 50 mM Tris-HCl pH 8,4, 10% méthanol) en appliquant un courant de 500 mA pendant 2 heures. Les membranes sont saturées pendant une heure dans une solution de TBS-T Lait (50 mM Tris pH 7,4, 0,1% Tween 20, 5% lait délipidé lyophilisé) et elles sont ensuite incubées pendant 16 heures avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T Lait (dilution 1/200^{ème} pour les anticorps anti-LXRα (P-20, SantaCruz), anti-LXRβ (Y-16, SantaCruz) et anti-Beclin1 (SantaCruz); dilution au 1/500^{ème} pour les anticorps anti-NOR1 (Novus biologicals), anti-Nur77 (Active Motif), anti-ATG7 (Cell Signaling) et anti-Vps34 (Cell Signaling); dilution 1/1000^{ème} pour les anticorps anti-Bax (Millipore), anti-Bcl-2 (Millipore) et anti-PARP (Cell Signaling); dilution au 1/10000^{ème} pour les anticorps anti-LC3 (Sigma) et anti-Actin (Millipore)). Les membranes sont lavées 3 fois dans du TBS-T et incubées pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horse Radish Peroxidase) correspondant à l'espèce de l'anticorps primaire dilué au 1/10000^{ème} dans du TBS-T Lait. Les membranes sont lavées 4 fois au TBS-T et une fois au PBS. Une solution d'ECL (Enhanced ChemiLuminescence) est déposée sur chaque membrane et la chimioluminescence des membranes est captée par autoradiographie (Hyperfilm ECL, Amersham) et révélation avec une développeuse.

9) Immunofluorescence

Les cellules B16F10 et SK-MEL28 sontensemencées sur des lamelles stériles dans des plaque 6 puits à 60000 cellules par puit pour les cellules B16F10 et à 80000 cellules par puit pour les cellules SK-MEL28. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées avec les molécules d'intérêt. Après 24 heures de traitement, le milieu est aspiré et les cellules sont fixées en déposant du PBS 3,7% paraformaldéhyde dans les puits. Après 15 minutes d'incubation à T.A., les puits sont rincés deux fois avec du PBS et les cellules sont perméabilisées avec PBS 1% BSA, 0,05% Saponin pendant 10 minutes à T.A. Les cellules sont ensuite saturées avec PBS 3% BSA, 0,05% Saponin à T.A. pendant 30 minutes puis les lamelles sont retournées sur une goutte de 20 µl d'anticorps primaire (anti-NOR1 (Novus biologicals), anti-Nur77 (Active Motif), anti-Hsp60 (SantaCruz) ou anti-AIF (Abcam)) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS 1% BSA, 0,05% Saponin pendant 1 heure à T.A. dans une atmosphère humide. Les lamelles sont replacées dans leur puit et lavées deux fois avec PBS 1% BSA, 0,05% Saponin. Les lamelles sont retournées sur une goutte de 20 µl du second anticorps primaire (anti-NOR1 (Novus biologicals), anti-Nur77 (Active Motif), anti-Hsp60 (SantaCruz) ou anti-AIF (Abcam)) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS 1% BSA, 0,05% Saponin pendant 1 heure à T.A. dans une atmosphère humide. Les lamelles sont replacées dans leur puit et lavées deux fois avec PBS 1% BSA, 0,05% Saponin. Les anticorps secondaires correspondant aux espèces des anticorps primaires et couplés à un fluorophore (anti-mouse 488 nm, anti-mouse 597 nm, anti-rabbit 488 nm ou anti-rabbit 597 nm (Alexa Fluor)) sont dilués au 1/500^{ème} dans du PBS 1% BSA, 0,05% Saponin et 200 µl sont déposés sur chaque lamelle et incubé pendant 1 heure à T.A à l'abri de la lumière. Les lamelles sont lavées deux fois avec du PBS puis elles sont retournées sur une goutte de 20 µl de Mowiol 0,1% DAPI sur une lame en verre qui est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Les lamelles sont observées avec un microscope à fluorescence et l'acquisition des images est réalisée avec le logiciel Nikon Element 3.0.

10) Coloration cellulaire à la MonoDensylCadavérine (MDC)

Les cellules B16F10 et SK-MEL28 sontensemencées sur des lamelles stériles dans des plaque 6 puits à 60000 cellules par puit pour les cellules B16F10 et à 80000 cellules par puit pour les cellules SK-MEL28. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées avec les molécules d'intérêt. Après 24 heures de traitement, le milieu est aspiré et du milieu RPMI1640 50 µM MDC, sans sérum est déposé sur les cellules qui sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Le milieu est aspiré et les cellules sont fixées avec PBS 3,7% paraformaldéhyde

pendant 15 minutes. Les lamelles sont lavées deux fois au PBS puis retournées sur une goutte de 20 µl de Mowiol sur une lame en verre qui est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Les lamelles sont observées avec un microscope à fluorescence avec le filtre DAPI et l'acquisition des images est réalisée avec le logiciel Nikon Element 3.0.

11) Microscopie électronique à transmission

Les cellules B16F10 et SK-MEL28 sontensemencées dans des plaques 6 puits respectivement à 60000 cellules et à 80000 cellules par puit. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées avec la DDA pendant 24 heures. Les cellules sont fixées dans du tampon phosphate de Sorensen à 100 mM pH 7,4, 2% glutaraldéhyde pendant une heure. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon phosphate de Sorensen 100 mM pendant 12 heures. Les cellules sont incubées avec 1% OsO₄ dans du tampon phosphate de Sorensen à 50 mM, 250 mM glucose pendant une heure. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec de l'eau distillée et pré-marquées avec une solution aqueuse avec 2% d'acétate d'uranyle pendant 12 heures. Les échantillons sont déshydratés par une augmentation progressive du degré d'éthanol et inclus dans une résine époxy (Epon 812). Des coupes ultrafines de 50 nm sont montées sur une grille de cuivre enduite de collodion et elles sont incubées avec de l'éthanol 50%, 3% d'acétate d'uranyle, 8,5% de citrate de plomb avant d'être observées sous un microscope Hitachi HT7700 sous une tension de 80 kV. L'acquisition des images est effectuée par une caméra CCD.

12) Observation du flux autophagique par GFP-LC3

Les cellules B16F10 et SK-MEL28 sont respectivementensemencées à 300000 cellules et à 400000 cellules par boîte 10 cm. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont lavées au PBS et 1,8 ml de milieu OptiMEM sont déposés sur les cellules. Pour chaque boîte 10 cm, une solution I contenant 5µg de plasmide pCMV-GFP-LC3 est préparée dans de l'OptiMEM et homogénéisée en vortexant. Une solution II contenant l'agent de transfection est préparée en diluant 4,3 µl de PolyEthylenImine (PEI, Sigma) dans 600 µl d'OptiMEM et homogénéisée en vortexant. Une solution de transfection est préparée à partir du mélange de 600 µl de solution I avec 600 µl de solution II, elle est homogénéisée en vortexant et incubée à T.A. pendant 20 minutes. La solution de transfection est déposée sur les cellules et homogénéisée par basculement de la boîte 10 cm. Les cellules sont incubées pendant 5 heures à 37°C puis la solution de transfection est aspirée et remplacée par du milieu complet. 24 heures après la transfection, les cellules sont repiquées sur des lamelles stériles dans des plaques 6 puits à 60000 cellules par puit dans du milieu complet. Les cellules sont traitées 6

heures après avoir été ensemencées avec la DDA. Après 24 heures de traitement, le milieu est aspiré et les cellules sont fixées avec du PBS 3,7% paraformaldéhyde. Les lamelles sont lavées deux fois avec du PBS puis retournées sur une goutte de 20 µl de Mowiol sur une lame en verre qui est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Les lamelles sont observées avec un microscope à fluorescence avec le filtre FITC et l'acquisition des images est réalisée avec le logiciel Nikon Element 3.0.

13) Essai luciférase

Les cellules B16F10 sont ensemencées à 300000 cellules par boîte 10 cm. 24 heures après avoir été ensemencées, les cellules sont lavées au PBS et 1,8 ml de milieu OptiMEM sont déposés sur les cellules. Pour chaque boîte 10 cm, une solution I contenant 5µg de plasmide (pCMX-NR1H3 (LXR α) ou pCMX-NR1H2 (LXR β) + pCMX-NR2B1 (RXR α) + pCMX-DR4-Luciférase) est préparée dans de l'OptiMEM et homogénéisée en vortexant. Une solution II contenant l'agent de transfection est préparée en diluant 4,3 µl de PolyEthylenimine (PEI, Sigma) dans 600 µl d'OptiMEM et homogénéisée en vortexant. Une solution de transfection est préparée à partir du mélange de 600 µl de solution I avec 600 µl de solution II, elle est homogénéisée en vortexant et incubée à T.A. pendant 20 minutes. La solution de transfection est déposée sur les cellules et homogénéisée par basculement de la boîte 10 cm. Les cellules sont incubées pendant 5 heures à 37°C puis la solution de transfection est aspirée et remplacée par du milieu complet. 24 heures après la transfection, les cellules sont repiquées dans des plaques 12 puits à 30000 cellules par puit dans du milieu complet. Les cellules sont traitées avec les molécules d'intérêt 6 heures après avoir été ensemencées. Après 16 heures de traitement, le milieu est aspiré et 100 µl de tampon de lyse Passive Lysis Buffer (PLB, Promega) sont déposés dans chaque puit. Les plaques 12 puits sont incubées une heure à -80°C puis après décongélation les lysats sont récupérés dans des tubes eppendorf 1,5 ml, vortexés 5 secondes puis centrifugés à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont récupérés et constituent l'extrait cellulaire. 40 µl d'extrait cellulaire sont déposés dans chaque puit d'une plaque 96 puits adaptée au luminomètre. L'activité luciférase de chaque extrait est déterminée par un luminomètre qui ajoute 100 µl de substrat de la luciférase (LAR : Luciferase Assay Reagent, Promega) et qui mesure l'activité luciférase pendant une minute à 30°C. En parallèle, un dosage de Bradford est effectué sur les extraits. L'activité luciférase obtenue pour chaque extrait, exprimée en unité arbitraire, est normalisée par sa concentration protéique.

14) Etude de liaison à l'équilibre de la DDA aux LXRs

Dans des tubes eppendorf 1,5 ml, 100 µl de ligand froid solubilisé à la concentration voulue dans le tampon de binding (10 mM Tris pH 7,5, 1,5 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM CHAPS, 10 mg/ml de gamma-globuline) sont déposés puis 50 µl de ligand chaud ($[^3\text{H}]$ -25-hydroxycholestérol) qui contiennent une activité spécifique de 0,4 µCi, puis les tubes sont vortexés. 50 µl du domaine de liaison du ligand du récepteur recombinant (GST-LBD-LXR α ou GST-LBD-LXR β , Invitrogen), qui contiennent 250 ng de protéine recombinante, sont ajoutés à chaque tube, puis les tubes sont incubés pendant 24 heures à 4°C sous agitation à 300 rpm sur un thermomixer en chambre froide. 50 µl de charbon coaté dextran (5% charbon actif + 0,5% Dextran dans tampon de binding sans gamma-globuline) sont ajoutés à chaque tube, homogénéisés par aspiration et refoulement doux et 50 µl sont prélevés directement et déposés dans un pot à scintillation pour être comptés (radioactivité totale (RT)). Les tubes sont placés sur le thermocycler à 4°C sous agitation à 400 rpm pendant 15 minutes. Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. 50 µl de surnageant sont prélevés et déposés dans un pot à scintillation pour être compté (surnageant = radioactivité liée (RL)). Les pots à scintillation sont comptés 1 minute chacun et les résultats sont exprimés en dpm (désintégration par minute). La liaison non spécifique (LNS) est déterminée par la mesure de la radioactivité liée dans un tube contenant un excès d'agoniste froid des LXRs (GW3965 à 10 µM) qui déplace complètement la radioactivité spécifique. La valeur de liaison non spécifique est obtenue en divisant la radioactivité liée par la radioactivité totale. Pour le calcul de la valeur de $[^3\text{H}]$ -25-hydroxycholestérol lié spécifiquement au LBD du LXR testé dans chaque condition (liaison spécifique : LS), la radioactivité liée est divisée par la radioactivité totale, puis la valeur de liaison non spécifique est soustraite à la valeur de radioactivité liée obtenu. Pour obtenir le pourcentage de liaison spécifique par rapport à la condition contrôle (%LS), le résultat obtenu est divisé par la valeur de liaison spécifique de la condition contrôle sans ligand froid (LS contrôle) puis multiplié par 100 pour obtenir un pourcentage de liaison spécifique du $[^3\text{H}]$ -25-Hydroxycholestérol au LBD du LXR testé par rapport à la condition contrôle pour laquelle on considère une liaison spécifique de 100%.

- Liaison non spécifique (LNS) en présence d'un excès d'agoniste froid :

$$\text{LNS} = \text{RL}/\text{RT}$$

- Liaison spécifique pour chaque condition :

$$\text{LS} = (\text{RL}/\text{RT}) - \text{LNS}$$

- Pourcentage de liaison spécifique par rapport à la condition contrôle :

$$\%LS = (LS/LS \text{ contrôle}) \times 100$$

Pour déterminer l'IC50 de la DDA sur les LXR liés au [³H]-25-Hydroxycholestérol, 9 concentrations en DDA ont été utilisées sur une gamme de 10 nM à 10 µM permettant de définir une courbe logarithmique d'équation : % de liaison = f(-log[DDA]). L'IC50 est la concentration en DDA capable de déplacer 50% du [³H]-25-Hydroxycholestérol lié au LBD du LXR concerné.

15) Extraction d'ARN

Des cellules B16F10 et SK-MEL28 sontensemencées dans des boîtes 10 cm à 300000 cellules et à 400000 cellules par boîte 10 cm respectivement. 24 heures après avoir étéensemencées, les cellules sont traitées pendant 6 heures avec les molécules d'intérêt puis le milieu est aspiré et 1 ml de Trizol (Invitrogen) est réparti sur la surface chaque boîte. Le lysat cellulaire obtenu est récupéré et centrifugé à 10000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et 200 µl de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont vortexés. Après une incubation de 5 minutes à T.A., les tubes sont centrifugés à 16000g pendant 10 minutes à 4°C. La phase supérieure est récupérée, 500 µl d'isopropanol froid sont ajoutés suivi d'une homogénéisation en vortexant puis d'une incubation de 10 minutes à T.A. Les tubes sont centrifugés à 16000g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est éliminé et 800 µl d'éthanol à 75% sont déposés sur les culots et les tubes sont centrifugés à 16000g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé, les culots sont séchés à l'air libre à T.A. puis ils sont resuspendus dans 30 µl d'eau distillée stérile et vortexés. Les ARNs sont dosés au Nanovue et le rapport d'absorbance $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ est déterminé pour évaluer la pureté des ARNs obtenus.

16) PCR quantitative

Les ARNm sont reverse-transcrits en effectuant un mélange réactionnel contenant 1 µg d'ARN, 4 µl de tampon de reverse-transcription 5X (iScript, Bio-Rad), 1 µl de Reverse-Transcriptase (iScript, Bio-Rad) et de l'eau distillée stérile q.s.p 20 µl. Le programme du thermocycleur dans lequel sont placés les échantillons comprend 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -80°C. La préparation de la plaque 96 puits analysée en PCR quantitative s'effectue en déposant dans chaque puit 25 ng d'ADNc, 200 ng d'amorce sens, 200 ng d'amorce anti-sens, 12,5 µl de SyBR Green Supermix (Bio-Rad) et de l'eau distillée stérile q.s.p. 25 µl. La PCR quantitative

est réalisée par un iCycler (Bio-Rad). Pour quantifier la variation d'expression relative d'un gène d'intérêt en présence d'un traitement, la valeur de Ct (Cycle treshold = cycle seuil) de ce gène avec le traitement est divisée par la valeur de Ct du gène dans la condition traitement contrôle, ce qui permet l'obtention d'une valeur de ΔCt . Le même calcul est effectué avec un gène de référence entre les deux traitements comparés. Le ΔCt du gène d'intérêt est divisé par le ΔCt du gène de référence, ce qui permet l'obtention d'un $\Delta\Delta Ct$ qui est la variation d'expression relative du gène considéré en présence d'un traitement donné.

17) Dosage de la DDA dans les tissus de souris LXR knockout

Les tissus de souris $LXR\alpha\beta^{-/-}$ proviennent du laboratoire de Jean-Marc Lobaccaro (Aubière, France). Le protocole utilisé pour doser la DDA dans les tissus des souris $LXR\alpha\beta^{-/-}$ est le même que celui décrit dans la partie « Materials and methods » de l'article 5.

RÉSULTATS

Article 1

La Dendrogénine A induit une mort cellulaire apoptotique et autophagique dépendante de NOR1 et Nur77 en ciblant LXR β dans des cellules de mélanome métastatique

Grégory Ségala *et al.* (en préparation)

INTRODUCTION

Le tamoxifène est le traitement de référence pour combattre les cancers du sein qui expriment le récepteur des oestrogènes³⁵. La cible principalement caractérisée du tamoxifène est le récepteur des oestrogènes (ER). En se liant à ER, le tamoxifène empêche l'action mitogénique des oestrogènes comme le 17- β -oestradiol et inhibe la pousse tumorale. Le tamoxifène se lie à une autre cible de haute affinité qui est le site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS = AntiEstrogen Binding Site), qui lie aussi les autres classes de SERMs, mais qui ne lie pas les oestrogènes ni les SERDs comme le Fulvestrant. Notre équipe a montré qu'AEBS est impliqué dans l'induction par le tamoxifène de la différenciation et de la mort des cellules cancéreuses mammaires MCF-7^{116, 117}. Récemment, nous avons montré qu'AEBS porte l'activité enzymatique cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) qui est inhibée par les ligands d'AEBS dont le tamoxifène¹²¹. L'inhibition de la ChEH provoque une accumulation de cholestérol-5,6-époxydes (CEs) qui activent le récepteur nucléaire des oxystérols, le Liver X Receptor beta (LXR β) (Article 2). Nous avons établi que LXR β est impliqué dans les effets différenciants et cytotoxiques du tamoxifène.

Le complexe AEBS porte un site de liaison à l'histamine identifié par Brandes *et al.* en 1985¹²⁵. Les ligands d'AEBS provoquent une accumulation de CEs qui sont à proximité de l'histamine se liant à AEBS et qui peuvent potentiellement réagir ensemble. Cette hypothèse métabolique a conduit l'équipe à synthétiser le produit de la réaction putative entre le CE α et l'histamine qui fut appelé Dendrogénine A (DDA)¹²⁴. De Medina *et al.* ont montré *in vitro* que la DDA est un puissant inducteur de la différenciation de cellules cancéreuses de diverses origines telles que des cellules cancéreuses mammaires, des cellules leucémiques et des cellules de mélanome métastatique. A des concentrations de l'ordre du micromolaire, la DDA induit efficacement la mort des cellules cancéreuses, même pour les lignées cellulaires

cancéreuses particulièrement agressives comme le mélanome métastatique. *In vivo*, la DDA ralentit considérablement la pousse tumorale (Article 5). L'augmentation de la survie des souris traitées avec la DDA est significativement meilleure que la survie des souris traitées avec les chimiothérapies de référence utilisés actuellement en clinique comme le tamoxifène pour les cancers mammaires qui expriment le récepteur des oestrogènes ou la dacarbazine pour le traitement des mélanomes. La DDA se place donc comme un candidat médicament prometteur pour le traitement de plusieurs types de cancers. La découverte de la DDA ne découle pas d'un crible haut-débit de composés de synthèse mais d'une hypothèse métabolique, qui ouvre la possibilité que la DDA puisse être une molécule naturelle. La DDA a donc été recherchée dans des tissus murins et humains sains, et dans des lignées cellulaires tumorales. La DDA a pu être dosée à des concentrations comprises entre 50 et 500 nM dans des tissus murins et humains mais elle demeure indétectable dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées ainsi que dans des tumeurs de patients (Article 5). Cela montre que la DDA est un métabolite naturel retrouvé chez les mammifères, dont l'Homme, qui n'est pas présent dans les tissus tumoraux. Cela suggère que la DDA puisse être un métabolite suppresseur de tumeur et renforce l'intérêt de l'étude des mécanismes d'action fondamentaux de la DDA dans les cellules tumorales. Le but de cette étude est d'élucider le type de mort cellulaire ainsi que les mécanismes moléculaires de mort induits par la DDA dans des cellules de mélanome métastatique murines (B16F10) et humaines (SK-MEL28), d'identifier la cible de la DDA et de caractériser son implication dans les effets cytotoxiques de la DDA.

RESULTATS

La DDA induit une mort cellulaire par apoptose qui implique la mitochondrie dans des cellules de mélanome.

Pour étudier la mort cellulaire induite par la DDA, nous avons choisi des concentrations en DDA supérieures aux IC₅₀ de cytotoxicité de la DDA définies précédemment sur les cellules B16F10 et SK-MEL28¹²⁴. A une concentration de 2,5 µM, la DDA induit des caractéristiques morphologiques de différenciation cellulaire avec une émission de dendrites, comme cela avait déjà été montré¹²⁴, et une cytotoxicité modérée (Figure 1A). A une concentration de 5 µM, les cellules sont arrondies, n'adhèrent plus et certaines ont une couleur foncée ce qui suggère une forte cytotoxicité de la DDA.

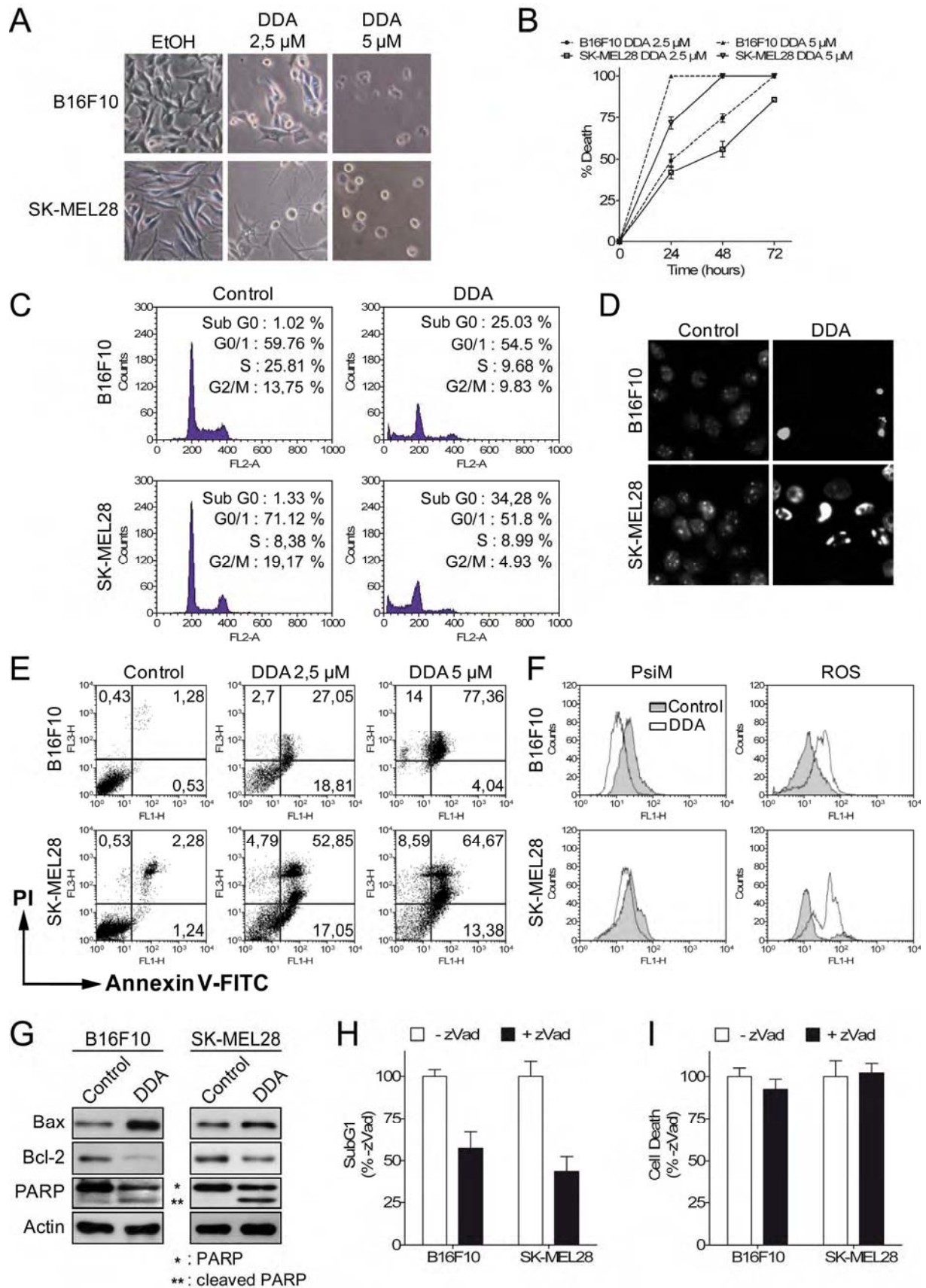


Figure 1 : La DDA induit une mort apoptotique mitochondriale. A. Observation au microscope photonique de cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées avec la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μM ou à 5 μM pendant 24 heures et observées directement sous un microscope photonique. **B.** Cinétique de la mort cellulaire induite par la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la

DDA à 2,5 μM ou à 5 μM pendant 24, 48 ou 72 heures. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée par la méthode de coloration au bleu trypan. La mort cellulaire induite par la DDA est exprimée en pourcentage relatif de la mort cellulaire observée dans la condition contrôle. **C.** Répartition des cellules traitées avec la DDA dans le cycle cellulaire. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 5 μM pendant 48 à 72 heures. L'étude du cycle cellulaire a été réalisée après coloration des cellules à l'iodure de propidium (IP) et l'analyse a été effectuée par un cytomètre en flux. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules comptées en fonction de l'intensité de fluorescence de l'IP représentative de la quantité d'ADN présente dans chaque cellule. **D.** Morphologie nucléaire provoquée par un traitement avec la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 5 μM pendant 24 heures, colorées avec le DAPI et leurs noyaux ont été observés avec un microscope à fluorescence. **E.** Détermination de l'induction de l'apoptose par la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μM ou à 5 μM pendant 24 heures puis elles ont été marquées avec l'Annexin V-FITC et l'IP et analysées en cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence de l'IP en fonction de l'intensité de fluorescence de l'Annexin V-FITC pour chaque cellule. **F.** Potentiel transmembranaire mitochondrial et production d'espèces oxygénées réactives (ROS) par la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 5 μM pendant 24 heures et marquées avec le DiOC6(3) ou l'HE pour analyser respectivement le potentiel transmembranaire mitochondrial ou la production de ROS avec un cytomètre en flux. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules comptées en fonction de l'intensité de fluorescence. **G.** Expression de Bax et Bcl-2 et profil protéique de PARP. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μM (Bax, Bcl-2) ou à 5 μM (PARP) pendant 16 (Bax, Bcl-2) ou 24 heures (PARP). Les protéines ont été extraites par lyse des cellules traitées puis analysées par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **H.** Proportion de cellules en phase sub-G1 après traitement avec la DDA avec ou sans zVAD-fmk. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 5 μM avec ou sans zVAD-fmk à 50 μM pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été colorées avec l'IP et la proportion de cellules en phase subG1 a été déterminée par un cytomètre de flux. Le résultat est exprimé en pourcentage relatif de la proportion de cellules en phase subG1 avec un traitement avec la DDA en absence de zVAD-fmk. **I.** Mort cellulaire induite par la DDA en présence ou en absence de zVAD-fmk. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μM avec ou sans zVAD-fmk à 50 μM pendant 24 heures. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée par la méthode de coloration au bleu trypan. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage relatif de la mort cellulaire observée avec un traitement avec la DDA en absence de zVAD-fmk.

Nous avons quantifié le pourcentage de mort cellulaire total avec la méthode de coloration cellulaire au bleu trypan (Figure 1B). Dans les cellules B16F10, la DDA provoque 100% de mort cellulaire en 24 heures à une concentration de 5 μM , et 100% de mort cellulaire en 72 heures à 2,5 μM en DDA. Dans les cellules SK-MEL28, la mort cellulaire atteint 100% en 48 heures avec 5 μM en DDA, alors que 85% des cellules SK-MEL28 sont mortes après 72 heures de traitement avec la DDA à 2,5 μM . Cela montre que la DDA a un effet cytotoxique dose- et temps-dépendant avec une plus forte sensibilité à la DDA des cellules B16F10 que des cellules SK-MEL28. Nous avons ensuite analysé la répartition des cellules traitées à la DDA dans le cycle cellulaire en cytométrie de flux avec un marquage des cellules à l'iodure de propidium (IP) (Figure 1C). La proportion de cellules B16F10 en subG1, qui est caractéristique d'une population cellulaire subissant une dégradation de l'ADN⁴⁵⁶, est de 1,02% dans le contrôle et de 25,03% avec la DDA. Dans les SK-MEL28, 1,33% de cellules sont en subG1 dans le contrôle alors que ce pourcentage s'élève à 34,28% avec la DDA. Une coloration nucléaire au DAPI montre que la DDA provoque une condensation et une fragmentation nucléaire qui peut expliquer l'augmentation du nombre de cellules en subG1 causée par la DDA (Figure 1D). Ces résultats suggèrent que la DDA induit une mort cellulaire par apoptose puisque la condensation et la fragmentation de la chromatine sont des

caractéristiques de mort cellulaire par apoptose⁴⁵⁶. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué un double marquage Annexin V-FITC / IP (Figure 1E). Un traitement avec la DDA à 2,5 μ M induit un pourcentage de cellules Annexin V + / IP - de 18,81% pour les cellules B16F10 et 17,05% pour les cellules SK-MEL28. La présence d'une proportion élevée de cellules Annexin V + / IP - avec la DDA montre que la DDA induit l'apoptose. A une concentration en DDA de 5 μ M, le pourcentage de cellules Annexin V + / IP - diminue par rapport à un traitement de 2,5 μ M en DDA mais le pourcentage de cellules Annexin V + / IP + augmente avec 77,36% de cellules marquées pour les cellules B16F10 et 64,67% pour les cellules SK-MEL28. La diminution de la proportion de cellules Annexin V + / IP - au profit de l'augmentation du nombre de cellules Annexin V + / IP + suggère une apoptose avancée des cellules qui est en accord avec la forte cytotoxicité de la DDA à 5 μ M. Afin de voir si l'induction de l'apoptose provient d'une perturbation de l'intégrité de la mitochondrie, nous avons mesuré dans les cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées avec la DDA le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) ainsi que le taux d'espèces oxygénées réactives (ROS = Reactive Oxygen Species) qui s'accumulent lorsque la fonctionnalité de la mitochondrie est compromise (Figure 1F). La DDA induit une diminution du $\Delta\Psi_m$ et une augmentation du taux de ROS dans les cellules B16F10 et SK-MEL28 ce qui suggère que l'origine de l'apoptose provoquée par la DDA puisse provenir d'une perturbation de la mitochondrie. Pour approfondir notre connaissance du mécanisme qui pourrait induire l'apoptose mitochondriale dans les cellules traitées avec la DDA, nous avons effectué une analyse de l'expression protéique du facteur pro-apoptotique Bax et du facteur anti-apoptotique Bcl-2 en western blot (Figure 1G). Dans les deux lignées de mélanome, la DDA induit une augmentation de la quantité de Bax et une diminution de Bcl-2 qui provoque une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 en faveur d'une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. La perméabilisation de la mitochondrie peut activer les caspases, par conséquent, nous avons analysé le profil protéique de la Poly-ADP Ribose Polymérase (PARP) qui est un substrat des caspases et un marqueur de l'activité des caspases d'un poids moléculaire de 110 kDa (Figure 1G)⁴⁵⁶. PARP est spécifiquement clivée par les caspases en deux fragments de 90 et 20 kDa, ce que nous observons dans les cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées avec la DDA avec l'apparition d'une bande correspondant à une taille de 90 kDa en-dessous de la PARP non clivée de 110 kDa. La DDA induit donc une mort apoptotique mitochondriale qui fait intervenir les caspases. Afin d'évaluer si la mort cellulaire induite par la DDA est dépendante de l'activité des caspases, nous avons co-traitées les cellules avec la DDA et le zVAD-fmk qui est un inhibiteur général des caspases effectrices.

Le zVAD-fmk inhibe l'accumulation des cellules traitées avec la DDA en sub-G1 (Figure 1H). Cela montre que la dégradation de l'ADN provoquée par le traitement avec la DDA dépend d'une apoptose dépendante des caspases. Toutefois le zVAD-fmk n'a aucun effet sur la mort cellulaire totale provoquée par la DDA (Figure 1I). Cela suggère que l'inhibition d'une apoptose dépendante des caspases est compensée par un autre mécanisme de mort cellulaire déclenché par la DDA.

Nur77, NOR1 et la relocalisation cytoplasmique de Nur77 sont nécessaires pour l'induction de la mort cellulaire par la DDA.

Afin d'identifier un mécanisme de mort cellulaire induit par la DDA indépendant des caspases, nous avons analysé par qPCR array l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'induction d'une apoptose caspase-indépendante. Nous avons identifié une augmentation significative de l'expression de Nur77 et NOR1 qui sont des récepteurs nucléaires du groupe NR4A¹²⁷ parmi lesquels Nur77 a été décrit pour être relocalisé à la mitochondrie et induire une apoptose caspase-indépendante^{457, 458}. Nous avons confirmé les données de qPCR array en western blot où nous avons observé que la DDA induit une augmentation dose-dépendante de l'expression de Nur77 et NOR1 dans les cellules B16F10 et SK-MEL28 (Figure 2A).

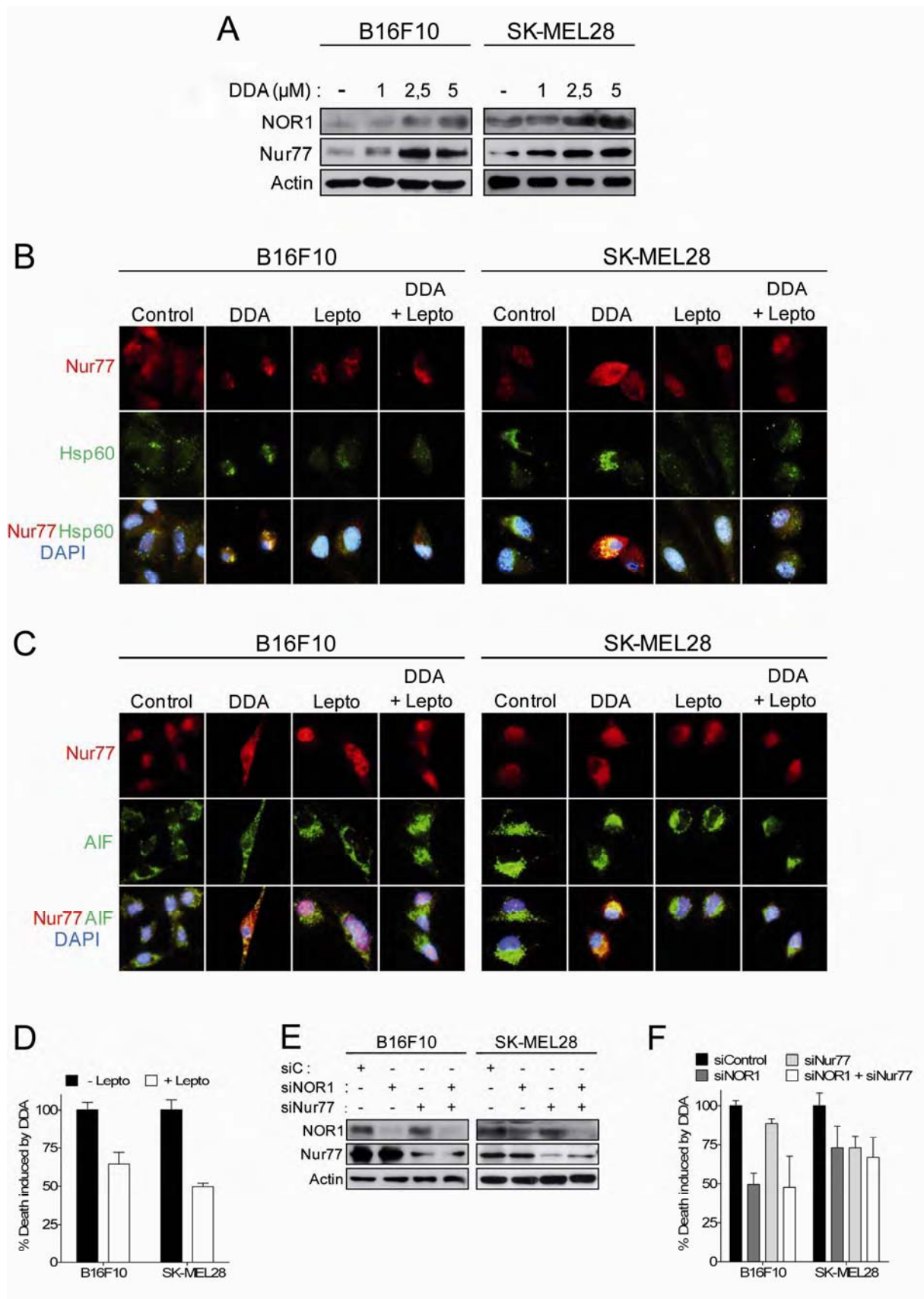


Figure 2 : Implication de NOR1 et Nur77 dans la mort cellulaire induite par la DDA. **A.** Expression protéique de NOR1 et Nur77 sous l'effet de concentrations croissantes en DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées pendant 16 heures avec la DDA à 1 μ M, 2,5 μ M ou 5 μ M. Les protéines ont été extraites par lyse des cellules traitées et analysées par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **B, C.**

Localisation cellulaire de Nur77 et AIF dans des cellules traitées avec la DDA avec ou sans Leptomycine B. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M avec ou sans Leptomycine B à 10 nM pendant 24 heures puis elles ont été marquées avec les anticorps anti-Nur77 et anti-Hsp60 ou anti-AIF reconnus par des anticorps secondaires fluorescents. Les cellules ont ensuite été observées au microscope à fluorescence. Nur77 = rouge ; Hsp60 = vert ; AIF = vert ; DAPI = bleu. **D.** Mort cellulaire induite par la DDA en présence ou en absence de Leptomycine B. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M avec ou sans Leptomycine B à 10 nM pendant 24 heures. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée par la méthode de coloration au bleu trypan. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage relatif de la mort cellulaire observée avec un traitement avec la DDA en absence de Leptomycine B. **E.** Extinction de NOR1 et Nur77 avec des siRNAs spécifiques. Les expressions de NOR1 et Nur77 ont été éteintes par la transfection de siRNAs spécifiques des ARNm codant NOR1 et Nur77 dans les cellules B16F10 et SK-MEL28. Les extinctions des expressions protéiques de NOR1 et Nur77 ont été vérifiées par western blot 96 heures après la transfection sur les protéines extraites par lyse des cellules transfectées. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **F.** Mort cellulaire induite par la DDA dans des cellules transfectées avec des siRNAs spécifiques de NOR1 et de Nur77. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées pendant 24 heures avec la DDA à 2,5 μ M 72 heures après la transfection de siRNAs ciblant NOR1 et Nur77. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée par la méthode de coloration au bleu trypan. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage relatif de la mort cellulaire observée avec un traitement avec la DDA dans des cellules transfectées avec un siRNA contrôle.

Nous avons ensuite évalué si la DDA provoque une relocalisation de Nur77 et NOR1 à la mitochondrie en immunofluorescence (Figure 2B). La DDA provoque une relocalisation de Nur77 dans le cytoplasme et à la mitochondrie dans les deux lignées de mélanome, comme en témoigne sa co-localisation avec le marqueur mitochondrial Hsp60. Un traitement des cellules avec la Leptomycine B, qui est un inhibiteur du transport des protéines du noyau vers le cytoplasme ⁴⁵⁸, empêche la relocalisation cytoplasmique et mitochondriale de Nur77 induite par la DDA. En revanche, la DDA ne provoque pas de relocalisation de NOR1 qui reste dans le noyau et s'y accumule, ce qui est en accord avec l'augmentation de son expression induite par la DDA (Figure 3).

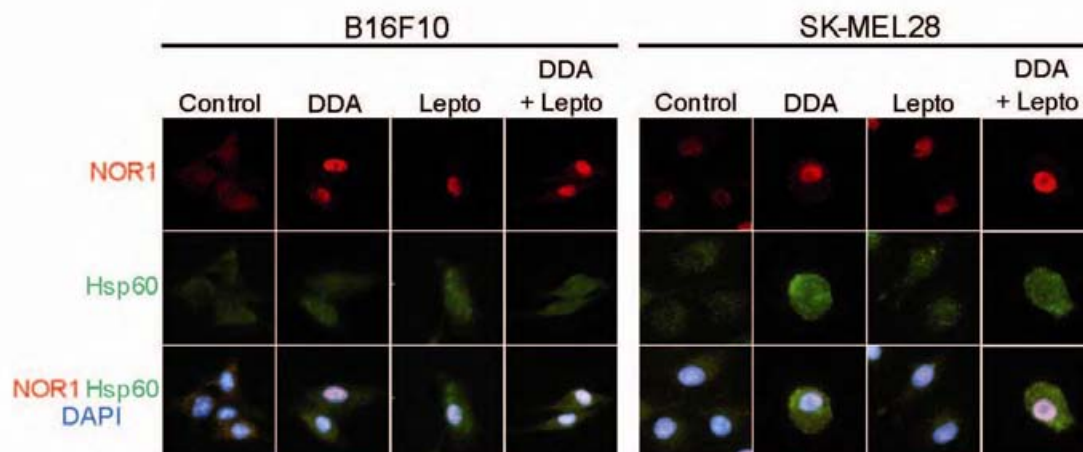


Figure 3 : La DDA ne modifie pas la localisation cellulaire de NOR1. Localisation cellulaire de NOR1 dans des cellules traitées avec la DDA avec ou sans Leptomycine B. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M avec ou sans Leptomycine B à 10 nM pendant 24 heures puis elles ont été marquées avec les anticorps anti-NOR1 et anti-Hsp60 reconnus par des anticorps secondaires fluorescents. Les cellules ont ensuite été observées au microscope à fluorescence. NOR1 = rouge ; Hsp60 = vert ; DAPI = bleu.

L'apoptosis-inducing factor (AIF) est une protéine mitochondriale qui est relarguée dans le cytoplasme lorsque la mitochondrie est perméabilisée et qui entre dans le noyau pour induire une apoptose indépendante des caspases⁴⁵⁹. Il a été décrit dans la littérature que lorsque la protéine Nur77 est relocalisée à la mitochondrie, elle convertit Bcl-2 en facteur pro-apoptotique⁴⁵⁷ et provoque la libération de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie dont AIF⁴⁵⁸. Nous avons donc analysé la localisation cellulaire d'AIF dans les cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées avec la DDA (Figure 2C). Le traitement avec la DDA n'induit pas de localisation nucléaire d'AIF qui reste localisé au niveau de la mitochondrie malgré la localisation mitochondriale de Nur77 dans les mêmes cellules. La Leptomycine B n'affecte pas la localisation d'AIF contrairement à Nur77 qui reste dans le noyau en présence de DDA. La localisation subcellulaire d'AIF n'est donc pas modifiée par un traitement avec la DDA, ce qui exclut une implication d'AIF dans la mort cellulaire induite par la DDA. Comme la Leptomycine B empêche la relocalisation cytoplasmique et mitochondriale de Nur77, nous avons mesuré la mort cellulaire induite par la DDA en présence de Leptomycine B (Figure 2D). Un co-traitement des cellules B16F10 et SK-MEL28 avec la Leptomycine B et la DDA diminue considérablement la mort cellulaire induite par la DDA, ce qui suggère que la relocalisation cytoplasmique de Nur77 est nécessaire pour l'induction de la mort des cellules de mélanome par la DDA. Afin de connaître l'implication de NOR1 et Nur77 dans les effets cytotoxiques de la DDA, nous avons éteint leur expression avec des siRNAs spécifiques (Figure 2E). Nous avons montré que les extinctions de NOR1, Nur77 ainsi que leur extinction combinée, puisqu'il a été montré *in vivo* que leurs gènes ont un rôle biologique mutuellement compensatoire⁴⁶⁰, diminuent significativement le taux de mort cellulaire provoqué par la DDA (Figure 2F). Ces résultats montrent que NOR1, Nur77 et la relocalisation de Nur77 dans le cytoplasme sont impliqués dans l'induction de la mort cellulaire par la DDA. Le mécanisme de mort cellulaire induit par Nur77 et NOR1 n'est pas un mécanisme d'apoptose indépendant des caspases puisque AIF ne relocalise pas au noyau. Cela suggère qu'un mécanisme de mort cellulaire non apoptotique puisse être induit par la DDA.

La DDA induit une autophagie dans les cellules B16F10 et SK-MEL28.

L'autophagie est un mécanisme cellulaire de survie ou de mort programmée de type II⁴⁵⁶.

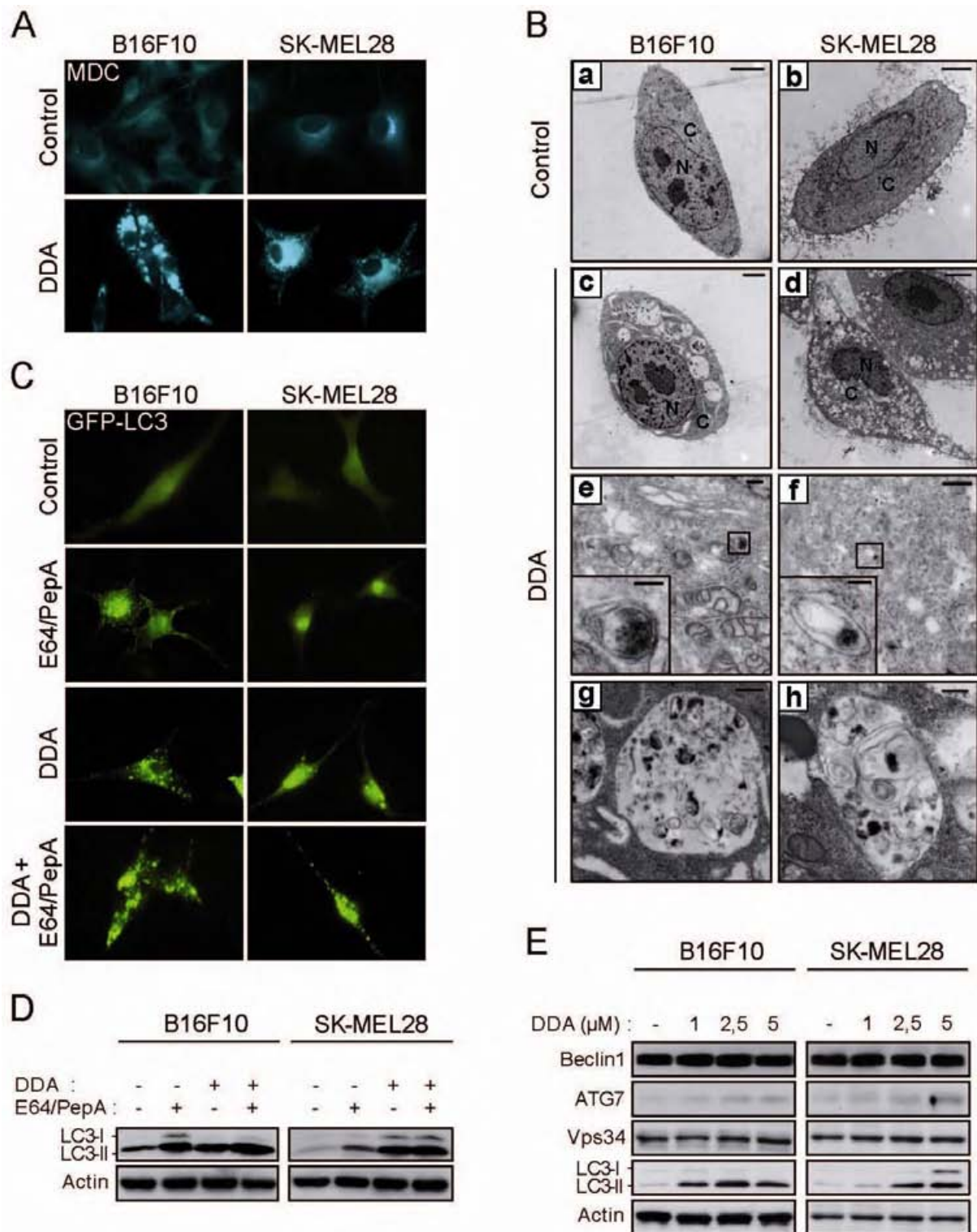


Figure 4 : La DDA induit une autophagie dans des cellules de mélanome. A. Observation de cellules traitées avec la DDA et marquées à la MonoDensylCadavérine (MDC). Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M pendant 24 heures puis elles ont été marquées au MDC et observées au microscope à fluorescence. **B.** Analyse ultrastructurale de cellules traitées avec la DDA. Les cellules B16F10 et

SK-MEL28 ont été traitées pendant 24 heures avec la DDA à 2,5 μM puis elles ont été fixées et préparées pour être observées avec un microscope électronique à transmission. **a, b.** Ultrastructure d'une cellule B16F10 (**a**) et d'une cellule SK-MEL28 (**b**) traitées avec le solvant véhicule ; barres = 5 μm (**a, b**). **c, d.** Ultrastructure d'une cellule B16F10 (**c**) et d'une cellule SK-MEL28 (**d**) traitées avec la DDA ; barres = 2,5 μm (**c**) et 5 μm (**d**). **e, f.** Ultrastructure de vésicules autophagiques retrouvées dans les cellules B16F10 (**e**) et SK-MEL28 (**f**) traitées avec la DDA ; barres = 250 nm et 100 nm (cadre interne) (**e**), 500 nm et 100 nm (cadre interne) (**f**). **g, h.** Ultrastructure d'autolysosomes retrouvés dans les cellules B16F10 (**g**) et SK-MEL28 (**h**) traitées avec la DDA ; barres = 500 nm (**g**) et 250 nm (**h**). **C.** Observation du marquage GFP-LC3 dans des cellules traitées avec la DDA avec ou sans E64 et Pepstatine A. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 transfectées avec la construction GFP-LC3 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μM pendant 24 heures avec ou sans E64/pepstatine A à 10 $\mu\text{g/ml}$. Les cellules traitées ont ensuite été observées avec un microscope à fluorescence. **D.** Analyse de la protéine LC3 après un traitement avec la DDA avec ou sans E64 et Pepstatine A. Le profil de la protéine LC3 a été analysé en western blot à partir de protéines extraites de cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées avec la DDA à 2,5 μM pendant 24 heures avec ou sans E64/pepstatine A à 10 $\mu\text{g/ml}$. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **E.** Expression des protéines Beclin1, ATG7, Vps34 et LC3 après un traitement avec des concentrations croissantes en DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées pendant 24 heures avec la DDA à 1 μM , 2,5 μM ou 5 μM . Les protéines ont été extraites par lyse des cellules traitées et analysées en western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt.

Dans les cellules traitées avec la DDA, nous avons observé en microscopie photonique la présence de vésicules blanches de taille importante dans leur cytoplasme qui est une caractéristique observable dans les cellules qui induisent l'autophagie. Nous avons donc réalisé une coloration des cellules traitées avec la DDA à la MonoDensylCadavérine (MDC) qui permet de visualiser les autolysosomes en microscopie à fluorescence (Figure 4A) ⁴⁶¹. Les autolysosomes sont des structures subcellulaires qui sont formées à la fin du processus autophagique pour dégrader le contenu des vésicules autophagiques ⁴⁶¹. La DDA induit une forte accumulation de vésicules MDC+ dans les cellules B16F10 et SK-MEL28, ce qui suggère une induction d'autophagie par la DDA. Afin de démontrer l'induction de l'autophagie par la DDA dans les cellules de mélanome, nous avons réalisé une étude ultrastructurale de cellules traitées avec la DDA en microscopie électronique à transmission (Figure 4B). A faible grossissement, nous avons observé l'apparition de nombreuses vésicules blanches qui occupent une proportion importante du cytoplasme des cellules B16F10 et SK-MEL28 (Figure 4B c, d). Un fort grossissement du cytoplasme des cellules traitées avec la DDA montre la présence de vésicules entourées d'une double membrane qui est la caractéristique des vésicules autophagiques qui phagocytent le contenu intracellulaire (Figure 4B e, f). Une observation des vésicules blanches à fort grossissement nous a permis d'observer que leur contenu est dégradé ce qui montre que ces vésicules sont des autolysosomes (Figure 4B g, h). L'observation de vésicules autophagiques ainsi que d'autolysosomes dans des cellules de mélanome traitées avec la DDA montre que la DDA induit bien l'autophagie dans les cellules de mélanome. L'autophagie fait intervenir un flux autophagique qui se traduit par la formation de vésicules autophagiques qui fusionnent avec les lysosomes, grâce à la protéine LC3, pour former des autolysosomes conduisant à la

dégradation des vésicules autophagiques⁴⁶¹. Nous avons transfecté les cellules B16F10 et SK-MEL28 avec une construction GFP-LC3 qui permet de suivre le flux autophagique (Figure 4C). Dans les cellules contrôles le marquage GFP-LC3 est faible et diffus alors qu'un traitement des cellules avec la DDA provoque l'apparition de nombreux points GFP-LC3 intenses qui traduisent la formation d'autolysosomes. Un co-traitement des cellules avec les inhibiteurs d'hydrolases lysosomales E64 et Pepstatine A en présence de DDA induit une sur-accumulation de GFP-LC3. Cela montre que la DDA induit un flux autophagique puisque l'inhibition de la dégradation des vésicules autophagiques provoque leur accumulation. Nous avons confirmé le flux autophagique par une approche quantitative par l'analyse du profil protéique de LC3 qui est clivé au cours de l'autophagie en LC3-II qui est le fragment mature responsable de la fusion des vésicules autophagiques avec les lysosomes (Figure 4D)⁴⁶¹. La DDA provoque une augmentation de LC3-II et un co-traitement avec l'E64 et la Pepstatine A induit une augmentation plus forte de LC3-II qui confirme que la DDA induit un flux autophagique dans les cellules B16F10 et SK-MEL28. L'analyse de l'expression de protéines impliquées dans le processus autophagique montre que la DDA induit une stimulation dose-dépendante de LC3-II (Figure 4E). Une stimulation dose-dépendante modérée d'ATG7 est observée dans les cellules B16F10 et SK-MEL28, qui est impliquée dans la formation de vésicules autophagiques. La DDA stimule donc l'expression de protéines autophagiques qui pourraient être impliquées dans l'autophagie induite par la DDA.

L'autophagie induite par la DDA est cytotoxique et elle est dépendante de Nur77, de NOR1 et de la relocalisation cytoplasmique de Nur77.

L'autophagie peut être impliquée dans la survie ou la mort cellulaire. Afin d'éclaircir le rôle de l'autophagie dans les cellules traitées avec la DDA, nous avons quantifié la mort cellulaire dans les cellules traitées avec la DDA en présence d'inhibiteurs de l'autophagie : la 3-méthyladénine (3-MA) et la Bafilomycine A1 (BafA1)⁴⁶¹. Nous avons contrôlé l'efficacité de l'inhibition de l'autophagie induite par la DDA avec une coloration cellulaire au MDC qui montre la disparition des vésicules MDC+ lorsque les cellules sont co-traitées avec la 3-MA ou la BafA1 (Figure 5A). En western blot, la 3-MA empêche l'accumulation de LC3-II induite par la DDA alors que la BafA1 provoque une forte accumulation basale de LC3-II qui est en accord avec sa capacité à inhiber la fusion des vésicules autophagiques avec les lysosomes qui provoque une accumulation de LC3-II (Figure 5B).

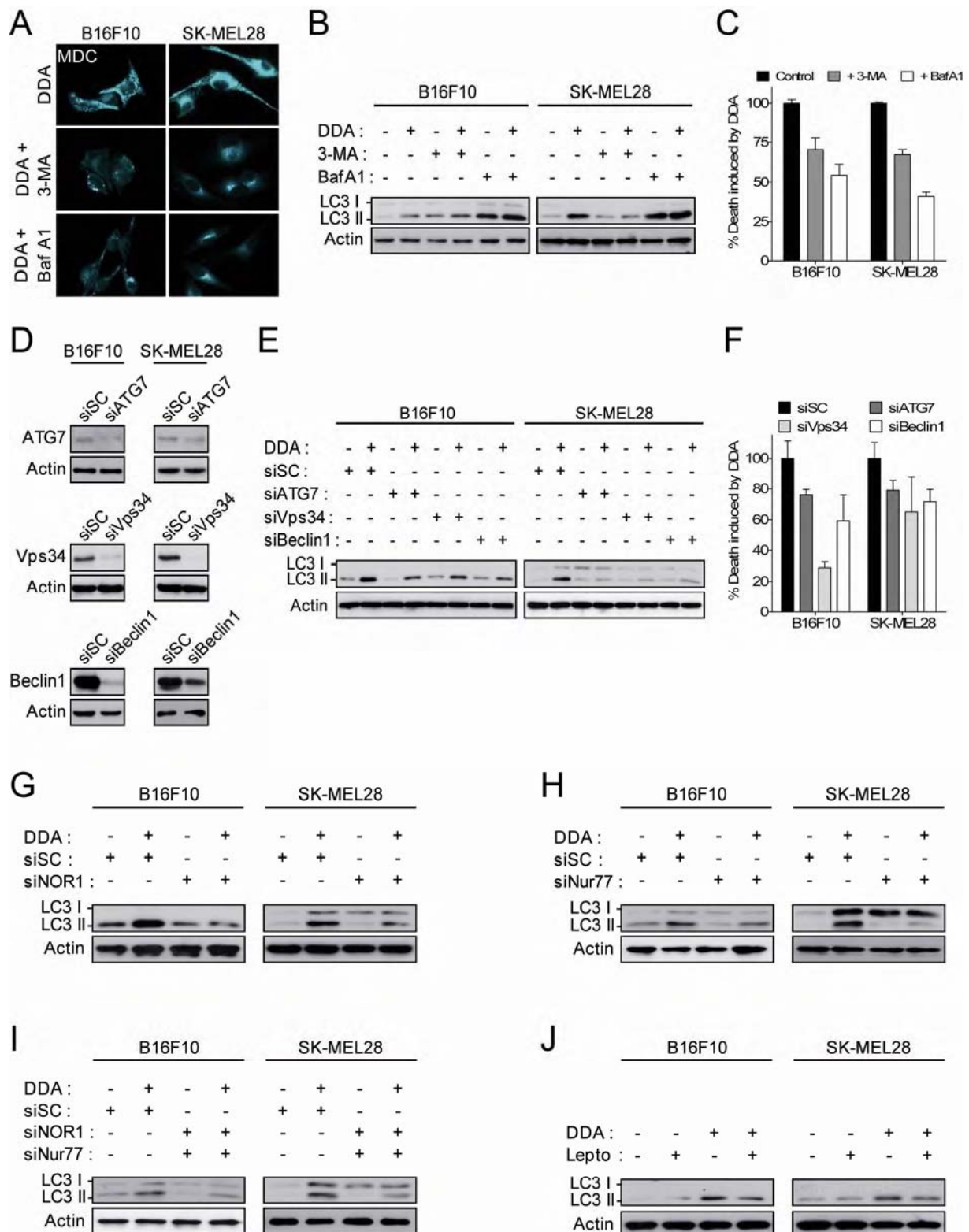


Figure 5 : L'autophagie induite par la DDA est cytotoxique et dépendante de NOR1 et Nur77. A. Observation de cellules traitées avec la DDA avec ou sans 3-méthyladénine (3-MA) ou Bafilomycine A1 (BafA1) et marquées au MDC. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M pendant 24 heures avec ou sans 3-MA à 5 mM ou BafA1 à 1 μ M. Les cellules traitées ont été marquées avec le

MDC et observées avec un microscope à fluorescence. **B.** Analyse de la protéine LC3 dans des cellules traitées avec la DDA avec ou sans 3-MA ou BafA1. La protéine LC3 a été analysée en western blot à partir de protéines extraites par lyse de cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées pendant 24 heures avec la DDA à 2,5 μ M avec ou sans 3-MA à 5 mM ou BafA1 à 1 μ M. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **C.** Mort cellulaire induite par la DDA avec ou sans 3-MA ou BafA1. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M avec ou sans 3-MA à 5 mM ou BafA1 à 1 μ M pendant 24 heures. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée par la méthode de coloration au bleu trypan. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage relatif de la mort cellulaire observée avec un traitement avec la DDA en absence de 3-MA et de BafA1. **D.** Extinction d'ATG7, Vps34 et Beclin1 avec des siRNAs spécifiques. Les expressions d'ATG7, Vps34 et Beclin1 ont été éteintes par la transfection de siRNAs spécifiques des ARNm codant ATG7, Vps34 et Beclin1 dans les cellules B16F10 et SK-MEL28. Les extinctions des expressions protéiques d'ATG7, Vps34 et Beclin1 ont été vérifiées par western blot 96 heures après la transfection sur les protéines extraites par lyse des cellules transfectées. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **E.** Analyse de la protéine LC3 dans des cellules transfectées avec des siRNAs spécifiques d'ATG7, Vps34 et Beclin1 et traitées avec la DDA. La protéine LC3 a été analysée en western blot à partir de protéines extraites par lyse de cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées pendant 24 heures avec la DDA à 2,5 μ M 72 heures après la transfection de siRNAs ciblant ATG7, Vps34 ou Beclin1. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **F.** Mort cellulaire induite par la DDA dans des cellules transfectées avec des siRNAs spécifiques d'ATG7, Vps34 et Beclin1. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées pendant 24 heures avec la DDA à 2,5 μ M 72 heures après la transfection de siRNAs ciblant ATG7, Vps34 ou Beclin1. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée par la méthode de coloration au bleu trypan. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage relatif de la mort cellulaire observée avec un traitement avec la DDA dans des cellules transfectées avec un siRNA contrôle. **G, H, I, J.** Analyse de la protéine LC3 dans des cellules traitées avec la DDA et transfectées avec des siRNAs spécifiques de NOR1 et Nur77, ou avec ou sans Leptomycine B. La protéine LC3 a été analysée en western blot à partir de protéines extraites par lyse de cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées pendant 24 heures avec la DDA à 1 μ M 72 heures après la transfection de siRNAs ciblant NOR1 (**G, I**) et Nur77 (**H, I**) ou avec ou sans Leptomycine B à 10 nM (**J**). L'actine a été utilisée comme comme contrôle de dépôt.

La 3-MA et la BafA1 inhibent considérablement la mort cellulaire induite par la DDA avec une plus forte efficacité de la BafA1 (Figure 5C). Pour confirmer l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire induite par la DDA, nous avons éteint l'expression des protéines autophagiques ATG7, Vps34 et Beclin1 avec des siRNAs spécifiques (Figure 5D). Les extinctions d'ATG7, de Vps34 et de Beclin1 diminuent la capacité de la DDA à induire une accumulation de LC3-II ce qui démontre l'efficacité des siRNAs utilisés à inhiber l'autophagie induite par la DDA (Figure 5E). La mort cellulaire provoquée par la DDA est significativement diminuée dans les cellules transfectées avec les siRNAs spécifiques d'ATG7, Vps34 et Beclin1, ce qui montre que l'autophagie est impliquée dans l'induction de la mort cellulaire par la DDA (Figure 5F). Dans notre étude, nous avons montré que Nur77 et NOR1 sont impliqués dans la mort cellulaire induite par la DDA mais nous n'avons pas identifié de quel type de mort il s'agissait. Il a déjà été montré dans la littérature que Nur77 est impliqué dans l'induction d'une autophagie cytotoxique ⁴⁶². Comme nous venons de montrer une implication de l'autophagie dans la cytotoxicité de la DDA, nous avons analysé l'impact de l'extinction par siRNA de NOR1, de Nur77 et de leur extinction combinée sur l'induction de l'autophagie par la DDA en analysant l'accumulation de LC3-II. Les extinctions de NOR1 et de Nur77 diminuent significativement la capacité de la DDA à provoquer l'accumulation de LC3-II (Figure 5G, H, I). Un traitement des cellules à la

Leptomycine B diminue aussi l'accumulation de LC3-II par la DDA (Figure 5J), ce qui montre que NOR1, Nur77 et la relocalisation cytoplasmique de Nur77 sont impliqués dans l'induction de l'autophagie par la DDA. Ces résultats montrent que la DDA induit une mort cellulaire autophagique qui implique Nur77, NOR1 ainsi que la relocalisation cytoplasmique de Nur77.

La DDA cible directement les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR α et LXR β

La DDA est le produit de conjugaison naturel du cholestérol-5,6-époxyde alpha et de l'histamine. Le cholestérol-5,6-époxyde alpha a été montré dans la littérature pour être un modulateur des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR (Liver X Receptor) ¹²⁶. Des études cristallographiques ont montré que la conformation du domaine de liaison du ligand des LXRs est modulable et permet l'adaptation de groupements volumineux de ligand dans la poche de liaison au ligand des LXRs, comme c'est le cas du GW3965 qui a un volume hydrodynamique important ¹⁵². Le groupement histaminique de la DDA apporte un incrément de volume significatif relativement au cholestérol-5,6-époxyde, nous avons donc vérifié par une étude de docking moléculaire si la DDA pouvait s'adapter à la poche de liaison de LXR α et de LXR β en utilisant des structures cristallographiques publiées des domaines de liaison au ligand de ces deux récepteurs (Figure 6A, B). L'étude de docking moléculaire montre que la DDA s'adapte très bien au site de liaison de LXR α (Figure 6A) et de LXR β (Figure 6B) et que des interactions potentielles pourraient exister entre la DDA et des résidus de la poche de liaison des LXRs déjà décrits pour permettre la liaison des oxystérols comme le 22(R)-Hydroxycholestérol aux LXRs. Ces résultats préliminaires nous ont motivés à tester si les LXRs pouvaient être la cible de la DDA. Nous avons montré par western blot que seul LXR β est exprimé dans les cellules B16F10 et SK-MEL28 (Figure 6C). L'observation ultrastructurale de cellules B16F10 traitées avec la [¹⁴C]DDA montre que la [¹⁴C]DDA est capable d'entrer dans le noyau, la DDA a donc le potentiel d'agir directement sur les LXRs qui sont localisés dans le noyau (Figure 6D). Pour étudier cette possibilité, nous avons premièrement testé l'effet d'un traitement avec la DDA sur l'activité transcriptionnelle des LXRs dans des cellules transfectées avec un gène rapporteur luciférase sous contrôle d'un élément de réponse des LXRs (LXRE-Luc). La DDA a un effet antagoniste sur l'activité transcriptionnelle basale des LXRs ainsi que sur la stimulation des LXRs par le 22(R)-hydroxycholestérol.

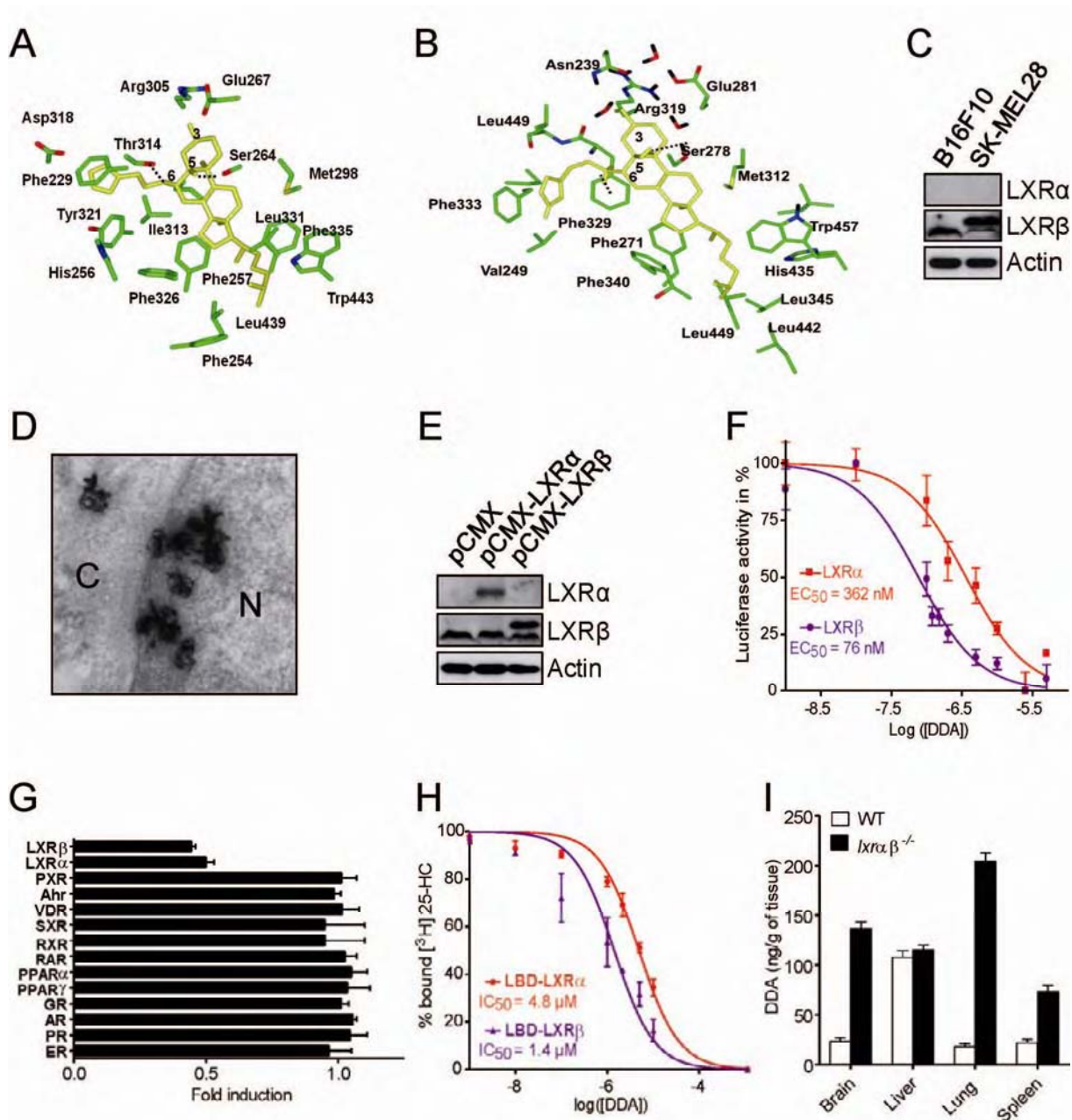


Figure 6 : La DDA est un ligand des LXRs. **A,B.** Modèles moléculaires de la DDA dans la poche de liaison de LXR α (**A**) et de LXR β (**B**). **C.** Analyse de l'expression protéique de LXR α et de LXR β dans les cellules B16F10 et SK-MEL28. Les protéines LXR α et LXR β ont été analysées en western blot à partir de protéines extraites par lyse de cellules B16F10 et SK-MEL28. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **D.** Analyse ultrastructurale de cellules B16F10 traitées avec la [14 C]DDA. Les cellules B16F10 ont été traitées pendant 24 heures avec la DDA à 2,5 μ M puis elles ont été fixées et préparées pour être analysées en microscopie électronique. Un film autoradiographique a été incubé pendant plusieurs mois avec les coupes de cellules puis il a été observé avec un microscope électronique à transmission pour analyser la localisation subcellulaire de la [14 C]DDA. **E, F.** Effet de la DDA sur l'activité d'un gène rapporteur luciférase sous contrôle des LXRs. Les cellules B16F10 ont été transfectées avec des plasmides codant RXR α , LXR α ou LXR β , et une construction rapporteur DR4-Luc. L'expression de LXR α ou de LXR β a été vérifiée par western blot avec des protéines extraites de cellules B16F10 transfectées, l'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt (**E**). Les cellules B16F10 ont été co-traitées 24 heures après transfection avec 10 μ M de 22(R)-hydroxycholestérol et avec une gamme de concentrations en DDA allant de 10 nM à 10 μ M (**F**). Après 18 heures de traitement, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée et normalisée par la concentration protéique de chaque extrait cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité luciférase par rapport à l'activité luciférase obtenue avec le traitement avec le 22(R)-hydroxycholestérol seul (**F**). L' EC_{50} est la concentration en DDA pour laquelle l'activité luciférase est inhibée de 50%. **G.** Effet de la DDA sur l'activité d'un gène rapporteur luciférase

sous contrôle de récepteurs nucléaires. Les cellules B16F10 ont été transfectées avec une construction rapporteur luciférase sous contrôle des LXR, PXR, AhR, VDR, SXR, RXRs, RAR, PPAR, GR, AR, PR ou ER. Les cellules B16F10 ont été co-traitées 24 heures après transfection avec la DDA à 2,5 μ M. Après 18 heures de traitement, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée et normalisée par la concentration protéique de chaque extrait cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité luciférase par rapport à l'activité luciférase obtenue avec le traitement avec le solvant véhicule pour chaque construction rapporteur. **H.** Compétition de liaison à l'équilibre du [3 H]25-hydroxycholestérol sur le domaine de liaison au ligand (LBD) de LXR α ou de LXR β avec des concentrations croissantes en DDA. Le LBD de LXR α ou de LXR β a été incubé pendant 24 heures avec le [3 H]25-hydroxycholestérol en présence d'une gamme de concentrations en DDA allant de 10 nM à 10 μ M. Le [3 H]25-hydroxycholestérol libre a été déplété avec du charbon-dextran et la radioactivité correspondante à la quantité de [3 H]25-hydroxycholestérol lié a été compté avec un compteur de scintillation. Le résultat est exprimé en pourcentage de [3 H]25-hydroxycholestérol lié au LBD de LXR α ou de LXR β . L'IC $_{50}$ est la concentration en DDA pour laquelle 50% du [3 H]25-hydroxycholestérol a été déplacé. **I.** Dosage de la DDA dans des tissus de souris LXR $\alpha\beta^{-/-}$. La DDA a été extraite de tissus de souris LXR $\alpha\beta^{-/-}$ (cerveau, foie, poumon et rate), purifiée par HPLC et dosée avec un spectromètre de masse. Le résultat est exprimé en nanogramme de DDA par gramme de tissu.

Nous avons ensuite établi une courbe de dose-réponse de l'inhibition par la DDA de la stimulation de LXR α ou de LXR β par le 22(R)-hydroxycholestérol en surexprimant chacun des récepteurs dans les cellules B16F10 transfectées avec la construction LXRE-Luc (Figure 6E, F). L'EC $_{50}$ de la DDA sur LXR α est de 362 nM alors que l'EC $_{50}$ de la DDA sur LXR β est de 76 nM ce qui montre que la DDA a une plus forte capacité antagoniste sur LXR β que sur LXR α . Les EC $_{50}$ de la DDA sur chacun des LXRs sont dans la gamme de concentrations à laquelle la DDA est retrouvée dans les tissus sains des mammifères, ce qui suggère que la DDA pourrait agir sur les LXRs *in vivo* à des concentrations physiologiques. Nous avons testé si la DDA pouvait agir sur d'autres récepteurs nucléaires en analysant la capacité de la DDA à moduler l'activité d'un gène rapporteur sous contrôle d'éléments de réponse spécifiques de chaque récepteur nucléaire testé (Figure 6G). La DDA agit sur l'activité de LXR α et de LXR β mais sur aucun autre récepteur nucléaire testé, ce qui suggère que les LXRs sont spécifiquement ciblés par la DDA. Nous avons effectué une compétition de liaison à l'équilibre du 25-hydroxycholestérol tritié, un ligand naturel des LXRs, sur le domaine de liaison au ligand de LXR α et de LXR β par la DDA froide afin de déterminer si la DDA se lie directement aux LXRs (Figure 6H). Nous avons observé que la DDA déplace le 25-hydroxycholestérol avec une IC $_{50}$ de 4,8 μ M pour le domaine de liaison au ligand de LXR α , et avec une IC $_{50}$ de 1,4 μ M pour le domaine de liaison au ligand de LXR β . Cela montre que la DDA est un ligand des LXRs. La différence d'IC $_{50}$ observée entre LXR α et LXR β concorde avec la différence d'EC $_{50}$ de la DDA observée précédemment sur l'activité transcriptionnelle de chacun des LXRs. Cela suggère que la DDA a un plus fort potentiel d'action sur LXR β qui pourrait être dû à une plus forte affinité de la DDA pour LXR β que pour LXR α . Les résultats que nous avons suggèrent que la DDA puisse être un ligand endogène des LXRs. Nous avons dosé la concentration en DDA dans des tissus de souris normales et dans des souris dans

lesquelles LXR α et LXR β ont été inactivés par invalidation génétique (LXR $\alpha\beta^{-/-}$) (Figure 6I). L'inactivation des LXRs provoquent une forte augmentation de la concentration en DDA dans la majorité des tissus testés, ce qui montre un lien physiologique entre la présence des LXRs et la concentration physiologique en DDA. Cela suggère que l'inactivation des LXRs provoque une réaction physiologique compensatoire qui augmente la production de DDA.

Nos résultats montrent que la DDA est un ligand des LXRs et qu'elle exerce une activité antagoniste sur ces récepteurs. Nous avons établi que les concentrations efficaces en DDA pour agir sur les LXRs correspondent aux concentrations physiologiques en DDA dans les tissus. De plus, nous avons mis en évidence un lien physiologique entre la concentration en DDA et la présence des LXRs ce qui suggère que la DDA est un ligand endogène des LXRs.

La DDA module l'expression de gènes cibles des LXRs

Nous avons comparé la modulation de l'expression de gènes cibles des LXRs induite par la DDA et induite par des agonistes des LXRs (Tableau 1). Les agonistes synthétiques purs des LXRs, le T0901317 et le GW3965, ont une activité agoniste sur tous les gènes que nous avons testés, ce qui est en accord avec la classe pharmacologique à laquelle ils appartiennent. Contrairement aux agonistes synthétiques, le 22(R)-hydroxycholestérol, qui est considéré comme un agoniste partiel des LXRs, a majoritairement une activité agoniste sur les gènes que nous avons testés mais il a une activité antagoniste sur l'expression d'ABCG5 et du LDLR. La DDA quant à elle a un effet antagoniste sur l'expression des gènes ABCA1, IDOL alors qu'elle a un effet agoniste sur ABCG5, LDLR et SCD1. La DDA stimule l'expression de SULT2B1b qui n'est exprimé que dans les cellules B16F10. Des divergences existent entre les cellules B16F10 et les cellules SK-MEL28 au niveau de la régulation par la DDA de l'expression d'ABCG1 et ABCG8 qui sont stimulés dans les B16F10 alors qu'ils sont réprimés dans les SK-MEL28. Cela suggère que la DDA peut affecter différemment les LXRs suivant le modèle cellulaire utilisé. Ces résultats montrent que la DDA a un effet antagoniste sur certains gènes et agoniste sur d'autres gènes. La DDA serait donc un modulateur des LXRs ou un antagoniste partiel si on considère sa capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle des LXRs avec un système de gène rapporteur.

	B16F10						SK-MEL28						
	TO	GW	22(R)-HC	DDA			TO	GW	22(R)-HC	DDA			
				1 µM	2,5 µM	5 µM				1 µM	2,5 µM	5 µM	
a	ABCA1	10	14.35	19.83	0.88	0.38	0.81	8	15.1	6.39	0.97	0.6	0.54
	ABCG1	5.04	4.36	2.42	5.52	5.53	5.58	1.34	1.37	0.59	0.57	0.6	0.5
	ABCG5	1.05	1.9	0.65	6.11	3.15	3.52	6.17	5.11	1.3	4.02	4.31	7.04
	ABCG8	1.52	1.67	1.49	1.48	1.62	1.82	1.48	4.8	0.42	0.49	0.48	0.21
	SULT2B1b	3.16	1.17	1.51	1.33	1.58	3.36	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
	LDLR	1.71	1.97	0.07	2.15	4	2.1	1.04	1.42	0.54	2	2.35	3.37
	IDOL	2.00	2.35	2.64	0.89	0.63	0.71	3.11	3.05	3.07	0.55	0.4	0.38
	SREBP1	3.07	3.04	2.23	1.54	0.92	0.98	3.03	5.03	3.37	0.98	1.31	1.4
	SCD1	1.55	1.91	1.08	1.28	1.94	1.63	1.49	1.87	1.33	1.4	2.17	2.34
	NOR1	0.9	0.93	0.59	0.79	0.74	0.43	1.11	1.12	2.97	1.53	1.6	2.02
Nur77	0.97	0.92	1.42	0.77	0.7	0.34	0.76	0.93	1.63	1.43	1.73	1.86	
b	ATG7	1.06	1.08	1.11	1.21	1.01	0.92	1.1	1.3	1.11	1.6	0.9	1.37
	Vps34	0.97	1.08	1.32	1.19	1.07	1.37	1.47	1.69	1.47	2.26	1.35	1.87
	Beclin1	1	1.13	1.23	1.25	1.05	1.15	0.99	1.18	1.13	1.3	0.93	1
	LC3A	1	1.08	1.32	1.3	1.28	2.38	0.69	0.78	0.7	0.99	0.84	0.7
	LC3B	1.26	1.15	1.17	1.47	1.42	1.69	0.97	0.99	1.1	0.94	1.07	1.17

Tableau 1 : Expression relative de gènes cibles des LXR, de gènes autophagiques, de NOR1 et Nur77 dans des cellules B16F10 et SK-MEL28 traitées avec des ligands des LXR ou avec la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées pendant 6 heures avec des ligands des LXR (TO 100 nM, GW 1 µM ou 22(R)-hydroxycholestérol 10 µM) ou avec la DDA à 1 µM, 2,5 µM ou 5 µM. Les ARNs totaux ont été extraits, reverse-transcrits en ADNc puis analysés en qPCR avec des amorces spécifiques de gènes cibles des LXR (a), de NOR1, de Nur77 ou de gènes autophagiques (b). Pour chaque traitement, l'expression de chaque gène est exprimée en nombre de fois par rapport au traitement avec le solvant véhicule.

La DDA module l'expression de NOR1, Nur77 et des gènes LC3 au niveau transcriptionnel

Nous avons défini que la DDA stimule l'expression des protéines NOR1, Nur77 et ATG7 et qu'elle provoque l'accumulation de LC3-II. Nous avons désormais établi que la DDA cible les LXR qui sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Nous avons donc analysé l'expression transcriptionnelle des gènes qui codent NOR1, Nur77 ainsi que les gènes codant les protéines autophagiques que nous avons étudiées lorsque nous avons caractérisé l'autophagie induite par la DDA (Tableau 1). La DDA stimule l'expression de NOR1 et de Nur77 dans les SK-MEL28, et les expressions des deux isoformes de LC3, LC3A et LC3B, sont stimulées dans les B16F10, ce qui est en accord avec les stimulations des protéines codées par ces gènes avec la DDA. En revanche, dans les B16F10 les expressions de NOR1 et de Nur77 sont réprimées, et les expressions de LC3A et LC3B sont réprimées dans les SK-MEL28, ce qui est l'inverse de ce qui est observé au niveau protéique pour ces gènes. Cela suggère que des mécanismes post-transcriptionnels pourraient être impliqués dans la

stimulation de l'expression de certaines protéines par la DDA, et cela semble spécifique du gène considéré et de la lignée cellulaire considérée. Les ligands synthétiques des LXRs ne sont pas capables de moduler l'expression de NOR1, ni de Nur77 mais, comme la DDA, ils répriment l'expression de LC3A dans les SK-MEL28 et ils stimulent légèrement l'expression de LC3B dans les B16F10. Le 22(R)-hydroxycholestérol quant à lui stimule l'expression de NOR1 et de Nur77 dans les SK-MEL28 alors qu'il réprime l'expression de NOR1 dans les B16F10, ce qui est fortement similaire au profil d'expression obtenu avec la DDA pour ces deux lignées cellulaires. NOR1 a déjà été caractérisé comme un gène cible des LXRs⁴⁶³. La modulation de son expression par le 22(R)-hydroxycholestérol et la DDA confirme que la DDA cible LXR β .

Nous avons donc montré que la DDA est capable de stimuler l'expression de NOR1, Nur77, LC3A et LC3B au niveau transcriptionnel et certaines de ces modulations transcriptionnelles sont reproduites avec d'autres ligands des LXRs, ce qui suggère une implication possible des LXRs dans la régulation de l'expression de ces gènes.

LXR β est impliqué dans les mécanismes cytotoxiques induits par la DDA

Afin de connaître l'implication de LXR β , qui est le seul isoforme exprimé dans les cellules B16F10 et SK-MEL28, dans la cytotoxicité de la DDA, nous avons éteint son expression avec des siRNAs spécifiques (Figure 7A). L'extinction de LXR β diminue fortement l'induction de la mort cellulaire par la DDA dans les B16F10 et les SK-MEL28 (Figure 7B). La proportion de cellules en subG1 est aussi diminuée par les siRNAs LXR β dans les cellules B16F10 ce qui montre que LXR β est impliquée dans l'apoptose induite par la DDA (Figure 7C). Nous avons analysé l'expression des protéines impliquées dans la cytotoxicité de la DDA dans des cellules transfectées ou pas avec les siRNAs LXR β et nous avons quantifié le taux de chaque protéine pour chacune des conditions testées (Figure 7D, E). Dans les cellules B16F10 et SK-MEL28, l'extinction de LXR β empêche la DDA d'agir sur le taux de Bax, Bcl-2, NOR1, Nur77 et LC3-II.

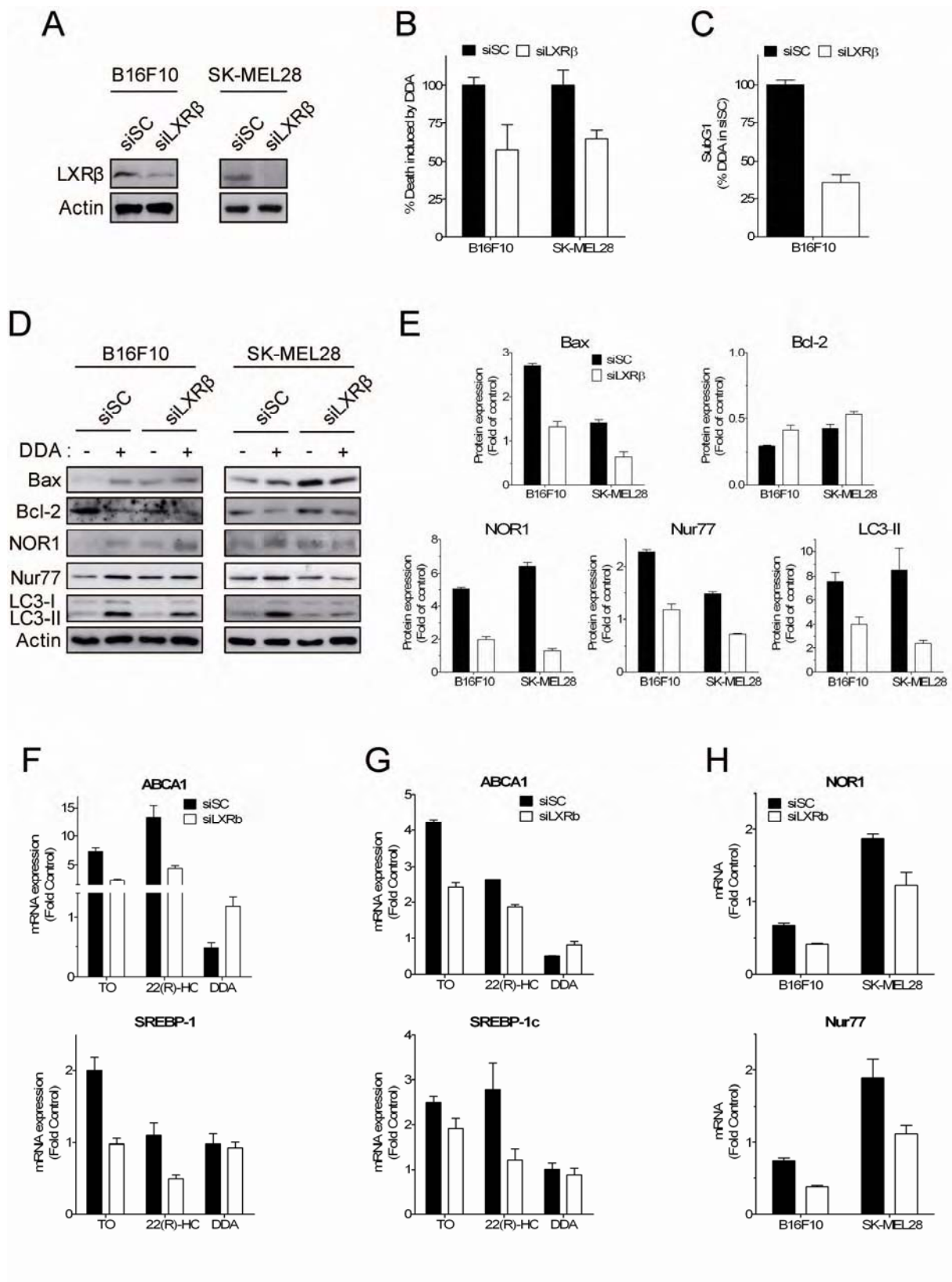


Figure 7 : LXRβ est impliqué dans la cytotoxicité et dans les mécanismes de mort cellulaire induits par la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siSC) ou avec un pool de siRNAs LXRβ et l'implication de LXRβ a été étudiée. **A.** Extinction de LXRβ. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été lysées 96 heures après la transfection des siRNAs, les protéines ont été extraites et analysées par

western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. **B.** Mort cellulaire induite par la DDA dans des cellules transfectées avec les siRNAs LXR β . Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M 72 après la transfection des siRNAs. Après 24 heures de traitement, la mort cellulaire est quantifiée avec la méthode du bleu trypan. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mort cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec le siSC et traitées avec la DDA à 2,5 μ M. **C.** Proportion de cellules en subG1 dans des cellules transfectées avec des siRNAs LXR β et traitées avec la DDA. Les cellules B16F10 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M 72 heures après la transfection des siRNAs. Après 24 heures de traitement, les cellules ont été récupérées, fixées et colorées avec l'iodure de propidium pour être analysées avec un cytomètre de flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules en subG1 par rapport à la proportion de cellules en subG1 pour les cellules transfectées avec le siSC et traitées avec la DDA à 2,5 μ M. **D, E.** Analyse des protéines Bax, Bcl-2, NOR1, Nur77 et LC3 dans des cellules transfectées avec des siRNAs LXR β et traitées avec la DDA. Les cellules B16F10 et SK-MEL28 ont été traitées avec la DDA à 2,5 μ M 72 heures après la transfection des siRNAs LXR β . Après 24 heures de traitement, les cellules sont lysées et les protéines extraites sont analysées par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de dépôt (**D**). Les bandes spécifiques des protéines analysées ont été quantifiées. Les bandes d'actine correspondant à chaque piste ont aussi été quantifiées et ont été utilisées pour normaliser les quantifications des protéines d'intérêt (**E**). Les résultats des quantifications sont exprimés en nombre de fois par rapport aux cellules traitées avec le solvant véhicule pour chaque condition siRNA. **F, G, H.** Les cellules B16F10 (**F, H**) et SK-MEL28 (**G, H**) sont traitées 72 heures après transfection des siRNAs LXR β avec le TO à 100 nM, le 22(R)-hydroxycholestérol à 10 μ M (**F,G**) ou la DDA à 2,5 μ M (**F, G, H**) pendant 6 heures. Les ARNs totaux ont été extraits, reverse-transcrits en ADNc puis analysés en qPCR avec des amorces spécifiques d'ABCA1, de SREBP-1 (**F, G**), de NOR1 ou de Nur77 (**H**). Pour chaque traitement, l'expression de chaque gène est exprimée en nombre de fois par rapport au traitement avec le solvant véhicule.

Nous avons aussi observé que l'extinction de LXR β affecte le taux basal des protéines étudiées comme une augmentation de Bax et de NOR1 dans les B16F10 et les SK-MEL28, et une diminution de Bcl-2 et une augmentation de Nur77 dans les B16F10 (Figure 7D). Cela montre que LXR β est impliqué dans l'induction de l'autophagie et de l'apoptose par la DDA. Nous avons ensuite étudié l'implication de LXR β dans la modulation transcriptionnelle de NOR1 et Nur77. Nous avons d'abord validé que l'extinction de LXR β affecte la capacité des ligands des LXRs et de la DDA à moduler l'expression de gènes cibles bien caractérisés des LXRs (Figure 7F, G). Les siRNAs LXR β diminuent fortement la stimulation d'ABCA1 et SREBP-1 par les agonistes des LXRs dans les cellules B16F10 (Figure 7F) et SK-MEL28 (Figure 7G), et ils empêchent la DDA de réprimer l'expression d'ABCA1 ce qui valide la capacité des siRNAs LXR β à empêcher LXR β d'agir sur ses gènes cibles. L'extinction de LXR β diminue l'expression de NOR1 et de Nur77 en présence de DDA dans les B16F10 et dans les SK-MEL28 (Figure 7H) ce qui montre l'implication de LXR β dans la stimulation de l'expression de NOR1 et Nur77 au niveau transcriptionnel par la DDA. Ces résultats montrent que LXR β est impliqué dans les mécanismes de mort cellulaire induits par la DDA et que la régulation de l'expression de NOR1 et de Nur77 par la DDA est effectuée au niveau transcriptionnel par LXR β .

DISCUSSION

Notre étude révèle l'induction de deux types de mort cellulaire par la DDA : une apoptose caspase-dépendante et une autophagie cytotoxique (Figure 8). L'autophagie cytotoxique semble être le mécanisme de mort cellulaire prépondérant puisque son inhibition entraîne une forte diminution de l'induction de la mort cellulaire par la DDA. Au contraire, l'inhibition de l'apoptose caspase-dépendante semble être entièrement compensée par l'autophagie cytotoxique puisque la mort cellulaire n'est pas affectée par un inhibiteur général des caspases. L'incapacité de l'inhibition de l'apoptose à diminuer la mort cellulaire induite par la DDA suggère que cette molécule peut être utilisée pour provoquer la mort de cellules cancéreuses dans lesquelles les voies d'apoptose intrinsèque ont été inactivées au cours de l'oncogenèse. Cela peut renforcer l'intérêt d'une utilisation thérapeutique de la DDA puisque son indication ne serait pas simplement limitée aux cancers dans lesquels les voies apoptotiques sont fonctionnelles. De plus, la DDA pourrait être utilisée contre les cancers résistants aux chimiothérapies dont l'action repose essentiellement sur une induction de l'apoptose ⁴⁶⁴.

Les mécanismes par lesquels NOR1 et Nur77 provoquent l'autophagie n'ont pas été déterminés dans cette étude et leur élucidation mérite une étude à part entière. Nur77 semble devoir être relocalisés dans le cytoplasme pour induire l'autophagie puisque la Leptomycine B qui inhibe son transport vers le cytoplasme inhibe l'induction de l'autophagie et de la mort cellulaire par la DDA. Cependant, la Leptomycine B n'est pas spécifique du transport de Nur77 et inhibe de façon générale le transport nucléocytoplasmique dépendant de l'exportine 1 ⁴⁶⁵. Il est donc possible que d'autres protéines nucléaires nécessitent d'être relocalisées dans le cytoplasme pour que la DDA induise l'autophagie et la mort cellulaire. Toutefois, la capacité de siRNAs Nur77 à inhiber l'autophagie et la mort cellulaire, ainsi que la mise en évidence d'une relocalisation cytoplasmique de Nur77 sont fortement en faveur de son implication dans l'autophagie et la mort cellulaire inhibée par la Leptomycine B. Il a été montré que Nur77 interagit avec Bcl-2 au niveau de la mitochondrie et que Nur77 convertit Bcl-2 en facteur pro-apoptotique ce qui provoque une apoptose mitochondriale ⁴⁵⁷. Le rôle de Bcl-2 n'est pas restreint à la mitochondrie où elle inhibe Bax. Bcl-2 interagit aussi avec la protéine Beclin 1 et inhibe l'autophagie ⁴⁶⁶. Nous avons montré que Beclin 1 est impliquée dans l'autophagie cytotoxique induite par la DDA. Il est possible qu'après avoir été relocalisée dans le cytoplasme, Nur77 inhibe l'interaction de Bcl-2 avec Beclin 1, puisque Nur77 modifie la conformation de Bcl-2, et par conséquent active l'autophagie. Cela pourrait expliquer l'inhibition de l'autophagie par la Leptomycine B et le siRNA Nur77. La

relocalisation cytoplasmique de Nur77 par la DDA est un évènement qui reste à expliquer, ce qui était au-delà de l'objectif de cette étude. Il a été montré la localisation cellulaire de Nur77 est régulée par signaux provenant de voies de stress comme la voie des MAPK ou la voie JNK⁴⁶⁷. La régulation de la localisation subcellulaire de Nur77 est effectuée par l'ajout de phosphorylation catalysée par ERK, JNK ou encore Akt. Il est donc possible que la DDA fasse intervenir des voies de signalisation pour induire la relocalisation cytoplasmique de Nur77 et par conséquent pour induire la mort cellulaire. Cela ouvre la perspective d'étude sur les modifications post-traductionnelles éventuelles que subit Nur77 dans des cellules traitées avec la DDA et de déterminer quelles voies de transduction sont impliqués dans ces modifications. NOR1 reste dans le noyau des cellules traitées avec la DDA ce qui suggère que NOR1 a un rôle génomique dans l'induction de l'autophagie et de la mort cellulaire. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier la régulation transcriptionnelle de l'autophagie par NOR1. La DDA pourrait faciliter l'étude des mécanismes par lesquels NOR1 et Nur77 sont impliqués dans l'autophagie étant donné que notre étude met pour la première fois en évidence une implication de NOR1 et Nur77 dans l'autophagie.

Nous avons montré que la DDA est un ligand naturel des LXRs et qu'elle a un effet d'antagoniste partiel sur leur activité transcriptionnelle. La DDA stimule l'expression de Bax et diminue l'expression de Bcl-2 par le biais de LXR β , ce qui provoque l'apoptose des cellules de mélanome. En parallèle, la DDA stimule de manière dépendante de LXR β l'expression de NOR1 et de Nur77 qui sont impliqués dans l'induction de l'autophagie cytotoxique par la DDA. L'induction de l'autophagie par la DDA est inhibée par les siRNAs LXR β de la même façon que par les siRNAs NOR1 et Nur77 ce qui suggère que l'implication de LXR β dans l'autophagie induite par la DDA passe par la stimulation de l'expression de NOR1 et Nur77. Récemment, le groupe d'Ira Tabas a montré que l'autophagie permet aux macrophages d'exporter le cholestérol stocké dans des gouttelettes lipidiques³¹⁹. Les gouttelettes lipidiques sont autophagocytées et digérées dans les autolysosomes, cette autophagie a été appelée lipophagie. Dans les autolysosomes, les esters de cholestérol sont libérés des gouttelettes lipidiques et hydrolysés grâce à l'action de la lipase acide lysosomale. Le cholestérol libre peut alors être efflué hors des macrophages par le transporteur ABCA1. En considérant le rôle abondamment documenté des LXRs dans la stimulation de l'efflux de cholestérol, on peut s'attendre à ce que les LXRs puissent contrôler l'autophagie pour stimuler l'efflux des stocks cellulaires d'esters de cholestérol. En ce qui nous concerne, nous avons décrit un rôle de LXR β dans l'induction d'une autophagie cytotoxique mais cela

n'exclut pas que les LXR β puissent induire une autophagie modérée permettant de réguler finement des processus cellulaires et physiologiques. L'implication des LXR β dans d'autres types d'autophagie, dont la lipophagie décrite par le groupe d'Ira Tabas, pourrait faire l'objet d'études originales qui pourraient déboucher sur une meilleure compréhension de l'homéostasie du cholestérol au niveau cellulaire.

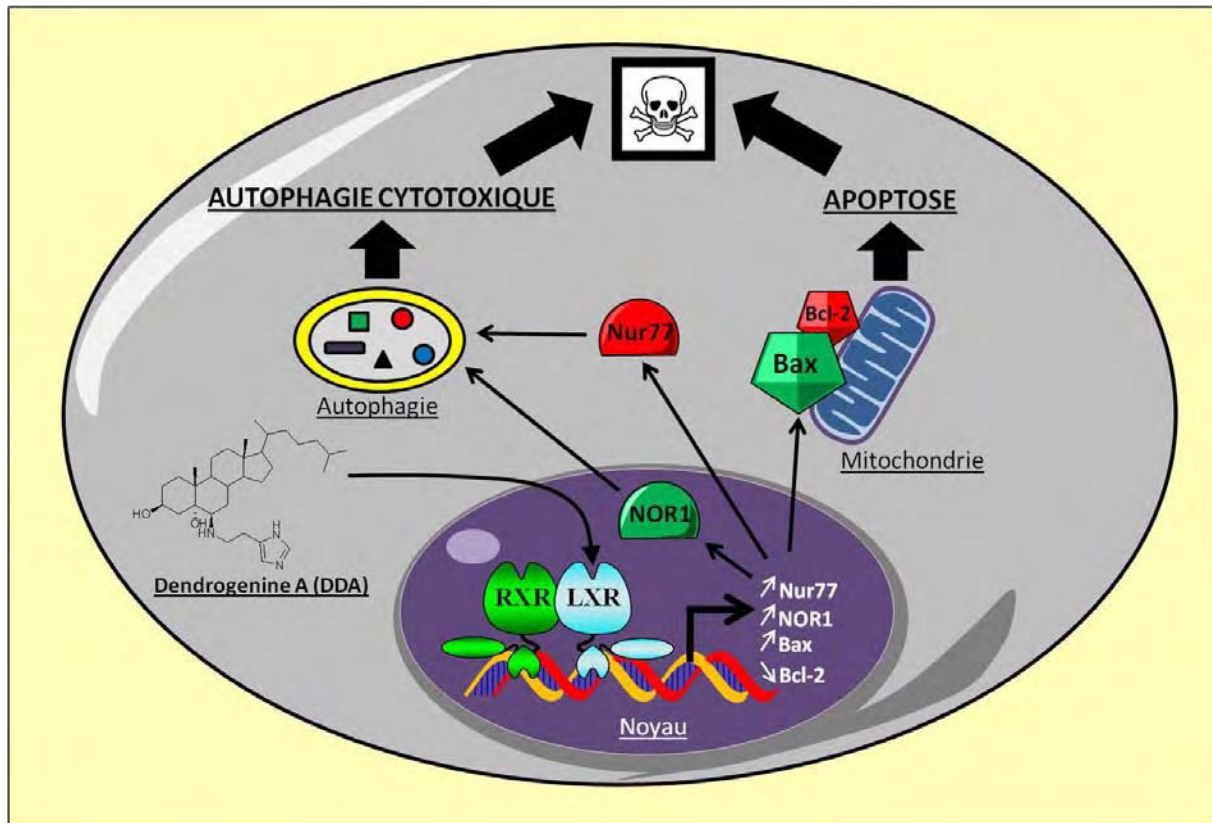


Figure 8 : Schéma du mécanisme de mort cellulaire induit par la DDA via son récepteur cible LXR β . Après s'être lié à LXR β , la DDA provoque une stimulation de l'expression de Bax et une inhibition de l'expression de Bcl-2. Cela augmente le ratio Bax/Bcl-2 qui déclenche une apoptose mitochondriale caspase-dépendante. La DDA provoque aussi une augmentation des expressions de Nur77 et de NOR1. NOR1 reste dans le noyau de la cellule alors que Nur77 est relocalisé dans le cytoplasme. NOR1 et Nur77 sont impliqués dans l'autophagie cytotoxique induite par la DDA. L'induction de l'apoptose et de l'autophagie cytotoxique par la DDA sont responsables de la mort des cellules cancéreuses.

Nous décrivons ici l'existence d'un ligand endogène des LXR β , la DDA, qui possède une forte activité anti-tumorale. Jusqu'ici, le ciblage des LXR β contre les cancers était centré sur la capacité des LXR β à contrôler l'homéostasie du cholestérol^{297, 437}. Dans ces études, l'effet anti-tumoral provoqué par l'activation des LXR β est causé par une perturbation de l'homéostasie du cholestérol conduisant à une déplétion du cholestérol intracellulaire. Au niveau de la membrane plasmique, la déplétion de cholestérol entraîne un défaut de formation de rafts qui sont nécessaires pour la fonctionnalité des voies de signalisation de la prolifération²⁹⁷. Cela provoque une inhibition des voies de survie qui favorise l'apoptose des

cellules cancéreuses. Le mécanisme que nous avons identifié fait intervenir une régulation des expressions de NOR1 et de Nur77 par LXR β qui entraîne une autophagie cytotoxique. LXR β contrôle donc l'expression de gènes impliqués dans un mécanisme de mort cellulaire. Jusqu'à présent, seuls Bax et Bcl-2 étaient connus pour être des cibles des LXRs¹²⁰. Cela suggère que les LXRs peuvent exercer un contrôle important de la survie cellulaire. Des ligands des LXRs, comme la DDA, pourraient donc être mis au point pour agir directement sur des voies de contrôle de la mort cellulaire plutôt qu'exercer une action cytotoxique indirecte en perturbant le métabolisme cellulaire du cholestérol.

NOR1 a déjà été caractérisé comme étant un gène cible des LXRs⁴⁶³ mais aucun lien n'avait jamais été établi entre les LXRs et la fonction suppresseur de tumeur de NOR1⁴⁶⁰. En considérant le lien fonctionnel qui avait été établi entre NOR1 et les LXRs au niveau du métabolisme énergétique dans les adipocytes⁴⁶³, et l'implication que nous décrivons de NOR1 dans l'autophagie, il existe peut-être une régulation du métabolisme énergétique par un contrôle de l'autophagie par ces deux types de récepteurs nucléaires. En effet, l'autophagie est un processus cellulaire catabolique qui permet la récupération d'énergie à partir de la dégradation de constituants cellulaires⁴⁶⁸. Elle est particulièrement induite lors de privations des cellules en énergie comme une déprivation en sérum du milieu de culture cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier dans ces conditions l'activité des LXRs et de NOR1 afin de comprendre leur implication dans l'induction de l'autophagie.

En conclusion, cette étude décrit la DDA, qui appartient à une nouvelle classe moléculaire retrouvée chez les mammifères (Article 5), comme un nouveau ligand endogène des LXRs avec des propriétés cytotoxiques dans les cellules de mélanome. Le mécanisme de mort cellulaire que nous avons identifié ouvre des perspectives d'étude de nouvelles voies exploitables en thérapie anti-cancéreuse, comme l'induction d'une autophagie cytotoxique en ciblant les LXRs ou en ciblant les récepteurs nucléaires NOR1 et Nur77.

Article 2

Importance de LXR β et des métabolites du cholestérol-5,6-époxyde dans l'induction par le tamoxifène de la biosynthèse de triglycérides et de la cytotoxicité dans des cellules cancéreuses mammaires

(en cours de soumission)

INTRODUCTION

Le site de liaison des antioestrogènes (AEBS = AntiEstrogen Binding Site) qui lie le tamoxifène est un complexe hétérodimérique formé par les enzymes cholestérogéniques 7-Déshydrocholestérol Réductase (DHCR7) et $\Delta 8, \Delta 7$ -3 β -Hydroxystéroïde Isomérase (D8D7I) qui sont des enzymes impliquées dans les étapes finales de la cholestérogénèse⁹³. AEBS porte une troisième activité enzymatique que nous avons identifiée en 2010 qui est la cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) qui catalyse l'hydrolyse du cholestérol-5,6-époxyde alpha (CE α) et du cholestérol-5,6-époxyde beta (CE β) en cholestane triol (CT) (Article 3)¹²¹. Les ligands d'AEBS, dont le tamoxifène, inhibent ces activités enzymatiques cholestérogéniques et ils provoquent une accumulation de stérols. L'oxydation des stérols accumulés produit des oxystérols qui sont impliqués dans la différenciation et la mort cellulaire de cellules cancéreuses mammaires^{116, 117}. L'induction de la différenciation cellulaire se traduit par une augmentation de la lipogénèse et de la sécrétion de triglycérides¹¹⁶.

Le mécanisme moléculaire par lequel les oxystérols accumulés sous l'effet des ligands d'AEBS induisent la différenciation et la mort cellulaire des cellules cancéreuses mammaires n'a pas été identifié. Le CE α est le produit majeur résultant de l'autoxydation du cholestérol. Les ligands d'AEBS stimulent l'oxydation des stérols et inhibent l'hydrolase du CE α , la ChEH, ce qui est en faveur d'une accumulation de CE α . Récemment, Berrodin *et al.* ont identifié le CE α comme un nouveau ligand des récepteurs nucléaires LXR α et LXR β ¹²⁶. Le ciblage bien caractérisé des LXRs par des oxystérols et l'implication des LXRs dans la régulation du métabolisme des stérols et dans la lipogénèse¹¹⁹ nous a amené à formuler l'hypothèse d'une régulation de LXR β , seul isoforme exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires, par les oxystérols accumulés sous l'effet des ligands d'AEBS. Ici, nous avons mis en évidence une régulation de l'activité transcriptionnelle de LXR β par les oxystérols

produits sous l'effet des ligands d'AEBS et caractérisé l'implication de LXR β dans les effets lipogéniques et cytotoxiques des ligands d'AEBS.

Importance of the liver-X-receptor- β and cholesterol-5,6-epoxide metabolites in the induction by tamoxifen of triglyceride biosynthesis and cytotoxicity in breast cancer cells.*

Segala G^{1,2}, de Medina P^{1,3}, Paillasse M R^{1,3}, Payre B⁴, Dalenc F^{1,2}, Jordan V C⁵, Record M^{1,2}, Silvente-Poirot S^{1,2}, and Poirot M^{1,2}.

¹from the UMR 1037 INSERM-University Toulouse III, Cancer Research Center of Toulouse, France

²Institut Claudius Regaud, Toulouse, France,

³Affichem, Toulouse, France.

⁴CMEAB, Toulouse, France

⁵Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington DC, USA.

*Running title: *Oxysterols are involved in the pharmacology of Tamoxifen*

To whom correspondence should be addressed: Marc Poirot and Sandrine Silvente-Poirot, Team "Sterol metabolism and therapeutic innovations in oncology", UMR 1037 INSERM-University Toulouse III, , Cancer Research Center of Toulouse, Institut Claudius Regaud, 20 rue du Pont Saint Pierre, 31052, Toulouse Cedex; France Tel: +33 561424648; Fax: +33 561424631; E-mails: marc.poirot@inserm.fr and poirot.sandrine@hotmail.fr

Keywords: epoxycholesterol, cholesterol epoxide, cholesterol oxide, sulfation, breast cancer, cell differentiation, AEBS, ChEH

Background: Tamoxifen induced TG biosynthesis and cytotoxicity at μ M concentrations in breast cancer cells through the stimulation of oxidative cholesterol metabolism.

Results: LXR β , 5,6 α -epoxy-cholesterol, 5,6 β -epoxy-cholesterol and 5,6 α -epoxy-cholesterol-3- β -sulfate accounted for Tam induced TG biosynthesis and cytotoxicity.

Conclusion: LXR β and 5,6-epoxy-cholesterol metabolites are involved in the pharmacology of Tamoxifen.

Significance: Cholesterol metabolism controls breast cancer cell sensitivity to Tamoxifen

SUMMARY

The microsomal antiestrogen binding site (AEBS) is a multifunctional complex incorporating both cholesterol biosynthesis enzymes and cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH). The AEBS was shown in breast cancer cells to be involved in Tamoxifen (Tam) induction of differentiation characteristics such as

triacylglycerol (TG) biosynthesis and cytotoxicity. The objective of the present study was to decipher the molecular mechanisms involved in these effects. We found that LXR β controlled the induction of TG biosynthesis and part of the cytotoxicity induced by Tam and by the selective AEBS ligand PBPE (N-pyrrolidino-(phenylmethoxy)-ethanamine, HCl) in MCF-7 cells. AEBS ligands induced the biosynthesis of 5,6 α -epoxy-cholesterol (5,6 α -EC), 5,6 β -epoxy-cholesterol (5,6 β -EC), and 5,6 α -epoxy-cholesterol-3 β -sulfate (5,6-ECS) due to the dual activation of cholesterol autoxidation and ChEH inhibition. 5,6 α -EC and 5,6 α -ECS stimulated LXR β -dependent TG biosynthesis and cytotoxicity. 5,6 β -EC induced LXR β -independent cytotoxicity. Knock-down of SULT2B1b in MCF-7 cells reduced their sensitivity to Tam, PBPE and 5,6 α -EC. Treatment of SULT2B1b-negative MDA-MB-231 breast cancer cells with Tam and PBPE induced the accumulation of 5,6 α -EC and 5,6 β -EC responsible for LXR-dependent TG biosynthesis and LXR-independent cytotoxicity respectively. Cells were sensitized to Tam and PBPE by re-expression of SULT2B1b or addition of 5,6-ECS. Altogether, these data showed that the LXR β , cholesterol autoxidation into 5,6 α -EC and 5,6 β -EC, and production of 5,6-ECS by SULT2B1b are implicated in the pharmacology of Tam and AEBS ligands in MCF-7 cells. This study delineates a novel signaling pathway that provides a new rationale to improve the clinical use of Tam and related compounds.

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women affecting more than 1 million women world-wide and with about 400 000 death due to this disease every year (1). Tamoxifen (Tam) is one of the major drugs used as an adjuvant treatment to prevent BC recurrence and as a

therapy to extend the lives of patients with metastatic disease (2). The rationale for its clinical use was the blockage of the mitogenic action 17 β -estradiol (E2) and the modulation of the expression of ER-responsive genes (3). In clinical practice, the levels of the estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) protein expression are the only predictors used to assess the response to Tam (4). However, 25% of ER+/PR+ tumors, 66% of ER+/PR- tumors, and 55% of ER-/PR+ tumors fail to respond to Tam treatment (5). Today, the identification of new host and tumor characteristics that enable the selection of the optimal therapy for an individual patient in the clinic remains a challenge. The mechanisms responsible for these treatment failures and the risks recurrence remain unclear indicating that other targets have to be identified that may help to improve the efficacy of current treatments and to develop new anticancer compounds. The microsomal antiestrogen binding site (AEBS) is one of the supplementary targets of Tam (6) initially reported to be involved in the cytotoxicity of its cognate ligands (7,8). The AEBS has no affinity for estrogens, but binds selective ER modulators (SERMs) such as Tam, cloniphene, raloxifene, and 4-OH-Tam with nanomolar affinities (6, 9, 10). The AEBS selectively binds diphenylmethane (DPM) derivatives of Tam, such as (4-benzyl-phenoxy)-ethyl-N-pyrrolidine (PBPE) and toremifene. DPMs represent interesting pharmacological tools to study the AEBS since they have no impact on other pharmacological targets of Tam such as the ER, acyl-coA: cholesterol acyl transferase (ACAT) and protein kinase C (6). The use of DPMs in addition to Tam and SERMs enabled us to show that the AEBS was a hetero-oligomeric and multifunctional complex involved both in cholesterol biosynthesis (11) and cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) activity (10). ChEH catalyze to the trans-hydration of 5,6 α -epoxy cholesterol (5,6 α -EC) and 5,6 β -epoxy cholesterol (5,6 β -EC)

into cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) (12). SERMs and DPMS stimulate the intracellular accumulation of cholesterol precursors through the non-competitive inhibition of cholesterogenic enzymes involved in the AEBS (11). We showed that free sterol accumulation was associated with a cytoprotective macroautophagy highlighting a possible molecular mechanism elucidating resistance to Tam (7, 9). SERMs and DPMS stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) that are necessary for the induction of cell differentiation characteristics such as the biosynthesis of triacyl glycerol (TG), the major lipid found in milk, and ROS are necessary to induce cytotoxicity. The importance of ROS production in these effects was established since the lipophilic antioxidant Vitamin E (Vit E, α -tocopherol) blocked ROS production and inhibited the induction of breast cancer cell differentiation characteristics including TG biosynthesis (7, 9, 13, 14) and cytotoxicity (7, 9, 13-17). Interestingly the inhibition by Vit E of Tam induced cytotoxicity observed with ER negative breast cancer cell lines (7, 9, 13-17) and the modulation of cholesterol metabolism in these cells was observed with AEBS ligands (7, 11, 14). The relevance of our observations was supported by a clinical study from Pitroda *et al* who observed an up-regulation at the transcriptional level of a set of 38 genes involved in cholesterol and lipid metabolism associated with resistance to Tam in ER(+) BC patients, suggesting that the nuclear oxysterol receptors Liver-X-Receptor (LXRs) could be at the center of this cluster of regulation (18). Studies of breast cancer cells xenografted into mice have established that a loss of lipoxygenase activity was linked to acquired resistance to Tam (19). Reactive oxygen species (ROS) produced by lipoxygenase and peroxidation have been shown to induce cholesterol oxidation to a mixture of 5,6 α - and 5,6 β -epoxides of cholesterol (5,6 α -EC and 5,6 β -EC) in a 1:3 and 3:2 ratio respectively and their production was inhibited by the

lipophilic antioxidant Vit E (12). AEBS ligands from the different structural classes, at therapeutic and pharmacologically active concentrations, were shown to competitively inhibit CHEH from rat liver microsomes, which led to the accumulation of 5,6-EC and the blockage of cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) production (10). 5,6-EC are among the major oxidation products of cholesterol and, as opposed to other epoxide bearing substances, they are chemically stable in complex media (20). Interestingly, 5,6 α -EC has been reported to be a modulators of liver-X-receptors (LXR) (21) whereas its sulfated metabolite 5,6 α -epoxy-cholesterol-3 β -sulfate (5,6-ECS) was reported to be an antagonist on a reporter gene responsive to LXR (22, 23). LXRs are oxysterol receptors that are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors and are mainly involved in metabolic homeostasis and inflammation (24, 25). LXRs exist as two isoforms, LXR α (NR1H3), which is mainly expressed in the liver, in macrophages and in the intestine of mammals, and LXR β (NR1H2), which is ubiquitous (26). LXR β was reported to be the predominant isoform at the mRNA level in both MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells (27).

The present study was carried out to determine the role of LXR β in the pharmacological activity of Tam and AEBS ligands in breast cancer cells and to determine which oxysterols were involved in these effect.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and reagents-PBPE, MBPE, PCPE, MCPE were synthesized as previously described (28) as was bazedoxifene (29). Raloxifene was a kind gift from Dr P van de Velde (Aventis, Romainville, France). 5,6-EC, d7-5,6-EC and [14 C]-5,6-EC were synthesized as

described previously (10, 30). All other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Cell culture-MCF-7 and MDA-MB-231 cells were from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured until passage 30. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin (50 U/ml) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Luciferase assay-One day after seeding in 100 mm-dishes, MCF-7 cells were transfected with the LXRE-luciferase construct using the polyethyleneimine (PEI) methodology (31). For each dish, a transfection solution with 4.3 µg of PEI and 5 µg of the construct in 2 ml of OptiMEM was prepared and incubated with cells. After 5 hours, the medium was replaced by RPMI 1640 with 5% FCS. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. One day after transfection, cells were seeded in 12-well plates (50,000 cells/well) in RPMI 1640 with 5% FCS. After 4 hours, the cells were treated with the test compounds dissolved in ethanol. Before treatment with the test compounds the medium was replaced by phenol red-free medium without FCS. At the end of the treatment, the cells were lysed in 100 µl of passive lysis buffer (Promega, Charbonnières, France). Luciferase (Luc) activity was measured using the Luc assay reagent (Promega), according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were measured using the Bradford technique to normalize the Luc activity data as reported earlier (32). For each condition, the mean Luc activity was calculated from the data of three independent wells.

Western blotting-Immunoblotting was carried out as previously described (7). Proteins were separated on 10% SDS-PAGE gels, electro-transferred onto PVDF membranes and incubated overnight at 4°C

with goat anti-LXRβ (Santa Cruz) or anti-SULT2B1b (Abcam) or anti-Actin (Millipore). Visualization was carried out using an ECL plus kit (Pierce), and chemiluminescence was detected by autoradiography (Amersham Biosciences).

RNA isolation and qPCR analysis-Total RNA was extracted from cultured cells using an RNA Extraction kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. For sequences see supplementary Table 1. First-strand cDNA was synthesized with iScript Reverse Transcriptase (Bio-Rad). 25 ng of cDNA were amplified using SyBR Supermix (Bio-Rad). Quantitative PCR analyses were performed on an iCycler (Bio-Rad). Threshold cycle (Ct) values of genes of interest were normalized with Ct values of GAPDH.

siRNA transfection-Gene expression of endogenous LXRβ or SULT2B1b was suppressed with a pool of 4 siRNAs for LXRβ (siLXRβ, Dharmacon, M-003412) or 4 siRNAs for SULT2B1b (siSULT2B1b, Dharmacon) along with a control scrambled sequence siRNA (siSC, Dharmacon, D-001210-03). MCF-7 cells were seeded in 100 mm-dishes in RPMI medium containing 5% FBS. After 24 h of seeding, cells were transfected in Opti-MEM with 50 nM siSC, siLXRβ or siSULT2B1b using DharmaFECT1 (Dharmacon, T-2001) following the procedure recommended by the manufacturer. After transfection, the cells were grown in RPMI 1640 5% FCS at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Transfection of MDA-MB-231 cell with SULT2B1b- One day after seeding in 100 mm-dishes, MDA-MB-231 cells were transfected with the construct pCMV6-XL5-SULT2B1b (SULT2B1b) (SC123353, Origene) or the empty pCMV6-XL5 (Mock) using the polyethyleneimine (PEI) methodology (31). For each dish, a transfection solution with 4.3 µg of PEI and 5 µg of the construct in 2 ml of OptiMEM was prepared and incubated with cells.

After 5 hours, the medium was replaced by RPMI 1640 with 5% FCS. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. One day after transfection, cells were seeded in 12-well plates (50,000 cells/well) in RPMI 1640 with 5% FCS and grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Oil Red O and filipin staining procedures-Cells were grown on glass coverslips and treated with drugs for 48 h and then fixed with 3.7% paraformaldehyde for 1 h at room temperature followed by washing twice with PBS (Euromedex) and stained with Oil red O (ORO) in 60% (v/v) isopropyl alcohol, and in hematoxylin. Quantifications of lipid accumulation were done as exactly as previously reported (14). For filipin staining, the cells grown on glass coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 15 min at room temperature followed by washing twice with PBS (Euromedex). Cells were stained with filipin (50 mg/ml) for 75 min at room temperature and washed twice with PBS. The glass coverslips were mounted onto slides using Mowiol as a mounting medium. Analyses were carried out by fluorescent microscopy using a Zeiss LSM 510 microscope (Zeiss). TG quantification was done as described previously (14). Filipin fluorescence was analyzed one day after staining by taking images at x40 magnification and 5 second exposures using MetaMorph Image Analysis Software (Universal imaging) and a Photometrics Cool Snap HQ camera coupled to a fluorescent microscope (Zeiss Axiovert 200). All values were normalized to the background fluorescence of the corresponding image.

Transmission electron microscopy-Cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1M Sorensen's phosphate buffer (pH 7.4) for 1h and washed with the Sorensen's phosphate buffer (0.1M) for 12h. The cells were then post-fixed with 1% OsO₄ in Sorensen's phosphate buffer (Sorensen's phosphate 0.05M, glucose 0.25M, OsO₄ 1%) for 1h. The cells were then washed

twice with distilled water, and pre-stained with an aqueous solution of 2% uranyl acetate for 12h. Samples were then treated exactly as previously described (14).

Cell death assays-Cells were seeded in RPMI 1640 with 5% FBS into 6-well plates at 100,000 cells per well. The cells were then treated with solvent vehicle (0.1% ethanol), 10 μM Tam or 40 μM PBPE for 2 or 3 days respectively. Cell death was determined by the trypan blue exclusion assay. The cells were scraped and resuspended in the trypan blue solution (0.25% (w/v) in PBS) and counted in a Malassez cell under a light microscope.

Detection and quantification of 5,6-EC-Cells were grown to 70% confluence, and then pre-treated for 30 min with the appropriate amount of drug or solvent vehicle in the presence or absence of 500 μM Vit E. After a 48 hr incubation, the cells were washed and scraped in cold PBS and the neutral lipids were extracted with chloroform/methanol/8.8% aqueous KCl (2:1:1 v/v) as reported previously (33). The organic phase was evaporated to dryness under a nitrogen flux and the residues dissolved in 50 μl of ethanol. 10⁸ cells were used for analysis. Quantification of 5,6-EC diastereoisomers was carried out using stable isotope dilution mass spectrometry according to a previously published procedure using deuterated 5,6α-EC and 5,6β-EC as external standards (34).

Cholesterol oxidation analysis-MCF-7 cells were seeded in 100 mm plates at 0.5 million, then incubated with [¹⁴C]-5,6-EC (final concentration 0.6 μM; 20 μCi/μmol) in the presence of solvent vehicle (EtOH 0.1%), 5 μM Tam for 72 hours. The cells were then scraped and pelleted by centrifugation for 10 min at 1500 rpm, and then extracted in the conditions described above. Samples were spotted on Fluka 20x20 silica gel plates previously heated for 1h at 100°C and developed using chloroform/acetone/MeOH/2/acetic acid/H₂O (8/4/2/2/1). The radioactive metabolites were identified and quantified on TLC plates either

by using a GP storage phosphor screen (GE Healthcare) and a phosphorimager (STORM 840, GE Healthcare; the peak integration was obtained by using ImageQuant 5.2 software) or by liquid scintillation counting of the 5,6-EC region. The Rf for 5,6-EC, CT and 5,6-ECS were 0.94, 0.82 and 0.56 respectively.

Measurement of ChEH activity- Cells were seeded in 6-well plates (100,000 cells/well) in RPMI 1640 medium with 5% FCS. Cells were incubated for 24 h with 0.6 μ M [14 C]-5,6 α -EC in the presence of increasing concentrations of drugs. Cells were scraped, resuspended in PBS and pelleted by centrifugation 10 min at 800 g and then extracted with 200 μ l of chloroform/methanol (2:1). The organic layer was reduced to dryness under a flux of nitrogen, and the residue was resuspended in 30 μ l of ethanol. More than 95% of the radioactivity was recovered in the organic layers. Samples were applied to TLC plates that had been heated previously for 1 h at 100°C and were developed using ethyl acetate. The regions corresponding to authentic 5,6-EC and CT standards were visualized by iodine vapor. Radioactive metabolites were visualized using a Storm apparatus (GE Healthcare) and quantified by densitometry with the software ImageQuant (GE Healthcare). The concentration of a compound required to inhibit ACAT by 50% (IC₅₀) was calculated using Prism software, version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The IC₅₀ values were calculated with data from triplicate assays at each drug concentration.

Synthesis of oxysterol-sulfates-5,6 α -epoxy-5 α -cholestestan-3 β -sulfate (5,6-ECS) and cholestane-5 α ,6 β -diol-3 β -sulfate (CTS) were synthesized using a published method (23). The purity of the synthesized steroids was determined by thin-layer chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and mass spectrometry and was greater than 95%.

Biosynthesis of oxysterol-sulfates in cells-0.5 x 10⁶ cells were incubated with [14 C]-5,6 α -EC (final concentration 0.6 μ M; 20 μ Ci/ μ mol) in the presence of solvent vehicle (EtOH 0.1%), 5 μ M Tam or 10 μ M PBPE for 72 hours. The cells were then scraped and pelleted by centrifugation for 10

min at 1500 rpm, and then extracted under the conditions previously described for 5,6-EC. Samples were spotted onto Fluka 20x20 silica gel plates previously heated 1h at 100°C and developed using chloroform/acetone/MeOH:2/acetic acid:H₂O (8/4/2/2/1). The radioactive metabolites were identified and quantified as described above. The Rf for 5,6-EC, CT, 5,6-ECS and CTS were 0.94, 0.82, 0.56 and 0.46 respectively.

Statistical analysis-Values are the mean \pm S.E. of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analysis was carried out using a Student's *t*-test for unpaired variables. * and ** in the figures refer to statistical probabilities (P) of <0.001 and <0.0001, respectively, compared with control cells that received solvent vehicle alone.

RESULTS.

Tam and AEBS ligands induced an indirect stimulation of LXR-dependent reporter gene expression-We found that LXR β was the predominant LXR isoform in MCF-7 cells and that LXR α was only weakly detected by qPCR confirming the measurement of Holbeck *et al* (27). MCF-7 cells were transfected with a plasmid encoding a Luc gene under the control of a promoter containing an LXR-response element (LXRE). We found that the LXR agonist T0901317 stimulated Luc activity after 6 hours of treatment with a maximum at 12 hours, and then Luc activity decreased. Tam and the selective AEBS ligand PBPE stimulated Luc activity after a 30 hours delay with a maximum at 36 hours (Fig. 1a). We then showed that both Tam and PBPE dose-dependently stimulated Luc activity with EC₅₀ values of 1.5 \pm 0.3 μ M and 2.6 \pm 0.4 μ M respectively at 36 hours of treatment (Fig. 1b). The knock-down of LXR β in MCF-7 cells diminished MCF-7 cell viability (Fig. 1c) and led to a 75% decrease in LXR β expression (Fig. 1d,

insert), decreased the stimulation of Luc activity by drugs by 70 % (Fig. 1d). Altogether these data established that Tam and AEBS ligands modulated the expression of Luc activity through a mechanism that required LXR β .

Importance of LXR β in the cellular response to AEBS/ChEH ligands in MCF-7 cells- We had previously shown that the treatment of MCF-7 cells with AEBS ligands at cytostatic concentrations (5 μ M Tam, 10 μ M PBPE for 48 hr) induced the accumulation of neutral lipids stained by Oil Red O (ORO) corresponding to an increase in TG biosynthesis, and also induced the accumulation of free sterols revealed by filipin staining (9, 14). We report here that knock-down of LXR β drastically inhibited the appearance of ORO-positive vesicles and increased the accumulation of free sterols (Fig. 2a), as judge by the increase in filipin fluorescence, induced by AEBS ligands, thus establishing the involvement of LXR β in these effects. Lipid analysis showed that knock-down of LXR β inhibited the production of TG (Fig 2b). Higher concentrations of drugs (10 μ M Tam, 40 μ M PBPE for 48 hr) led to cytotoxicity. Knock-down of LXR β decreased the cytotoxicity of Tam and PBPE (Fig. 2c) as did the LXR agonist T0901317 (Fig. 2d) underlining the importance of LXR and ChEH in the induction of MCF-7 cells death by Tam and AEBS/ChEH ligands. We next established that Tam and PBPE modulated the transcription of several endogenous LXR responsive genes (Fig. 2e). Tam and PBPE stimulate the expression of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 (SCD1) and Acetyl-Coenzyme A Carboxylase (ACC), that are involved in TG biosynthesis and increased the expression of the low density lipoprotein receptor (LDLR). Tam and PBPE had no impact on SREBP1c expression, down-regulated the expression of the ATP binding cassettes ABCA1 and ABCG1 (both involved in cholesterol

efflux), and of the scavenger receptor CD36 (involved in the uptake of oxidized lipoproteins). This modulation is LXR β -dependent since it was blocked by knock-down of LXR β (Fig. 2e). Altogether, these data established the role of LXR β in the induction of TG biosynthesis, which is a characteristic of differentiation in MCF-7 cells (14), and partially alleviates the induction of MCF-7 cells death by Tam and PBPE. Thus the importance of LXR β and of the AEBS/ChEH in the cellular effects of Tam and PBPE was confirmed.

In MCF-7 cells Tam and PBPE induced the production of 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 5,6-ECs that are involved in TG biosynthesis and cytotoxicity of AEBS/ChEH ligands- We previously established that Vit E, but not other antioxidants such as butylated hydroxy toluene and N-acetyl-cysteine, inhibited the induction of MCF-7 cell death and differentiation by Tam and PBPE (7, 14). Vit E is known to inhibit the production of 5,6 α -EC and 5,6 β -EC (12), and 5,6 α -EC has been reported to be a LXR modulator (21). As shown in Fig. 3a, MCF-7 cells produced a low amount of 5,6-EC at the basal level and it decreased in the presence of Vit E. Tam drastically stimulated the accumulation of 5,6 α -EC (6.28 ± 0.32 nmol/ 10^6 cells) and 5,6 β -EC (21.04 ± 0.41 nmol/ 10^6 cells) after 20 hours of treatment (Fig. 3a). The same observation was made with the selective AEBS/ChEH ligand PBPE (7.12 ± 0.28 nmol/ 10^6 cells of 5,6 α -EC and 19.85 ± 0.18 nmol/ 10^6 cells of 5,6 β -EC) (Fig. 3a). The stimulation of 5,6-EC production by Tam and PBPE was inhibited by Vit E (Fig. 3a). We previously established that MCF-7 cells possessed ChEH activity indicating that 5,6-EC were extensively hydrated into CT (Fig. 3a). As can be seen in Fig. 3b, Tam and PBPE inhibited ChEH activity in MCF-7 cells in a concentration-dependent manner giving IC $_{50}$ of 52 ± 8 nM and 1.45 ± 12 μ M respectively. MCF-7 cells have been reported to over-express the sterol

sulfotransferase (SULT2B1b), and 5,6 α -EC was shown to be the preferred substrate of this enzyme (35) suggesting that 5,6 α -epoxy-5 α -cholestestan-3 β -sulfate (5,6-ECS) can be produced in MCF-7 cells when 5,6-EC accumulated. Using chromatographic conditions adapted to monitor 5,6-EC, CT and their sulfated esters 5,6-ECS and CTS, it can be seen (Fig. 3c) that 5,6-EC were not metabolized into 5,6-ECS but CT was sulfonated into CTS. Treatment of cells with Tam and PBPE inhibited the formation of CT and CTS and stimulate the accumulation of both 5,6-EC and 5,6-ECS (Fig. 3c). 5,6-EC metabolites were then tested on LXR-dependent reporter Luc activity and 5,6 α -EC was the only one that stimulated Luc activity with an EC₅₀ of 12.2 ± 0.8 μ M compared to 0.89 ± 0.5 μ M for the LXR agonist T0901317. 5,6 β -EC, CT, CTS and 5,6-ECS did not stimulate Luc activity up to 40 μ M. 5,6-ECS, but not 5,6-CTS, blocked the stimulation of Luc activity by T0901317, 5,6 α -EC. Tam and PBPE (Fig. 3d) confirming its antagonist activity on LXR β when tested with a LXRE-Luc reporting activity (23). Co-treatment with Vit E did not affect the agonist or antagonist activity of 5,6-EC and 5,6-ECS measured 12 hr after treatment (Fig. 3e), supporting a direct modulation of LXR β . By contrast, Vit E inhibited the stimulation by Tam and PBPE at 30 hr of treatment supporting an indirect stimulation through the endogenous production of an LXR agonist (Fig. 3e). Co-treatment with CT or 5,6-CTS did not affect the stimulation by T0901317, 5,6 α -EC. Tam or PBPE of LXR-dependent Luc activity while 5,6-ECS inhibited this stimulation (Fig. 3f). We showed in Fig. 3g that Tam and PBPE induced a LXR-dependent mixed agonist/antagonist activity on several LXR-responsive genes. This modulatory activity was inhibited by Vit E, supporting the involvement of 5,6-EC and 5,6-ECS in the effects of AEBS/ChEII ligands. 5,6-EC and 5,6-ECS modulated differently the expression of several endogenous LXR-

responsive genes (Fig. 4a). 5,6-EC and 5,6-ECS stimulated the expression of the lipogenic genes SCD1 and ACC but have no impact on the expression of SREBP1c. We next tested the 5,6-EC and their metabolites found in MCF-7 cells on TG biosynthesis and showed that both 5,6 α -EC and 5,6-ECS stimulated TG biosynthesis whereas 5,6 β -EC was ineffective (Fig. 4b). Tam and PBPE stimulated TG biosynthesis and co-treatment with 5,6 α -EC and 5,6-ECS, but not 5,6 β -EC, induced an overstimulation of TG biosynthesis consistently with the inhibition of ChEH (Fig. 4b). The oxysterols were cytotoxic according the following order of magnitude: 5,6 β -EC > 5,6-ECS > 5,6 α -EC at 72 hr, with 5,6 β -EC being the most toxic oxysterol of the series (Fig. 4c). Co-treatment of MCF-7 cells with 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 5,6-ECS and Tam or PBPE increased cytotoxicity indicating that blockage of ChEH activity by Tam and PBPE inhibited their degradation into less active metabolites (Fig. 4c). Ultrastructure analysis of MCF-7 cells by electron microscopy showed that 5,6-ECS induced the accumulation of unilamellar vesicles (UV) (Fig. 4d) consistently with the increase of TG biosynthesis we measured (Fig. 4b). Treatment with Tam induced the accumulation multilamellar bodies (MLB), which is due to the accumulation of free sterols as a consequence of the inhibition of cholesterologenic enzymes involved in the AEBS complex (7, 11, 14) and the concomitant accumulation of sphingomyelin (7, 14). Co-treatment with Tam and 5,6-ECS strongly stimulated the accumulation of large MLB suggesting an increase in the accumulation of free sterols and sphingolipids (Fig. 4d). The same observation was made on MCF-7 co-treated with 5,6-ECS and PBPE (data not shown). Knock-down of LXR β decreased the cytotoxicity of 5,6 α -EC and 5,6-ECS but had no impact on the cytotoxicity of 5,6 β -EC which showed that the cytotoxicity of 5,6 α -EC is controlled by LXR β while that

of 5,6 β -EC is not (Fig. 4c). Knock-down of SULT2B1b using an siRNA approach decreased the cytotoxicity of Tam and PBPE (Fig. 4f), establishing the importance SULT2B1b in the cytotoxicity of these drugs. The knock-down of SULT2B1b blocked the cytotoxicity of 5,6 α -EC but did not significantly affect the cytotoxicity of 5,6 β -EC (Fig. 4g). The effect of SULT2B1b knock-down on Tam and PBPE cytotoxicity did not exceed that which was found with LXR β knock-down establishing that 5,6-ECS was responsible for the LXR-dependent induction of Tam and PBPE cytotoxicity. Altogether, these data established Tam and PBPE stimulated the oxidation of cholesterol into 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS in MCF-7 cells. 5,6 α -EC and 5,6-ECS stimulated TG biosynthesis and part of the cytotoxicity of Tam and PBPE in an LXR β -dependent manner while 5,6 β -EC did not induce TG biosynthesis and its cytotoxicity was LXR-independent.

AEBS/ChEH ligands of different structural and pharmacological classes had similar effects on MCF-7 cells as Tam and PBPE. MCF-7 cells were treated with other AEBS/ChEH ligands and they were potent inducers of 5,6-EC and 5,6-ECS accumulation (Table 1). Drugs inhibited ChEH, stimulated lipogenesis and the accumulation of free sterols in cells (Table 1). Other SERMs such as raloxifene and clomiphene had a similar effect as Tam but interestingly bazedoxifene was an antagonist of T0901317 on LXRE-Luc activity and stimulated more 5,6-ECS production than other SERMs. Other pharmacological classes of drugs known to be AEBS ligands were inhibitors of ChEH and induced the same characteristics as the prototypical AEBS ligands Tam and PBPE. Cholesterol biosynthesis inhibitors U-18666A, Triparanol and AY-9944, sigma receptor ligands BD-1008 and SR-31747A and tricyclic antidepressants such as trifluoperazine, flupenthixol and chlorpromazine showed similar

characteristics as Tam and PBPE on MCF-7 cells and were inhibitors of ChEH (Table 1). It is noticeable that 4OHTam, RU-39411, U-18666A and triparanol induced a more robust coloration of MCF-7 cells with ORO and filipin than other tested compounds. These drugs are inhibitors of DIICR24 leading to the accumulation of desmosterol as a free sterol in cells (11, 36) and desmosterol has been shown to be a direct modulator of LXRs (37) indicating that these drugs can modulate LXR independently of 5,6-EC production. 17 β -Estradiol (E2) had no effect on the production of 5,6-EC and other events, showing that the estrogen receptor pathway was not involved. The stimulation of 5,6-EC metabolite biosynthesis, lipogenesis and the modulation of LXR-responsive reporter gene expression were blocked by Vit E as observed with Tam and PBPE, establishing that other AEBS ligands were acting by a similar mechanism. Altogether, these data established that AEBS/ChEH ligands stimulated the production of 5,6-EC diastereoisomers while Vit E blocked their biosynthesis. Treatment of cells with Tam or PBPE inhibited ChEH in MCF-7 cells, decreased CT production, and stimulated the production of 5,6-ECS. We established that 5,6 α -EC and 5,6-ECS stimulated TG production in MCF-7 cells while the most toxic oxysterols of the series were 5,6 β -EC and 5,6-ECS. Altogether these data established that AEBS/ChEH ligands belonging to different structural classes induced similar effects than Tam and PBPE in MCF-7 cells.

Effect of Tam and PBPE on MDA-MB-231 cells. We next investigated the effect of Tam and PBPE on MDA-MB-231 cells, which are a model of ER(-) breast cancer known to be less sensitive to Tam than MCF-7 cells (38). A transcriptomic analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells on selected genes involved in the control of lipid metabolism and ChEH activity is shown in Fig. 5a. We found that LXR β was

the predominant LXR isoform in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The ChEH subunits D8D7I and DHCR7 were expressed in both cell lines although a slightly weaker expression of the regulatory subunit DHCR7 was found in the MDA-MB-231 cells. SREBP1c, ACC, SCD1 were highly and equally expressed in both cell lines. The cholesterol transporter ABCA1 was more expressed in MDA-MB-231 than in MCF-7 cells, while the ABCG1 was less expressed in MDA-MB-231 than in MCF-7 cells. Transporters involved in the uptake of lipids associated to lipoproteins such as LDLR was found equally expressed in both cell lines while the scavenger receptor CD36 was found in MCF-7 cells but only weakly expressed in MDA-MB-231 cells. Interestingly, SULT2B1b was expressed in MCF-7 cells but not in MDA-MB-231 cells whereas the steroid and sterol sulfatase (STS) was equally expressed in both cell lines (Fig. 5a). The absence of SULT2B1b was confirmed at the protein level (Fig. 6d) establishing that MDA-MB-231 cells were SULT2B1b negative. Seventy two hours exposure of MDA-MB-231 cells to 10 μ M Tam and 40 μ M PBPE produced cell death that was inhibited by Vit E (Fig. 5b). This confirmed the earlier findings of Mandekar *et al* for Tam (16) and established a similar effect for PBPE. Tam and PBPE stimulated the biosynthesis of 5,6-EC in MDA-MB-231 cells and this effect was blocked by Vit E (Fig 5c). Tam and PBPE induced the accumulation of ORO positive vesicles indicating an accumulation of neutral lipids (Fig 5d). The accumulation of free sterols due to the inhibition of the catalytic activity of AEBS subunits involved in cholesterol biosynthesis (11) was shown by filipin staining (Fig 5d). Ultrastructure analysis established that Tam and PBPE induced the accumulation of multilamellar bodies (MLB) attributable to the accumulation and stacking of free sterols and sphingomyelin, and of unilamellar vesicles (UV) corresponding to TG vesicles (Fig. 5d).

Knock-down of LXR β or treatment with Vit E inhibited the stimulation of ORO positive vesicles (Fig. 5c) and TG biosynthesis (Fig. 5f) by Tam and PBPE. Knock-down of LXR β increased the accumulation of free sterols in cells as judged by the increase in filipin staining (Fig 5e). We next found that Vit E blocked the induction of TG biosynthesis by Tam and PBPE (Fig 5f) but had no impact on filipin labeling (fig 5g). qPCR analysis showed that Tam and PBPE stimulated both SCD1 and ACC and down-regulated SREBP1c. They down-regulated ABCA1 and ABCG1, up-regulated LDLR and down-regulated the expression of CD36 (Fig 5h). These data established that TAM and PBPE induced 5,6-EC production through autoxidation, stimulate TG biosynthesis in an LXR-dependent manner and cytotoxicity in an LXR-independent manner in MDA-MB-231 cells.

Effect of Tam and PBPE on 5,6-EC metabolism in MDA-MB-231 cells, importance of SULT2B1b and LXR β
Analysis of the metabolism of 5,6-EC in MDA-MB-231 cells showed that 5,6-EC were hydrated into CT but no CTS production was detected (Fig. 6a), consistent with the absence of SULT2B1b at the mRNA (Fig. 5a) and protein level (Fig. 6d). Tam and PBPE inhibited ChEH (Fig. 6a) as observed in MCF-7 cells but there was no production of 5,6-ECS in MDA-MB-231 cells. 5,6 α -EC and 5,6-ECS gave a similar profile of regulation of gene expression (Fig. 6b). Analyses of cytotoxicity showed that 5,6-ECS and 5,6 β -EC were cytotoxic on these cells whereas 5,6 α -EC was only weakly cytotoxic (Fig. 6c). Co-treatment with Tam and PBPE showed no potentiation of the cytotoxicity of 5,6-EC but considerably stimulated the effect of 5,6-ECS (Fig. 6c). The re-expression of SULT2B1b in MDA-MB-231 cells by transient transfection with a plasmid encoding the enzyme and the addition 5,6-ECS gave an increased sensitization of the cells to 5,6 α -EC. Tam

and PBPE (Fig 6d) strongly suggesting the importance of this metabolism in Tam and PBPE cytotoxicity. LXR β was knock-down in MDA-MB-231 cells, and as observed in MCF-7 cells, the absence of LXR β affected cell viability (Fig 6e) and sensitized the cells to 5,6 α -EC and 5,6-ECS but not to 5,6 β -EC, thus establishing the importance of LXR β in 5,6 α -EC and 5,6-ECS cytotoxicity in this cell line. Altogether these data established that Tam and PBPE induced 5,6-EC biosynthesis but not that of 5,6-ECS in MDA-MB-231 cells that are SULT2B1B negative. Tam induced TG accumulation but no LXR β -dependent control of cytotoxicity was found highlighting the importance of SULT2B1B and 5,6-ECS in this aspect. Moreover, 5,6 β -EC and 5,6-ECS sensitized them to Tam and PBPE.

DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the possible involvement of the oxysterol receptor LXR β in the induction of TG biosynthesis, which is a major characteristic of breast cancer cell differentiation (14), and in the induction of cytotoxicity by submicromolar concentrations of Tam and PBPE (a selective AEBS/ChEH ligand). We established that Tam and AEBS ligands induced the modulation of a reporter gene as well as endogenous genes involved in TG biosynthesis in a LXR β -dependent manner. The importance of LXR β was confirmed by showing that the invalidation of LXR β blocked the stimulation of TG production by Tam and PBPE in two different breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA-MB-231. The invalidation of LXR β partially protected MCF-7 cells against the cytotoxicity of micromolar concentration of Tam and PBPE. The AEBS ligands stimulated the oxidation of cholesterol into 5,6-EC diastereoisomers in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The production of 5,6-EC

isomers in cells is in the 1:3 (α : β) range suggests that it could occur through a lipoperoxidation mechanism, which is consistent with the inhibition of 5,6-EC production by Vit E that occurred. The fact that a loss of lipoxygenase activity has been found *in vivo* associated with acquired resistance to Tam (19) is consistent with our observations. We found that 5,6 β -EC accounted for 80% of the cytotoxicity blocked by Vit E in MCF-7 cells and 100 % in MDA-MB-231. 20 % of the cytotoxicity was attributable to 5,6-ECS and LXR β in MCF-7 cells. Tam and PBPE inhibited ChEH activity contributing to the intracellular accumulation of 5,6-EC. Two diastereoisomers were produced and are known to show different biological properties and metabolic fates (12). We established that the 5,6-EC was metabolized into 5,6-ECS and that the inhibition of ChEH by AEBS ligands blocked the production of CT and CTS. 5,6-ECS was proposed to be an antagonist of LXR-responsive genes based on reporter gene responsiveness to LXR (23). Although we confirmed the antagonist action of 5,6-ECS on a reporter gene transfected into MCF-7 cells, we found that 5,6-ECS acted as modulator rather than an antagonist to endogenous LXR-responsive genes and stimulated the expression of lipogenic genes whereas it down-regulated ABCA1 and ABCG1 in an LXR β -dependent manner. Vit E inhibited the production of 5,6-EC establishing that 5,6-EC and their metabolite 5,6-ECS are involved in the pharmacology of Tam and AEBS ligands. This new mechanism explained earlier observations in which ER-independent effects of Tam were reported, such as the down-regulation of the expression of the scavenger receptor CD36 in normal and neoplastic human breast tissue (39). Several groups have shown that Vit E blocked the cytotoxicity of Tam on breast cancer cell lines such as MCF-7 cells and MDA-MB-231 (7, 14-16) and the mechanism described here gives a rationale to explain these effects.

Fig. 7 provides a scheme describing the molecular mechanisms of action of Tam and PBPE in the stimulation of TG biosynthesis and cytotoxicity. These data indicate that LXR-dependent cytotoxicity of Tam and AEBS/ChEH ligands depends on the presence of 5,6-EC and its product of sulfation (5,6-ECS) by SULT2B1b. On the other hand, it showed for the first time that the expression of SULT2B1b in SULT2B1b negative cells re-sensitize cells to the cytotoxicity of Tam and AEBS/ChEH ligands to the level found in MCF-7 cells.

We report in the present study that AEBS ligands inhibited the ChEII activity on MCF-7 cells with a whole cell assay. This inhibition decreased the production of CT and of a yet unidentified, possible product of transformation of CT. CT has been suspected of being involved in an oxidative metabolism leading to genotoxicity (40) and so further work is ongoing in our laboratory to determine the structure and the biological properties of this compound.

One of the first events that occur in breast cancer cells treated with Tam and other AEBS ligands is the accumulation of free sterol due to the inhibition of cholesterologenic enzymes involved in the AEBS complex (11). We found that this event was concomitant with the induction of autophagic features in cells (7) recapitulating what happened in Niemann Pick C syndromes in which the intracellular transport of free sterols was impaired leading to their accumulation and to the stimulation of autophagy (41). Interestingly, Niemann-Pick C syndromes are associated with an increase in sterol autoxidation products including 5,6-EC and CT as predominant oxysterol species (42) resulting in a similar situation as that we found in breast cancer cells treated with Tam or AEBS ligands. Several ROS producing systems could be involved in cholesterol epoxidation. Tam has been reported to induce the expression of the

NAD(P)H oxidase in hepatoma cell lines (43) and NAD(P)H subunits have been reported to be inducible by LXR in human macrophages (44); this could constitute a mechanism of amplification of ROS production in cells but would require the production of an endogenous LXR agonist. If one considers the stimulation of 5-lipoxygenase, Tam and other SERMs are known to induce the production of TGF β (45), which is known to stimulate the expression of 5-lipoxygenase (46) suggesting that this mechanism could be involved in the 5,6-EC formation. However it is not known if DPMs and other pharmacological classes reported in the current study are inducers of TGF β .

The fact that Tam and AEBS ligands modulate LXR-dependent events in tumors suggests they may have an impact on the tumor environment through the production of oxysterols that are modulators of LXR signaling. LXR β has been shown to control T lymphocyte proliferation (47) suggesting that the production of 5,6-EC metabolites by tumor cells may affect the cytotoxic T cell response against the tumor differently depending on their agonist/antagonist status. Importantly, Villablanca *et al* have recently highlighted the importance of cholesterol oxidation products and SULT2B1b in the induction of DC priming of the antitumor immune response that may be a clue to the inhibition of tumor relapse after treatment with Tam (48). In the light of our study, it will be of interest to determine if 5,6-EC and 5,6-ECS could be the metabolites involved in these effects. Tam has been reported to inhibit DC maturation through an unknown mechanism (49) suggesting that the production of 5,6-EC and 5,6-ECS could be involved. These observations suggest that 5,6-EC metabolism may have an impact on the immune response at another level of control which could be of extreme importance since it could alleviate a memory effect against the tumor and may represent one of the main mechanisms of

tumor recurrence after Tam treatment. Thus the importance of LXR in the antitumor immune response and tumor recurrence deserves further studies.

5,6 β -EC accumulation appeared to be responsible for most of the cytotoxicity of Tam and PBPE. 5,6 β -EC has been reported to induced apoptosis in tumor cells through a mechanism involving mitochondria that was not inhibited by antioxidants (50) as characterized with AEBS ligands (7) supporting its involvement in the cytotoxicity of Tam and AEBS ligands.

We found that 5,6-ECS potentiated the cytotoxicity of Tam and PBPE in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Ultrastructure analysis of cells showed that 5,6-ECS alone did not induce the accumulation of MLB, but in the presence of Tam or PBPE, it strongly stimulated the accumulation of giant MLB. Free sterols, several oxysterols and cholesterol sulfate were shown to inhibit the NPC2 (51-53), which is involved in the intracellular transfer of cholesterol. Thus, it would be of interest to determine whether 5,6-ECS is an inhibitor of NPC2 and if NPC2 is involved in the potentiation by 5,6-ECS of the cytotoxicity of Tam and PBPE. This deserves further investigations.

MCF-7 side population cells with the characteristics of cancer stem/progenitor cells were shown to express the tumor antigen MUC1 (54), and this expression up-regulated sterol and lipid metabolism enzymes and transporters (18) suggesting a dysregulation in cholesterol metabolism in breast tumor initiating cells. On the other hand, the oncogenic MUC1-c was found to block the differentiation of myelogenic tumor cells (55). Interestingly, MUC1 was shown to be over expressed in acute myeloid leukemia progenitor cells (56), and these cells were found deregulated on LXR-responsive gene expressions such as the transporters ABCA1 and ABCG1 (57). SERMs such as clomiphene, which is the most potent inhibitor of ChEH in the SERM

series, was recently shown to stabilize the disease and to prolong the survival of patients with acute myeloid leukemia resistant to chemotherapy, suggesting that treatment with SERMs could be a therapeutic option in this disease (58). The proposed mechanism was ER-independent suggesting that the modulation of cholesterol metabolism and the involvement of LXR in these effects could be the case and deserves further investigation.

The beneficial effect of ChEH/AEBS selective inhibitors were also observed with tesmilifene which has been shown to significantly improve the overall survival in a phase III randomized trial for metastatic breast cancer when given with doxorubicin (59). These effects may be due to its killing of tumor initiating cells (TIC) observed at therapeutic doses in four different models of breast cancer (60). Since tesmilifene is a selective AEBS ligand and inhibitor of ChEH, the impact of the LXR and 5,6-EC metabolites in these effects requires further investigations.

Tam has been reported in some studies to induce a reversible stimulation of TG production during the time of treatment and to lower circulating LDL cholesterol (61, 62). The liver is one of the tissues richest in AEBS/ChEH (10) and a tissue that produces 5,6 α -EC (63), thus it is reasonable to propose that Tam could cause a decrease in LDL cholesterol through a previously observed inhibition of cholesterol esterification (64) and a stimulation of the expression of LDLR (65) through an LXR-dependent mechanism. On the other hand the hyper-triglyceridemia can be explained by the LXR-dependent mechanism we report on this paper, because LXR β is known to control the biosynthesis of TG (24). This is supported by the observation that Vit E blocks hyper-triglyceridemia in patients treated with Tam (66), which is similar to what we found in MCF-7 cells in the present study. Thus, variations in the control of the LXR signaling pathway could

explain the variations in the severity of the hyper-triglyceridemia observed in patients and deserve further study.

In summary, we have established that the induction of cell death and TG biosynthesis by AEBS ligands was LXR-

dependent consistent with the accumulation of 5,6-EC. This study established for the first time that LXR β and 5,6-EC metabolites play a role in the anticancer action of Tam and related compounds.

REFERENCES

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M. J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-249
2. Jordan, V. C. (2007) Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer* 7, 46-53
3. Poirot, M. (2011) Four decades of discovery in breast cancer research and treatment - an interview with V. Craig Jordan. *Int J Dev Biol* 55, 703-712
4. Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thurlimann, B., and Senn, H. J. (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736-1747
5. Clarke, R., Liu, M. C., Bouker, K. B., Gu, Z., Lee, R. Y., Zhu, Y., Skaar, T. C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y., and Hilakivi-Clarke, L. A. (2003) Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 22, 7316-7339
6. de Medina, P., Favre, G., and Poirot, M. (2004) Multiple targeting by the antitumor drug tamoxifen: a structure-activity study. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4, 491-508
7. de Medina, P., Payre, B., Boubekeur, N., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009) Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ* 16, 1372-1384
8. Delarue, F., Kedjouar, B., Mesange, F., Bayard, F., Faye, J. C., and Poirot, M. (1999) Modifications of benzylphenoxy ethanamine antiestrogen molecules: influence affinity for antiestrogen binding site (AEBS) and cell cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 57, 657-661
9. de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Khallouki, F., Brillouet, S., Dalenc, F., Courbon, F., Record, M., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2011) Importance of cholesterol and oxysterols metabolism in the pharmacology of tamoxifen and other AEBS ligands. *Chem Phys Lipids* 164, 432-437
10. de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2010) Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13520-13525
11. Kedjouar, B., de Medina, P., Oulad-Abdelghani, M., Payre, B., Silvente-Poirot, S., Favre, G., Faye, J. C., and Poirot, M. (2004) Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 279, 34048-34061
12. Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2012) Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie* in press
13. de Medina, P., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009) Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 5, 1066-1067

14. Payre, B., de Medina, P., Boubekour, N., Mhamdi, I., Bertrand-Michel, J., Terec, F., Fourquaux, I., Goudouneche, D., Record, M., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2008) Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol Cancer Ther* 7, 3707-3718
15. Gundimeda, U., Chen, Z. H., and Gopalakrishna, R. (1996) Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem* 271, 13504-13514
16. Mandlekar, S., Yu, R., Tan, T. H., and Kong, A. N. (2000) Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 60, 5995-6000
17. Mandlekar, S., Hebbar, V., Christov, K., and Kong, A. N. (2000) Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60, 6601-6606
18. Pitroda, S. P., Khodarev, N. N., Beckett, M. A., Kufe, D. W., and Weichselbaum, R. R. (2009) MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5837-5841
19. Schiff, R., Reddy, P., Ahotupa, M., Coronado-Heinsohn, E., Grim, M., Hilsenbeck, S. G., Lawrence, R., Deneke, S., Herrera, R., Chamness, G. C., Fuqua, S. A., Brown, P. H., and Osborne, C. K. (2000) Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *J Natl Cancer Inst* 92, 1926-1934
20. Paillasse, M. R., Saffon, N., Gornitzka, H., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., and de Medina, P. (2012) Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles. *J Lipid Res* 53, 718-725
21. Berrodin, T. J., Shen, Q., Quinet, E. M., Yudit, M. R., Freedman, L. P., and Nagpal, S. (2010) Identification of 5{alpha}.6{alpha}-Epoxycholesterol as a Novel Modulator of Liver X Receptor Activity. *Mol Pharmacol* 78, 1046-1058
22. Argmann, C. A., Edwards, J. Y., Sawyez, C. G., O'Neil, C. H., Hegele, R. A., Pickering, J. G., and Huff, M. W. (2005) Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 280, 22212-22221
23. Song, C., Hiipakka, R. A., and Liao, S. (2001) Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66, 473-479
24. Patel, R., Patel, M., Tsai, R., Lin, V., Bookout, A. L., Zhang, Y., Magomedova, L., Li, T., Chan, J. F., Budd, C., Mangelsdorf, D. J., and Cummins, C. L. (2011) LXRbeta is required for glucocorticoid-induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice. *J Clin Invest* 121, 431-441
25. Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., and Shan, B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-2838

26. Moore, D. D., Kato, S., Xie, W., Mangelsdorf, D. J., Schmidt, D. R., Niao, R., and Kliewer, S. A. (2006) International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H1 and NR1H2 receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev* 58, 742-759
27. Holbeck, S., Chang, J., Best, A. M., Bookout, A. L., Mangelsdorf, D. J., and Martinez, E. D. (2010) Expression profiling of nuclear receptors in the NCI60 cancer cell panel reveals receptor-drug and receptor-gene interactions. *Mol Endocrinol* 24, 1287-1296
28. Poirot, M., De Medina, P., Delarue, F., Perie, J. J., Kläebe, A., and Faye, J. C. (2000) Synthesis, binding and structure-affinity studies of new ligands for the microsomal anti-estrogen binding site (AEBS). *Bioorg Med Chem* 8, 2007-2016
29. Lewis-Wambi, J. S., Kim, H., Curpan, R., Grigg, R., Sarker, M. A., and Jordan, V. C. (2011) The selective estrogen receptor modulator bazedoxifene inhibits hormone-independent breast cancer cell growth and down-regulates estrogen receptor alpha and cyclin D1. *Mol Pharmacol* 80, 610-620
30. de Medina, P., Paillasse, M. R., Payre, B., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009) Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* 52, 7765-7777
31. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301
32. de Medina, P., Casper, R., Savouret, J. F., and Poirot, M. (2005) Synthesis and biological properties of new stilbene derivatives of resveratrol as new selective aryl hydrocarbon modulators. *J Med Chem* 48, 287-291
33. Paillasse, M. R., de Medina, P., Amouroux, G., Mhamdi, L., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2009) Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. *J Lipid Res* 50, 2203-2211
34. Dzeletovic, S., Breuer, O., Lund, E., and Diczfalussy, U. (1995) Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem* 225, 73-80
35. Fuda, H., Javitt, N. B., Mitamura, K., Ikegawa, S., and Strott, C. A. (2007) Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *J Lipid Res* 48, 1343-1352
36. Di Stasi, D., Vallacchi, V., Campi, V., Ranzani, T., Daniotti, M., Chiodini, E., Fiorentini, S., Greeve, I., Prinetti, A., Rivoltini, L., Pierotti, M. A., and Rodolfo, M. (2005) DHCR24 gene expression is upregulated in melanoma metastases and associated to resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Int J Cancer* 115, 224-230
37. Yang, C., McDonald, J. G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E. J., Covey, D. F., Mangelsdorf, D. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 281, 27816-27826

38. Reddel, R. R., Murphy, L. C., Hall, R. E., and Sutherland, R. I. (1985) Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Res* 45, 1525-1531
39. Silva, I. D., Salicioni, A. M., Russo, I. II., Higgy, N. A., Gebrim, J. II., and Russo, J. (1997) Tamoxifen down-regulates CD36 messenger RNA levels in normal and neoplastic human breast tissues. *Cancer Res* 57, 378-381
40. Cheng, Y. W., Kang, J. J., Shih, Y. L., Lo, Y. L., and Wang, C. F. (2005) Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food Chem Toxicol* 43, 617-622
41. Pacheco, C. D., Kunkel, R., and Lieberman, A. P. (2007) Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects. *Hum Mol Genet* 16, 1495-1503
42. Porter, F. D., Scherrer, D. E., Lanier, M. H., Langmade, S. J., Molugu, V., Gale, S. E., Olzeski, D., Sidhu, R., Dietzen, D. J., Fu, R., Wassif, C. A., Yanjanin, N. M., Marso, S. P., House, J., Vite, C., Schaffer, J. E., and Ory, D. S. (2010) Cholesterol Oxidation Products Are Sensitive and Specific Blood-Based Biomarkers for Niemann-Pick C1 Disease. *Sci Transl Med* 2, 56ra81
43. Lee, Y. S., Kang, Y. S., Lee, S. H., and Kim, J. A. (2000) Role of NAD(P)H oxidase in the tamoxifen-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cell Death Differ* 7, 925-932
44. Fontaine, C., Rigamonti, E., Nohara, A., Gervois, P., Teissier, E., Fruchart, J. C., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2007) Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ Res* 101, 40-49
45. Clarke, R., Leonessa, F., Welch, J. N., and Skaar, T. C. (2001) Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* 53, 25-71
46. Radmark, O., and Samuelsson, B. (2009) 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res* 50, S40-S45
47. Bensinger, S. J., Bradley, M. N., Joseph, S. B., Zelcer, N., Janssen, E. M., Hausner, M. A., Shih, R., Parks, J. S., Edwards, P. A., Jamieson, B. D., and Tontonoz, P. (2008) LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134, 97-111
48. Villablanca, E. J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentini, B., Bregni, M., Prinetti, A., Steffensen, K. R., Sonnino, S., Gustafsson, J. A., Doglioni, C., Bordignon, C., Traversari, C., and Russo, V. (2010) Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16, 98-105
49. Geyeregger, R., Zeyda, M., Bauer, W., Kriehuber, E., Saemann, M. D., Zlabinger, G. J., Maurer, D., and Stulnig, T. M. (2007) Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* 109, 4288-4295

50. Ryan, L., O'Callaghan, Y. C., and O'Brien, N. M. (2004) Comparison of the apoptotic processes induced by the oxysterols 7 β -hydroxycholesterol and cholesterol-5 β ,6 β -epoxide. *Cell Biol Toxicol* 20, 313-323
51. Infante, R. E., Radhakrishnan, A., Abi-Mosleh, L., Kinch, L. N., Wang, M. L., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2008) Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *J Biol Chem* 283, 1064-1075
52. Xu, S., Benoff, B., Liou, H. L., Lobel, P., and Stock, A. M. (2007) Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *J Biol Chem* 282, 23525-23531
53. Liou, H. L., Dixit, S. S., Xu, S., Tint, G. S., Stock, A. M., and Lobel, P. (2006) NPC2, the protein deficient in Niemann-Pick C2 disease, consists of multiple glycoforms that bind a variety of sterols. *J Biol Chem* 281, 36710-36723
54. Engelmann, K., Shen, H., and Finn, O. J. (2008) MCF7 Side Population Cells with Characteristics of Cancer Stem/Progenitor Cells Express the Tumor Antigen MUC1. *Cancer Res* 68, 2419-2426
55. Yin, L., Wu, Z., Avigan, D., Rosenblatt, J., Stone, R., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2011) MUC1-C oncoprotein suppresses reactive oxygen species-induced terminal differentiation of acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 117, 4863-4870
56. Fatrai, S., Schepers, H., Tadema, H., Vellenga, E., Daenen, S. M., and Schuringa, J. J. (2008) Mucin1 expression is enriched in the human stem cell fraction of cord blood and is upregulated in majority of the AML cases. *Exp Hematol* 36, 1254-1265
57. Misaghian, N., Ligresti, G., Steelman, L. S., Bertrand, F. E., Basecke, J., Libra, M., Nicoletti, F., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., Cervello, M., Martelli, A. M., and McCubrey, J. A. (2009) Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia* 23, 25-42
58. Yom-Tov, G., Nathan, I., Shpilberg, O., Polliack, A., and Levi, I. (2012) Clomiphene as a novel modality for the treatment of acute myeloid leukemia: A pilot phase II study. *Leuk Res.* 36, 42-45
59. Reyno, L., Seymour, L., Tu, D., Dent, S., Gelmon, K., Walley, B., Pluzanska, A., Gorbunova, V., Garin, A., Jassem, J., Pienkowski, T., Dancy, J., Pearce, J., MacNeil, M., Marlin, S., Lebwohl, D., Voi, M., and Pritchard, K. (2004) Phase III study of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy]ethanamine (BMS-217380-01) combined with doxorubicin versus doxorubicin alone in metastatic/recurrent breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA.19. *J Clin Oncol* 22, 269-276
60. Deng, T., Liu, J. C., Pritchard, K. L., Eisen, A., and Zacksenhaus, E. (2009) Preferential killing of breast tumor initiating cells by N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine/tesmilifene. *Clin Cancer Res* 15, 119-130
61. Love, R. R., Newcomb, P. A., Wiebe, D. A., Surawicz, T. S., Jordan, V. C., Carbone, P. P., and DeMets, D. L. (1990) Effects of tamoxifen therapy on lipid and lipoprotein levels in postmenopausal patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 82, 1327-1332

62. Love, R. R., Wiebe, D. A., Feyzi, J. M., Newcomb, P. A., and Chappell, R. J. (1994) Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. *J Natl Cancer Inst* 86, 1534-1539
63. Schroepfer, G. J. Jr. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80, 361-554
64. de Medina, P., Payre, B. L., Bernad, J., Bosser, L., Pipy, B., Silvente-Poirot, S., Favre, G., Faye, J. C., and Poirot, M. (2004) Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 1165-1173
65. Suarez, Y., Fernandez, C., Gomez-Coronado, D., Ferruelo, A. J., Davalos, A., Martinez-Botas, J., and Lasuncion, M. A. (2004) Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc Res* 64, 346-355
66. Babu, J. R., Sundravel, S., Arumugam, G., Renuka, R., Deepa, N., and Sachdanandam, P. (2000) Salubrious effect of vitamin C and vitamin E on tamoxifen-treated women in breast cancer with reference to plasma lipid and lipoprotein levels. *Cancer Lett* 151, 1-5

List of Abbreviations:

AEBS, antiestrogen binding site; ChEII, cholesterol epoxide hydrolase; Tam, Tamoxifen. TRANS-2-[4-(1,2-diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethylamine; 4OII-tam: 4-[(Z)-1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbut-1-enyl]phenol; raloxifene: [6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-1-benzothiophen-3-yl]-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)phenyl]methanone; clomiphene: 2-[4-[(Z)-2-chloro-1,2-di(phenyl)ethenyl]phenoxy]-N,N-diethylethanamine; BZA, bazedoxifene, 1-[[4-[2-(azepan-1-yl)ethoxy]phenyl]methyl]-2-(4-hydroxyphenyl)-3-methylindol-5-ol; PBPE, N,N-pyrrolidino-[(4-benzyl)-phenoxy]-ethanamine; PBPE: 1-(2-(4-benzylphenoxy)ethyl)pyrrolidin-HCl; PCPE: 1-(2-(4-(2-phenylpropan-2-yl)phenoxy)ethyl)pyrrolidine; MBPE: 4-(2-(4-benzylphenoxy) ethyl)morpholine; MCPPE: 4-(2-(4-(2-phenylpropan-2-yl)phenoxy)ethyl)morpholine; D8D7I, 3 β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase; DHCR7, 3 β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase; DHCR24, 3 β -hydroxysterol- Δ^{24} -reductase; C5DS, 3 β -hydroxysterol-C⁵-desaturase; 5 α -cholesta-8,24-dien-3 β -ol; zymostenol, 5 α -cholest-8-en-3 β -ol; 7-dehydrocholesterol, cholesta-5,7-dien-3 β -ol; desmosterol, cholesta-5,24-dien-3 β -ol; cholesterol, cholest-5-en-3 β -ol; 5,6-EC, 5,6-epoxy-cholesterol; CT, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; 5,6-*a*EC, 5,6 α -epoxy-5 α -cholestestan-3 β -ol; 5,6 β -EC, 5,6 β -epoxy-5 β -cholestestan-3 β -ol; 5,6-ECS, 5,6 α -epoxy-5 α -cholestestan-3 β -sulfate; E2, 17 β -estradiol; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; LXR α , Liver-X-Receptor alpha; LXR β , Liver-X-Receptor beta ; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1 ; ABCG1, ATP-binding cassette transporter G1; SULT2B1, Steroid sulfotransferase 2B1; SCD1, Stearoyl-CoA desaturase 1 ; LDLR, Low density lipoprotein receptor ; SREBP-1c, Sterol regulatory element-binding protein-1c; ACC, Acetyl-CoA carboxylase; siRNA, small interfering RNA; siSC, siRNA scrambled.

Competing interests: PDM and MP are employed by the company Affichem.

Authors' information. This work is part of the PhD thesis of GS

Acknowledgements: We thank David J Mangelsdorf (University of Texas, Dallas, Tx, USA) for kindly providing plasmids encoding human LXR and LXRE-luc. MP and SSP are supported by internal grants from the “Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale”, the University of Toulouse III and an external grant from the “Fondation de France”. VCJ is supported by P30CA051008, SSP is in charge of research at the Centre National de la Recherche Scientifique. GS is funded by the “Ministere de la Recherche” and the “Association pour la Recherche sur le Cancer”.

FIGURES

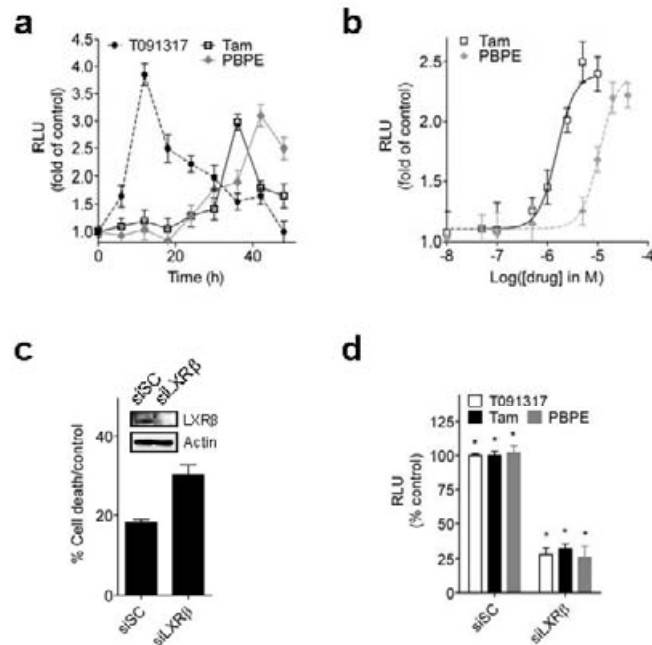


FIGURE 1. Transcriptional activation of LXR by AEBS ligands in MCF-7 cells. a) Kinetic studies of T0901317, Tam and PBPE on MCF-7 cells transfected with an LXRE-Luc plasmid. Results are the LXR-dependent luciferase (Luc) activity obtained with the tested compounds. Cells were incubated with 1 μ M T0901317 (●), 5 μ M Tam (□) and 20 μ M PBPE (◆) and assayed for Luc activity from 6 to 48 hours after treatment. **b)** Dose-response study of Tam (□) and PBPE (◆) on MCF-7 cells transfected with an LXRE-Luc plasmid. Cells were incubated with solvent vehicle or increasing concentrations (50 nM-50 μ M) of each drug for 40 hours and assayed for Luc activity. **c)** Effect of the knock-down of LXR β in MCF-7 cells on cell viability. MCF-7 cells were transfected with siRNA scrambled (siSC) or siRNA targeting LXR β (siLXR β). LXR β expression was verified by Western blot using anti-LXR β antibodies. Cell death resulting from the transfection with siRNA was determined by the trypan blue exclusion test and is shown as the percentage of dead cells relative to non-transfected cells. **d)** Effect of the knock-down of LXR β in MCF-7 cells on LXR-dependent Luc activity. 24 hours after cell transfection with siRNA, cells were transfected with the LXRE-luc plasmid. Cells were treated with solvent vehicle, 1 μ M T0901317 (white bar) for 12 hours, or 5 μ M Tam (black bar) or 20 μ M PBPE (grey bar) for 40 hours. Values are times-fold of relative Luc units (RLU) of the control and are the means of three independent experiments. * $P < 0.001$ with control cells.

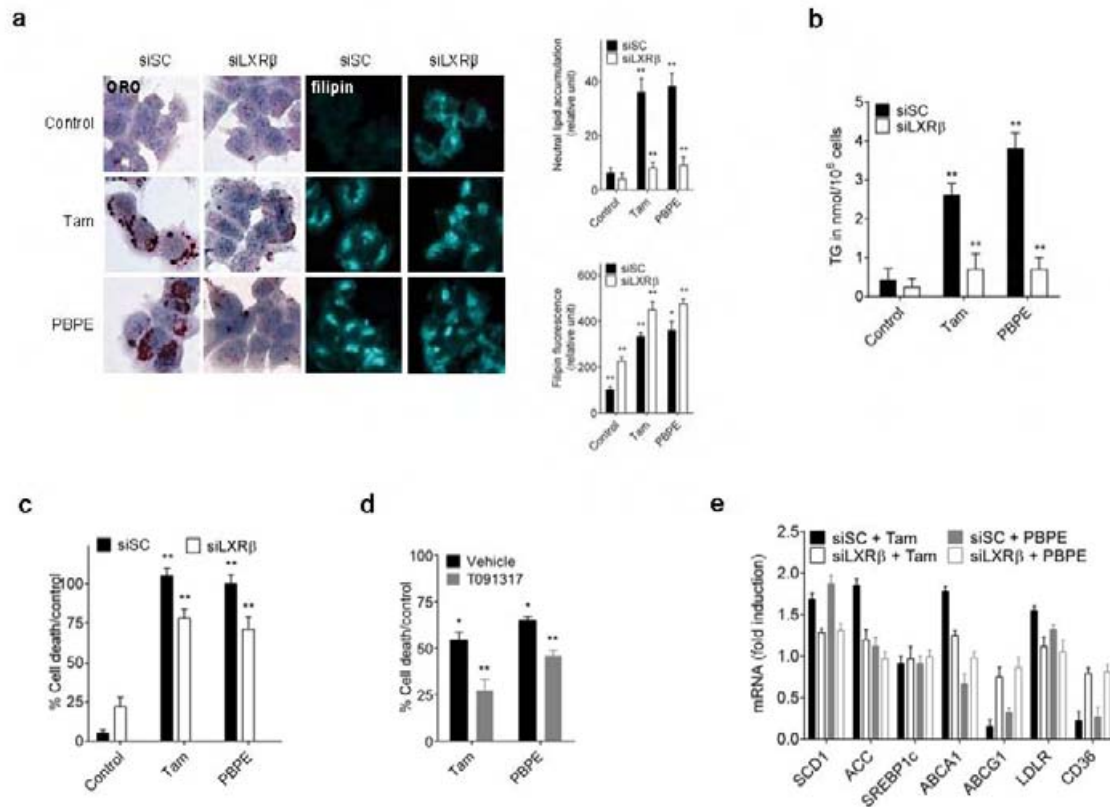


FIGURE 2. Importance of LXRβ in the cellular effects of Tam and PBPE. MCF-7 cells transfected with siRNA scrambled (siSC, plain bar) or siRNA targeting LXRβ (siLXRβ, empty bar) were treated for 40 hours with solvent vehicle, 5 μM Tam (black) or 20 μM PBPE (grey). **a)** Effect of knock-down of LXRβ on neutral lipid and free sterol accumulation in MCF-7 cells treated with Tam and PBPE. Neutral lipids accumulation in cells was monitored by light microscopy (x 40) of Oil Red O (ORO) stained cells counterstained with Mayer's hematoxylin. Neutral lipids are colored in red. Quantitative analysis of neutral lipid accumulation was carried out by extracting the ORO-stained cells with isopropyl alcohol and measuring the optical density of the extract at 510 nm. Free sterol accumulation was followed by fluorescence microscopy after filipin staining of cells. Free sterols are colored in light blue. Relative quantification of filipin fluorescence was obtained and is expressed as arbitrary units. **b)** Effect of knock-down of LXRβ on TG biosynthesis in cells treated with Tam and PBPE. The data presented are the means ± S.E. of three independent experiments. **c)** Effect of siRNA on LXRβ on cytotoxicity induced by Tam and PBPE. MCF-7 cells transfected as described in the Fig. 1 legend with siRNAs were treated for 72 hours with 10 μM Tam or 40 μM PBPE. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. Data were normalized to solvent vehicle-treated cells (taken to be 0%). Data are expressed as the percentage of dead cells relative to cell death measured with MCF-7 cells transfected with siSC (taken to be 100%). MCF-7 cells were treated for 72 hours with 10 μM Tam and 40 μM PBPE in the presence of solvent vehicle (vehicle, black bar), 1 μM T0901317 (grey bar). Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. **a)** Expression of LXR target genes was measured by quantitative RT-PCR. The data presented here are the means ± S.E. of four independent experiments in triplicate. *P<0.001 and **P<0.0001 with control cells.

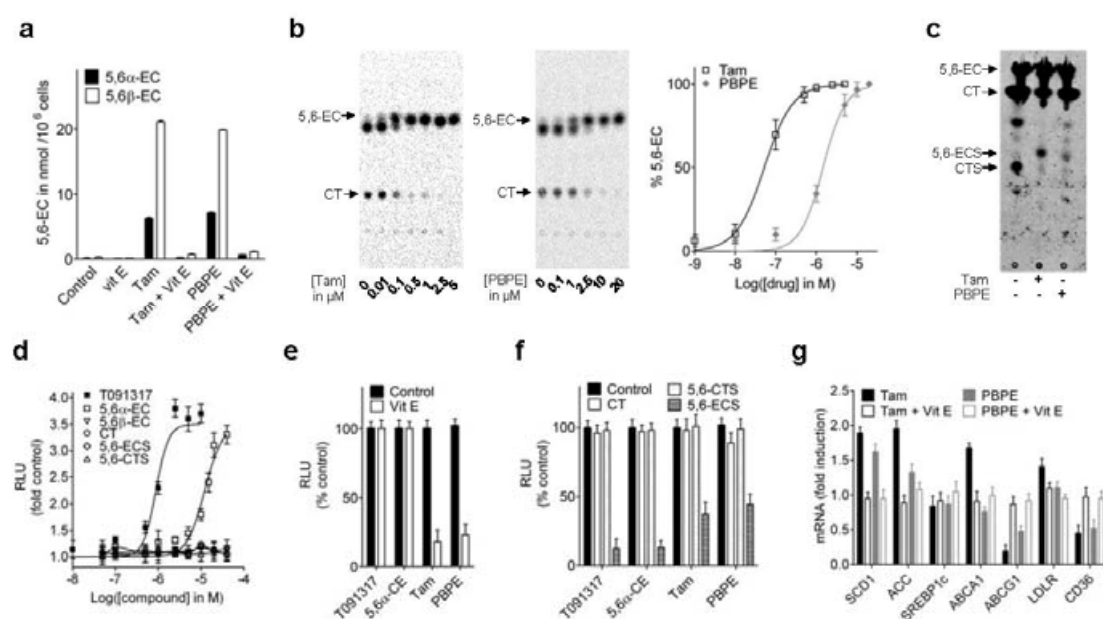


FIGURE 3. Effect of Tam and PBPE on the biosynthesis and metabolism 5,6-epoxides of cholesterol in MCF-7 cells. Impact of 5,6-EC metabolites on LXR-dependent reporter and endogenous genes expression. **a)** Quantification of 5,6 α -EC and 5,6 β -EC in MCF-7 cells incubated for 48 hours with 10 μ M Tam or 40 μ M PBPE in the absence or presence of 500 μ M Vit E. Oxysterols were quantified by gas chromatography and the results are reported in nmol of 5,6-EC per 10^6 cells. **b)** Inhibition of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase activity by Tam and PBPE in MCF-7 cells. Cells were incubated with [14 C]-5,6-EC (0.6 μ M; 20 μ Ci/ μ mol) and were treated with increasing concentrations of Tam or PBPE ranging from 10 nM to 10 μ M over 24 hours. The positions of the 5,6-EC and CT were determined using [14 C]-5,6-EC and [14 C]-CT as standards. Representative autoradiograms from three independent experiments are given. **c)** Evaluation of 5,6-EC sulfation in MCF-7 cells treated with Tam and PBPE. MCF-7 cells were incubated with [14 C]-5,6-EC (0.6 μ M; 20 μ Ci/ μ mol) in the presence of solvent vehicle (EtOH 0.01%), 5 μ M Tam or 20 μ M of PBPE for 72 hours. The positions of the CTS and 5,6-ECS and were determined using authentic CTS and 5,6-ECS as standards. A representative autoradiogram from three independent experiments is shown. The values are the mean \pm S.E. of four independent experiments. * P <0.001 and ** P <0.0001 compared with control cells. **d)** Dose-response study of 5,6-EC metabolites on LXR-dependent Luc activity. MCF-7 cells transfected with an LXRE-Luc plasmid were incubated with solvent vehicle, 1 μ M T0901317, 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, CT, 5,6-ECS or 5,6-CTS for 12 hr and assayed for Luc activity. Values are times-fold of relative Luc units (RLU) of the control and are the means of three independent experiments. **e)** Effect of Vit E on the modulation of LXR-dependent Luc expression by T0901317, 5,6 α -EC, Tam and PBPE. MCF-7 cells transfected with an LXRE-Luc plasmid were incubated for 12 hr with solvent vehicle, 1 μ M T0901317, and 20 μ M 5,6 α -EC or 40 hours with 5 μ M Tam, and 20 μ M PBPE in the presence or absence of 500 μ M Vit E and assayed for Luc activity. Values are times-fold of relative Luc units (RLU) of the control and are the means of three independent experiments. **f)** Effect of CT, 5,6-CTS or 5,6-ECS on the modulation of LXR-dependent Luc expression by T0901317, 5,6 α -EC, Tam and PBPE. MCF-7 cells transfected with an LXRE-Luc plasmid were incubated for 12 hours with solvent vehicle, 1 μ M T0901317, and 20 μ M

5,6 α -EC or 40 hours with 5 μ M Tam, and 20 μ M PBPE in the presence or absence of 10 μ M CT, 5,6-CTS or 5,6-ECS and assayed for Luc activity. Values are times-fold of relative Luc units (RLU) of the control and are the means of three independent experiments. **g)** Effect of Vit E on the modulation of LXR-responsive genes by Tam and PBPE. MCF-7 cells were treated for 40 hours with 5 μ M Tam or 20 μ M PBPE in the absence or presence of 500 μ M Vit E. Expression of LXR target genes was measured by quantitative RT-PCR. Values are the means of three independent experiments.

Compound	LXRE- Luc	5,6-EC	5,6-ECS	ORO /LD	Inhibition by Vit E	ChEH <i>IC</i> ₅₀ (nM)	Filipin/ MLB
Tam	-	÷	+	+	++	52 ± 8	-
4OHTam	-	+	+	++	+	728 ± 11	++
Raloxifene	·	·	·	·	·	435 ± 6	·
Bazedoxifene	-	+	++	+	++	105 ± 8	-
Clomiphene	·	·	·	·	·	74 ± 6	·
RU-39411	·	·	·	·	·	844 ± 8	·
PBPE	·	·	·	·	·	1229 ± 12	·
PCPE	-	+	+	+	++	1066 ± 8	-
Tesmififene	-	+	+	+	++	1452 ± 10	-
MBPE	-	+	+	+	++	1616 ± 12	-
MCPE	-	+	+	+	++	1198 ± 12	-
BD-1008	·	·	·	·	·	1396 ± 8	·
SR-31747A	-	÷	+	+	++	102 ± 9	-
Flupenthixol	·	·	·	·	·	1131 ± 10	·
Chlorpromazine	·	·	·	·	·	1640 ± 12	·
Trifluoperazine	·	·	·	·	·	1873 ± 11	·
U-18666A	·	·	·	·	·	898 ± 14	·
AY-9944	-	÷	+	+	++	1827 ± 22	-
Triparanol	·	·	·	·	·	976 ± 11	·
17β-estradiol	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.

Table 1: Effect of AEBS/ChEH ligands on MCF-7 cells after 48 hr treatment. Evaluation of the potency of AEBS ligands to modulate a LXR-dependent reporter gene expression (LXRE-Luc). 5,6-EC biosyntheses were performed by studying the metabolism of [¹⁴C]-cholesterol in MCF-7 cells treated for 48 hr with 10 μM of drugs as described in the

“Experimental Procedures” section. 5,6-ECS biosynthesis was measured as described in the legend of Fig. 3. Stimulation of neutral lipid accumulation was monitored after treatment of MCF-7 cells and revealed by staining with Oil Red O (ORO) visualized by light microscopy and by the detection of unilamellar vesicles (UV) by electron microscopy. The inhibition by Vit E included the inhibition of LXRF-Luc modulation, of the production 5,6-EC and 5,6-ECS, and of neutral lipid accumulation. Inhibition of ChEH in MCF-7 cells by drugs and the determination of the IC₅₀ cells was as described in the “Experimental Procedures” section. Accumulation of free sterols was monitored by filipin staining and detection of MLB through electron microscopy analyses.

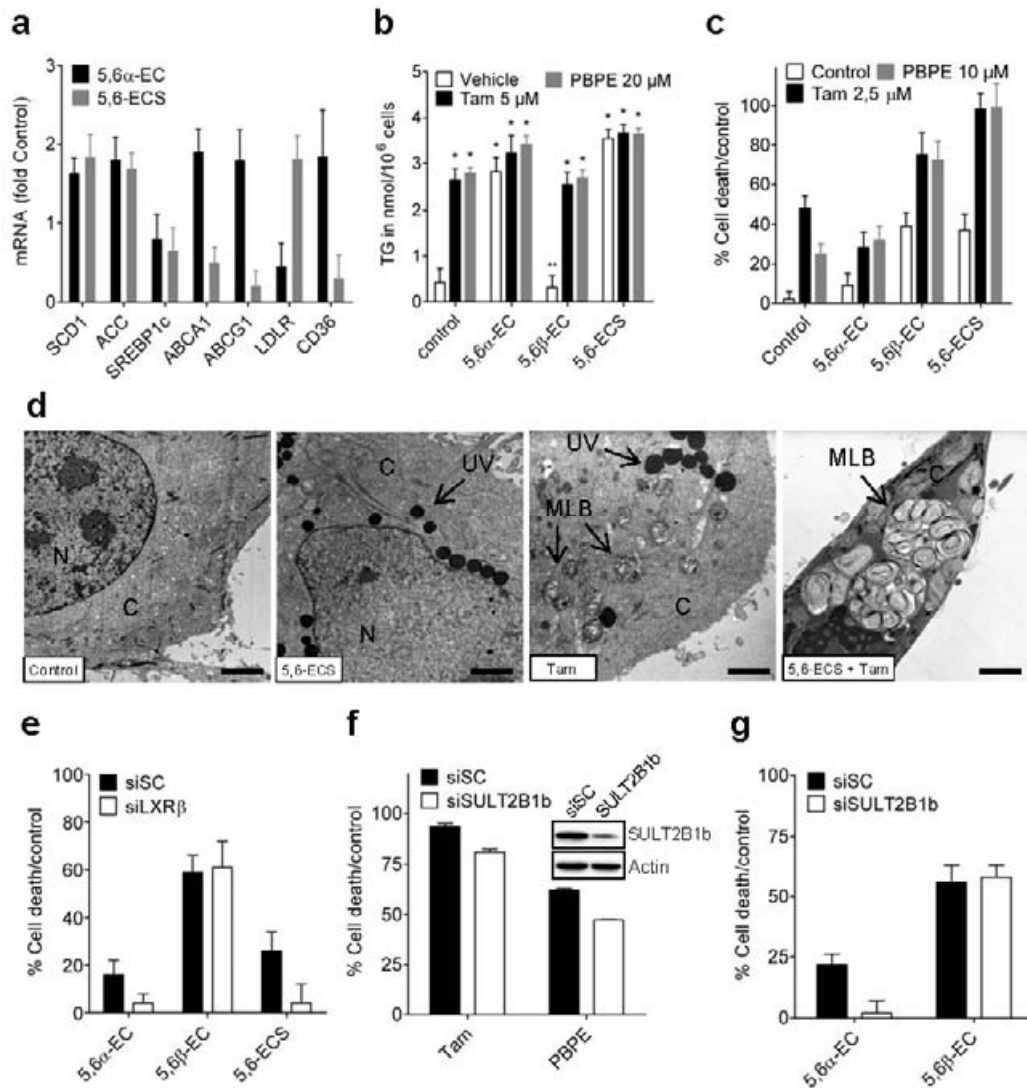


FIGURE 4. Significance of 5,6-EC sulfation and SUL2B1b in the stimulation of TG biosynthesis and cytotoxicity by Tam and PBE in MCF-7 cells. **a)** Effect of 5,6 α -EC and 5,6-ECS on the modulation of endogenous LXR-responsive genes in MCF-7 cells. Expression of mRNA was measured by quantitative RT-PCR. **b)** Effect of 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS on TG biosynthesis. Cells were treated for 24 hours with 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS in the presence of 2.5 μ M Tam or 10 μ M PBPE. The data are the means \pm S.E. of four independent experiments in triplicate. * $P < 0.001$ with control cells. **c)** Effect of 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS on cytotoxicity. Cells were treated for 48 hours with 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS in the presence of 2.5 μ M Tam or 10 μ M PBPE. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. The data are the means + S.E. of four independent experiments in triplicate. **d)** Ultrastructural analysis of the effect of 5,6-ECS and Tam on MCF-7 cells. Cells were treated with solvent vehicle (control), 20 μ M 5,6-ECS, 2.5 μ M Tam or 20 μ M 5,6-ECS + 2.5 μ M Tam for 48 hr. N, nucleus; C, cytoplasm; MLB, multilamellar bodies; UV, unilamellar vesicles. Bars: 2 μ m. **e)** Importance of LXR β on the

induction of cytotoxicity by 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS. MCF-7 cells transfected with siSC and siLXR β as described in Fig 1 legend were treated for 72 hours with 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. Data were normalized to solvent vehicle-treated cells (taken to be 0%). Data are expressed as the percentage of dead cells relative to cell death measured with MCF-7 cells transfected with siSC (taken to be 100%). **f**) Importance of SULT2B1b in the induction of cytotoxicity by Tam and PBPE. MCF-7 cells were transfected with siSC or siSULT2B1b. SULT2B1b expression was verified by Western blot using anti-SULT2B1b antibodies. After 24 hours, transfected cells were treated for 72 hours with 5 μ M Tam or 20 μ M PBPE. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test and is given as the percentage of dead cells relative to non-transfected cells. **g**) Importance of SULT2B1b in the induction of cytotoxicity by 5,6 α -EC and 5,6 β -EC. MCF-7 cells were transfected with siSC or siSULT2B1b. After 24 hours, transfected cells were treated for 72 hours with 20 μ M 5,6 α -EC and 5,6 β -EC. Values are the means of three independent experiments.

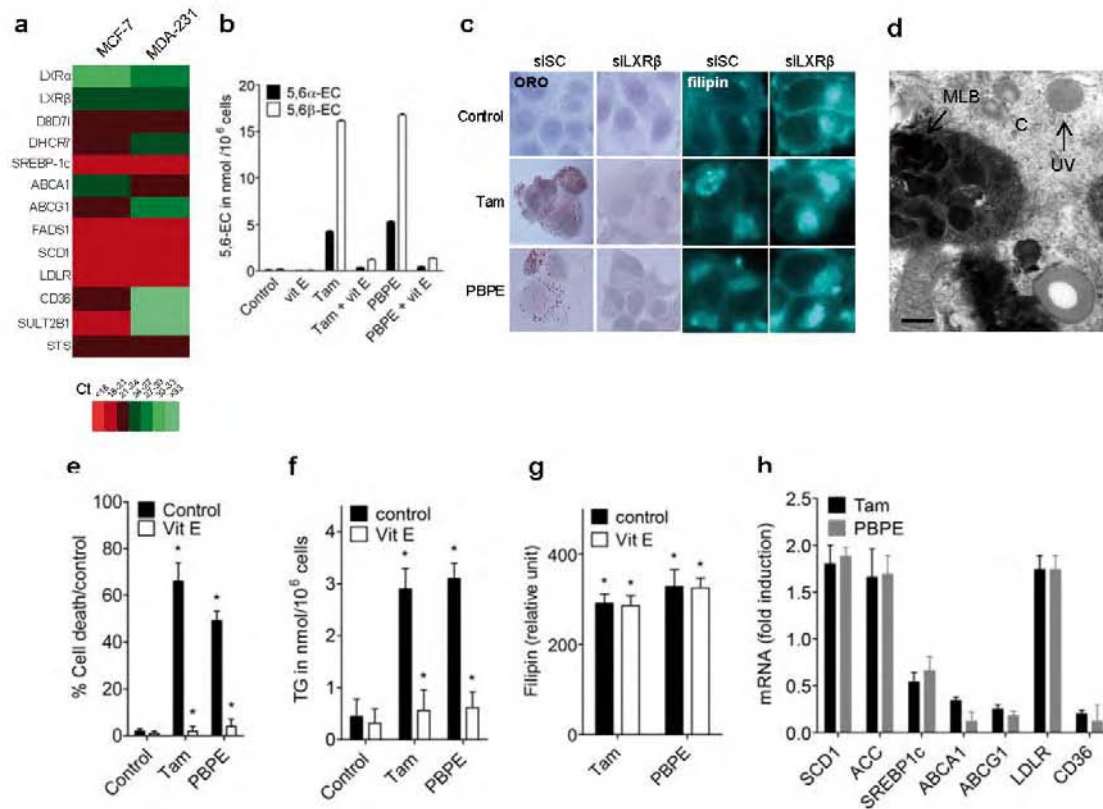


FIGURE 5. Effects of Tam and PBPE on MDA-MB-231 cells. a) Expression of mRNA coding LXR, ChEII subunits and LXR-responsive genes in MCF-7 and MDA-MB-231 (MDA-231) cells. The expression of mRNA was measured by quantitative RT-PCR. b) Quantification of 5,6 α -EC and 5,6 β -EC in MDA-MB-231 cells incubated for 48 hours with 10 μ M Tam or 40 μ M PBPE in the absence or presence 500 μ M Vit E. Oxysterols were quantified as reported in the legend of Fig. 3. c) Effect of Tam and PBPE on neutral lipid and free sterol accumulation in MDA-MB-231 cells transfected with siSC or siLXR β . Neutral lipids accumulation in cell was monitored by light microscopy (x 60) of Oil Red O stained cells counterstained with Mayer's hematoxylin. Neutral lipids are colored in red. Quantitative analysis of neutral lipid accumulation was carried out by extracting the ORO-stained cells with isopropyl alcohol and measuring the optical density of the extract at 510 nm. Free sterol accumulation was followed by fluorescence microscopy after filipin staining of cells. Free sterols are colored in light blue. Relative quantification of filipin fluorescence was obtained and is expressed as arbitrary units. d) Ultrastructural analysis of the effect of Tam and PBPE on MDA-MB-231 cells. Cells were treated with 10 μ M Tam or 40 μ M PBPE for 48 hours. C, cytoplasm; MLB, multilamellar bodies; UV, unilamellar vesicles. Bars: 400 nm. e) Effect of Vit E on Tam and PBPE induction of cytotoxicity. MDA-MB-231 cells were treated 72 hours with 10 μ M Tam and 40 μ M PBPE in the absence or presence of 500 μ M Vit E. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test and is given as the percentage of dead cells relative to non-transfected cells. f) Effect of Vit E on Tam and PBPE induction of TG biosynthesis. MDA-MB-231 cells were treated 48 hours with 10 μ M Tam and 40 μ M PBPE in the absence or in the presence of 500 μ M Vit E. g) Effect of Vit E on the accumulation of free sterols in MDA-MB-231 cells treated with Tam and PBPE. MDA-MB-231 cells were

treated for 24 hours with 10 μ M Tam and 40 μ M PBPF in the absence or presence of 500 μ M Vit E. Relative quantification of filipin fluorescence was obtained and is expressed as arbitrary units. h) Effect of Tam and PBPF on the modulation of endogenous LXR-responsive genes in MDA-MB-231 cells. Expression of mRNA was measured by quantitative RT-PCR. The data are the means \pm S.E. of four independent experiments in triplicate. * P <0.001 and ** P <0.0001 with control cells.

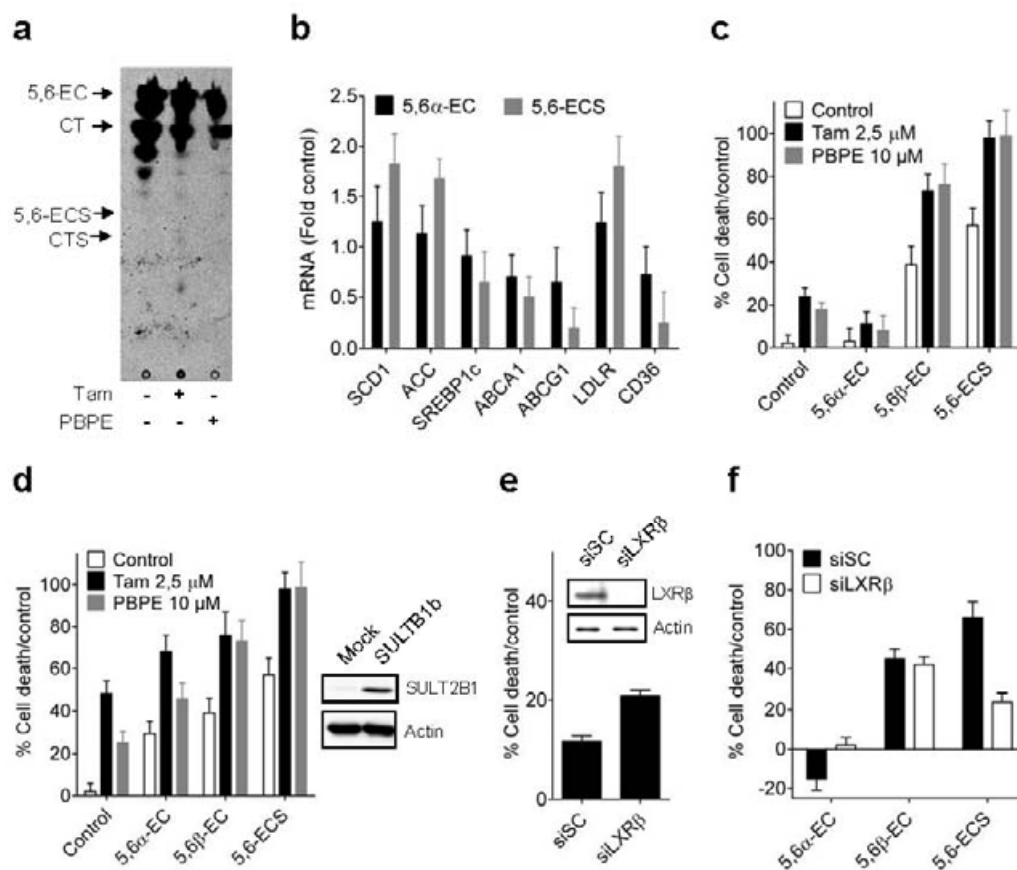


FIGURE 6. Studies on 5,6-EC metabolism and effects of SUL2B1b and LXR β on MDA-MB-231 cells sensitivity to Tam and PBPE. a) Evaluation of 5,6-EC sulfation in MDA-MB-231 cells treated with Tam and PBPE. MDA-MB-231 cells were incubated with [14 C]-5,6-EC (0.6 μ M; 20 μ Ci/ μ mol) in the presence of solvent vehicle (EtOH 0.01%), 5 μ M Tam or 20 μ M of PBPE for 72 hr. A representative autoradiogram from three independent experiments is shown. The positions of the CTS and 5,6-ECD and were determined using authentic 5,6-ECS and CTS as standards. The values are the mean \pm S.E. of four independent experiments. * P <0.001 and ** P <0.0001 compared with control cells. **b)** Effect of 5,6 α -EC and 5,6-ECS on the modulation of endogenous LXR-responsive genes in MDA-MB-231 cells. Expression of mRNA was measured by quantitative RT-PCR. **c)** Effect of 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS on MDA-MB-231 cell death in the presence or in the absence of Tam and PBPE. Cells were treated for 48 hours with 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS in the presence of 5 μ M Tam or 20 μ M PBPE. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. The data are the means \pm S.E. of four independent experiments in triplicate. **d)** Effect of transient expression of SULT2B1b on the sensitivity of MDA-MB-231 cells to Tam and PBPE. MDA-MB-231 cells were transfected with a pCMV6-XL5 plasmid (Mock) and a pCMV6-XL5-SULT2B1b plasmid (SUL2B1b) encoding the human enzyme. Expression of the enzyme in transfected cells was verified by Western blot. Cells were treated for 48 hours with 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS in the presence of 5 μ M Tam or 20 μ M PBPE. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. The data are the means \pm S.E. of four independent experiments in triplicate. **f)** Importance of LXR β on the induction of

cytotoxicity by 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS. MDA-MB-231 cells transfected with siSC and siNR β as described in Fig 1 legend were treated for 72 hours with 20 μ M 5,6 α -EC, 5,6 β -EC and 5,6-ECS. Cell death was determined by the trypan blue exclusion test. Data were normalized to solvent vehicle-treated cells (taken to be 0%). Data are expressed as the percentage of dead cells relative to cell death measured with MCF-7 cells transfected with siSC (taken to be 100%).

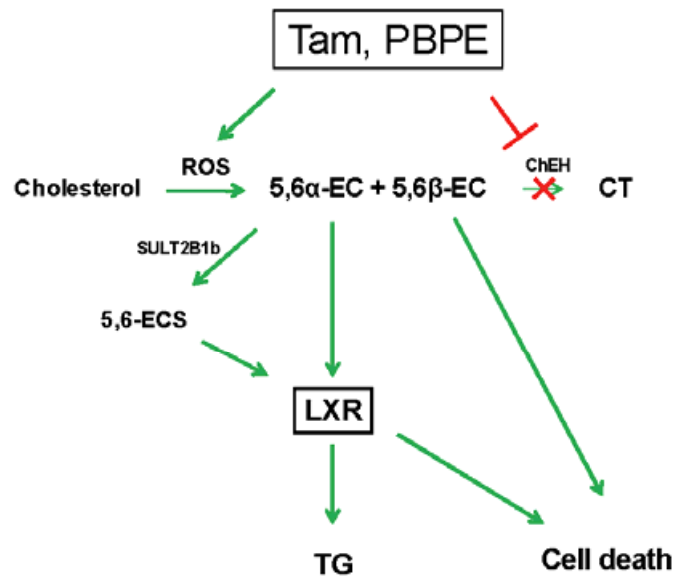


FIGURE 7. Molecular mechanism of TG biosynthesis and cytotoxicity induced by Tam and PBPE in MCF-7 cells.

DISCUSSION

Nous avons mis en évidence une régulation indirecte de LXR β par les ligands d'AEBS dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Le tamoxifène module l'expression de gènes cibles des LXRs avec une stimulation de gènes codant des enzymes impliquées dans la production de triglycérides : la Stearoyl CoA Désaturase (SCD1) et l'Acétyl CoA Carboxylase (ACC). Nous avons montré que LXR β est impliqué dans l'induction de la différenciation des cellules cancéreuses mammaires par le tamoxifène, qui se caractérise par une stimulation de la production de triglycérides. La mort cellulaire provoquée par le tamoxifène est aussi dépendante de LXR β .

Nous avons ensuite établi que le tamoxifène induit une accumulation de CEs en inhibant l'activité ChEH et en stimulant l'autoxydation du cholestérol en CEs puisque la vitamine E, qui est un antioxydant naturel⁴⁶⁹, inhibe l'accumulation de CEs induite par le tamoxifène. Une partie du CE α accumulé sous l'effet du tamoxifène est transformé en CE α -3-sulfate (CES) par la Steroid Sulfotransférase SULT2B1b qui est fortement exprimée dans les cellules MCF-7^{260, 470}. Nous avons montré que le CE α et le CES sont capables de réguler l'activité transcriptionnelle de LXR β et de stimuler l'expression des gènes lipogéniques SCD1 et ACC. La stimulation de la production de triglycérides et l'induction de la mort cellulaire par le CE α et le CES sont dépendantes de LXR β , ce qui suggère que ces métabolites participent aux effets du tamoxifène en régulant l'activité de LXR β . Une extinction de l'expression de SULT2B1b par des siRNAs diminue significativement l'induction de la mort cellulaire par le tamoxifène, ce qui suggère que la transformation du CE α en CES est importante dans les effets du tamoxifène. Le CE β , qui s'accumule aussi après traitement des MCF-7 avec le tamoxifène, est impliqué dans l'induction de la mort cellulaire mais de façon indépendante de LXR β . A la différence du CE α et du CES, le CE β n'induit pas la production de triglycérides et il ne module pas l'activité transcriptionnelle de LXR β .

Nous avons finalement étudié la voie que nous avons mis en évidence dans les cellules MCF-7 dans les cellules MDA-MB231 qui n'expriment pas ER et qui sont décrites pour être résistantes de façon intrinsèque au tamoxifène⁴⁷¹. Nous avons montré que SULT2B1b n'est pas exprimée dans les MDA-MB231. Les CEs s'accumulent dans les MDA-MB231 traitées avec le tamoxifène et la production de triglycérides est aussi observée. Cependant, le CES n'est pas détecté dans ces cellules ce qui suggère que l'absence de SULT2B1b est responsable de l'absence de production de CES. Une compensation métabolique en co-traitant les MDA-MB231 avec le tamoxifène et le CES potentialise les effets du tamoxifène, ce qui montre

l'importance de la production de CES dans les effets cytotoxiques du tamoxifène. La réexpression ectopique de SULT2B1b dans les MDA-MB231 augmente la sensibilité des cellules au tamoxifène, ce qui confirme la potentialisation observée avec le traitement avec le CES.

La voie ChEH-SULT2B1b-LXR β que nous avons caractérisée est importante dans les effets anti-cancéreux du tamoxifène puisque l'extinction de LXR β ou de SULT2B1b ou l'ajout de vitamine E qui inhibe la production des CEs diminuent l'induction de la différenciation et la mort des cellules MCF-7 par le tamoxifène. La fonctionnalité de cette voie est un témoin de sensibilité des cellules cancéreuses mammaires au tamoxifène. En effet, nous avons montré que dans les cellules MDA-MB231 résistantes au tamoxifène, la voie ChEH-SULT2B1b-LXR β n'est pas fonctionnelle à cause d'une absence d'expression de SULT2B1b et un rétablissement de la voie ChEH-SULT2B1b-LXR β par la réexpression de SULT2B1b induit une resensibilisation des MDA-MB231 au tamoxifène. Cela suggère que ces résultats pourraient être appliqués en clinique sur des tumeurs de cancers du sein résistantes au tamoxifène. En effet, le niveau d'expression de SULT2B1b pourrait devenir un marqueur de résistance au tamoxifène puisqu'elle n'est pas exprimée dans la lignée cellulaire MDA-MB231. D'autres gènes pourraient intervenir dans la régulation de la voie ChEH-SULT2B1b-LXR β et leur niveau d'expression pourrait influencer les effets différenciants et cytotoxiques du tamoxifène. Une étude transcriptomique sur plusieurs lignées résistantes au tamoxifène pourrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs de résistance. Notre étude s'inscrit en continuité de l'étude de Pitroda *et al.* qui avaient montré l'implication d'un réseau de 38 gènes du métabolisme des stérols et du métabolisme lipidique dans la résistance au tamoxifène dûe à une surexpression de la Mucine 1 (MUC1)⁴⁷². Au centre de ce réseau métabolique figure les LXRs mais Pitroda *et al.* n'ont pas défini de mécanisme moléculaire reliant la dérégulation de ces gènes avec des caractéristiques de résistance au tamoxifène. Nous apportons ici un premier élément de réponse mécanistique qui pourrait stimuler des investigations plus larges de cette voie métabolique en relation avec la résistance au tamoxifène qui reste un défi de santé publique.

Maintenant que nous avons identifié l'implication de LXR β dans les effets différenciants et cytotoxiques du tamoxifène, il serait intéressant d'étudier comment LXR β provoque la différenciation et la mort des cellules cancéreuses mammaires. Nous avons identifié des gènes lipogéniques (SCD1 et ACC), connus pour être des gènes cibles des LXRs, qui sont stimulés par le tamoxifène. L'augmentation de leur expression pourrait expliquer la stimulation de la

production de triglycérides qui est associée à un phénotype différencié. La différenciation cellulaire fait aussi intervenir un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 ⁴⁷³, ce qui a été observé dans l'induction de la différenciation cellulaire par les ligands d'AEBS ¹¹⁶. Les LXRs ont déjà été caractérisés pour réguler l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire comme les cyclines et les inhibiteurs de CDKs ⁴¹⁹. Il est possible que le tamoxifène régule l'expression de ces régulateurs du cycle cellulaire par un mécanisme faisant intervenir LXR β . Concernant la mort cellulaire, l'équipe avait montré que le tamoxifène provoque l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires par un mécanisme qui passe par sa fixation à AEBS et qui augmente le ratio Bax/Bcl-2 responsable de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ¹¹⁷. Il a été montré que les LXRs régulent l'expression de Bax et de Bcl-2 ¹²⁰. La modification du ratio Bax/Bcl-2 par le tamoxifène pourrait donc dépendre de la régulation de leur expression par LXR β . L'identification de la voie ChEH-SULT2B1b-LXR β dans les effets anti-cancéreux du tamoxifène dessert de nombreuses études mécanistiques visant à mieux comprendre le mode d'action du tamoxifène qui dépend de sa fixation sur sa cible secondaire AEBS.

Le tamoxifène est athéroprotecteur et il améliore le taux de cholestérol sanguin ⁷⁸. Aussi, le tamoxifène provoque une hypertriglycéridémie chez certaines patientes ⁸¹. Les LXRs ont été définis comme des régulateurs clés du métabolisme lipidique qui en font des cibles activement étudiées pour combattre l'athérosclérose. Des ligands spécifiques des LXRs ont été synthétisés et testés pour leurs effets athéroprotecteurs. Malgré l'obtention des effets recherchés pour combattre l'athérosclérose au niveau du métabolisme du cholestérol avec une augmentation du transport inverse du cholestérol, les agonistes synthétiques provoquent une hypertriglycéridémie importante qui empêche leur utilisation thérapeutique ⁴⁷⁴. Les effets de l'activation des LXRs sur le métabolisme du cholestérol et le métabolisme lipidique reflètent exactement les effets secondaires du tamoxifène observés en clinique énoncés ci-dessus. L'hypertriglycéridémie causée par le tamoxifène peut provenir du foie sur lequel le tamoxifène agit ⁴⁷⁵. Il est possible que le tamoxifène provoque une activation de LXR α qui est exprimé de façon prédominante dans le foie et qui est plus fortement impliqué dans la stimulation de la lipogénèse en comparaison avec LXR β ²⁵³. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier l'implication des LXRs dans les effets secondaires du tamoxifène. L'étude de l'activité des LXRs dans des hépatocytes sous l'effet du tamoxifène pourrait apporter des éléments mécanistiques à l'apparition des effets secondaires énoncés. Le tamoxifène est aussi ostéoprotecteur ce qui est un effet recherché pour les femmes post-

ménopausées qui ne bénéficient plus de l'action protectrice des oestrogènes sur l'os ⁷⁴. ER protège l'os en stimulant l'apoptose des ostéoclastes ⁷¹ qui sont des cellules responsables de la dynamique osseuse en dégradant la matrice extracellulaire osseuse. Le mécanisme d'action a été établi avec les oestrogènes et il a été déduit que les SERMs, dont le raloxifène utilisé pour le traitement de l'ostéoporose de la femme ménopausée, ont un effet agoniste sur ER dans l'os ³⁴. Cependant, il n'est pas clairement démontré que le mécanisme ostéoprotecteur des SERMs passe par ER. Récemment, une étude a montré que l'activation de LXR β inhibe la différenciation des ostéoclastes ⁴⁷⁶, ce qui serait en faveur de la protection de la matrice extracellulaire osseuse. Comme les SERMs sont des ligands d'AEBS et que nous avons montré qu'ils activent LXR β , il est possible que les SERMs protègent l'os par un mécanisme dépendant de LXR β . Cela ouvre la perspective d'études visant à déterminer la part d'implication d'ER et de LXR β dans les effets ostéoprotecteurs des SERMs. L'implication éventuelle de LXR β dans les effets secondaires du tamoxifène et plus généralement des SERMs pourrait permettre de mieux les maîtriser, par exemple en développant de nouveaux agents pharmacologiques qui ciblent LXR β et qui pourraient être utilisés en co-traitement avec des SERMs.

Article 3

Identification et caractérisation pharmacologique de la cholestérol-5,6-époxyde hydrolase comme cible du tamoxifène et des ligands d'AEBS

(Accepté)

INTRODUCTION

Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que les ligands d'AEBS exercent leur activité anti-tumorale en modulant le métabolisme des stérols ^{116, 117}. Deux enzymes cholestérogéniques sont impliqués dans la liaison des ligands d'AEBS, il s'agit de la DHCR7 et de la D8D7I qui constituent AEBS ⁹³. Les ligands d'AEBS inhibent l'activité enzymatique de DHCR7 et de D8D7I ce qui provoque une accumulation de leur substrat respectif, le 7-déshydrocholestérol et le zymosténol. Le tamoxifène et les ligands d'AEBS induisent aussi une accumulation d'oxystérols qui sont impliqués dans l'activité de différenciation et dans la cytotoxicité des ligands d'AEBS dans des cellules cancéreuses mammaires ^{116, 117}. L'accumulation d'oxystérols nécessite l'intervention de processus oxydatifs puisqu'un antioxydant comme la vitamine E inhibe leur production et par conséquent l'action anti-cancéreuse des ligands d'AEBS. Les oxystérols majeurs générés par autoxydation du cholestérol sont les cholestérol-5,6-époxydes et le 7-cétocholestérol. Les substrats de la cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) sont les CEs, et il serait possible que la ChEH soit la cible des ligands d'AEBS ce qui participerait à l'accumulation de CE. D'autre part, le 7-cétocholestérol qui est un ligand naturel d'AEBS, mais aussi d'autres stérols oxydés sur le cycle B comme le 7-cétocholestanol, sont aussi des inhibiteurs de l'activité ChEH à des concentrations proches de celles où ils se lient à AEBS. Aussi, AEBS et la ChEH sont tous les deux localisés au niveau du réticulum endoplasmique. Nous avons donc émis l'hypothèse que le site AEBS pourrait porter l'activité ChEH, pour laquelle aucune enzyme n'a encore été identifiée, ce que nous avons mis en évidence et caractérisé dans cette étude ¹²¹.

Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands

Philippe de Medina^{a,b}, Michael R. Paillasse^{a,b}, Gregory Segala^{a,c,d}, Marc Poirot^{a,c,d,1}, and Sandrine Silvente-Poirot^{a,c,d}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U563, Équipe: Métabolisme, Oncogénèse et Différenciation Cellulaire, 31052 Toulouse, France; ^bAffichem, 31400 Toulouse, France; ^cInstitut Claudius Regaud, 31052 Toulouse, France; and ^dUniversité Toulouse III Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France

Edited by David J. Mangelsdorf, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and approved June 9, 2010 (received for review March 5, 2010)

The microsomal antiestrogen binding site (AEBS) is a high-affinity target for the antitumor drug tamoxifen and its cognate ligands that mediate breast cancer cell differentiation and apoptosis. The AEBS, a hetero-oligomeric complex composed of 3 β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase (D8D7I) and 3 β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase (DHCR7), binds different structural classes of ligands, including ring B oxysterols. These oxysterols are inhibitors of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH), a microsomal epoxide hydrolase that has yet to be molecularly identified. We hypothesized that the AEBS and ChEH might be related entities. We show that the substrates of ChEH, cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol (α -CE) and cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol (β -CE), and its product, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT), are competitive ligands of tamoxifen binding to the AEBS. Conversely, we show that each AEBS ligand is an inhibitor of ChEH activity, and that there is a positive correlation between these ligands' affinity for the AEBS and their potency to inhibit ChEH ($r^2 = 0.95$; $n = 39$; $P < 0.0001$). The single expression of D8D7I or DHCR7 in COS-7 cells slightly increased ChEH activity (1.8- and 2.6-fold), whereas their coexpression fully reconstituted ChEH, suggesting that the formation of a dimer is required for ChEH activity. Similarly, the single knockdown of D8D7I or DHCR7 using siRNA partially inhibited ChEH in MCF-7 cells, whereas the knockdown of both D8D7I and DHCR7 abolished ChEH activity by 92%. Taken together, our findings strongly suggest that the AEBS carries out ChEH activity and establish that ChEH is a new target for drugs of clinical interest, polyunsaturated fatty acids and ring B oxysterols.

breast cancer | chemoprevention | cholesterol metabolism | oxysterol | docosahexaenoic acid

Tamoxifen (Tam) is one of the most commonly used drugs worldwide for hormonal treatment and chemoprevention of estrogen receptor (ER)-positive breast cancers (1). In this application, Tam activity is mediated through the modulation of gene expression under the control of ERs. Tam's pharmacology is complex, however; it exerts nongenomic effects through other targets at therapeutic doses (2). After the ER, the microsomal antiestrogen binding site (AEBS) is the target of highest affinity for Tam. The AEBS has no affinity for estrogens, but binds selective ER modulators (SERMs); these ligands contain a hydrophobic core that mimics the steroid backbone of estrogens, grafted to a dialkylaminoalkyl side chain. Thus, in addition to Tam, SERMs, such as raloxifene, 4 OH Tam, and RU 39411, are ligands of the AEBS (3–5). The AEBS selectively binds diphenylmethane derivatives of Tam, including (4-benzyl-phenoxy)-ethyl-N-pyrrolidine (PBPP) and toremifene (6) and it also binds σ -receptor ligands and inhibitors of cholesterol biosynthesis, such as triparanol and AY-9944 (5, 7). All of these classes of synthetic AEBS ligands have a protonable dialkylaminoalkyl chain in common that is necessary for high-affinity binding to the AEBS (6). In the quest for natural AEBS ligands, several unsaturated fatty acids and ring B oxysterols have been identified (8, 9). Oxysterols that bind to the AEBS are cholesterol oxidized on ring B of the cholesterol backbone and include 5-cholestan-3 β -ol-7-one (7-ketocholesterol), 5 α -cholestan-

3 β -ol-7-one (7-ketocholestanol), and 5 α -cholestan-3 β -ol-6-one (6-ketocholestanol) (8).

In previous work, we established that the coexpression of 3 β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase (D8D7I) and 3 β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase (DHCR7) in mammalian cells is necessary and sufficient to reconstitute the high-affinity binding site for [³H]Tam (i.e., the AEBS) (5). D8D7I and DHCR7 are two enzymes involved in specific catalytic steps in the postlanosterol biosynthesis of cholesterol. Consistent with the fact that the AEBS binds σ -receptor ligands (7), D8D7I (an AEBS subunit) carries a binding site for σ -receptor ligands (10). AEBS expression is ubiquitous, and AEBS is highly expressed in proliferative cells, such as tumor cells, and in cholesterologenic tissues, such as the liver and brain, in accordance with its relationship with cholesterol metabolism (5, 10, 11). We recently established that AEBS ligands induce breast cancer cell differentiation and apoptosis through a mechanism involving the production of sterol autoxidation products (3, 4, 12). Cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol (α -CE), cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol (β -CE), and 7-ketocholesterol are among the major autoxidation products of cholesterol (13). CEs (α -CE and β -CE) are the only known substrates of cholesterol epoxide hydrolase (ChEH), and 7-ketocholesterol is an inhibitor of ChEH (14, 15). ChEH (EC 3.3.2.11) catalyzes the hydrolysis of α -CE and β -CE into a unique geminal trans-diol, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) (16) (SI Appendix, Fig. S1).

We have observed that the AEBS and ChEH share similar characteristics and pharmacological properties. Indeed, ring B oxysterols, such as 6-ketocholestanol, 7-ketocholestanol, and 7-ketocholesterol, inhibit ChEH (14) and bind to the AEBS (8) with the same order of potency. In addition, ChEH is inhibited by an autoxidation product of 7 dehydrocholesterol (17), and 7 dehydrocholesterol is the substrate of DHCR7, an AEBS subunit (5). Moreover, as with the AEBS, ChEH is located in the endoplasmic reticulum of cells and is found in most mammalian tissues, with the liver being the richest source of both the AEBS and ChEH (18, 19). ChEH is the last member of the epoxide hydrolase family with an unidentified coding gene. The results from these studies, along with the relationship that we established between sterol autoxidation products and the functions of the AEBS (3, 4, 12), suggested to us a pharmacological and structural link between the AEBS and ChEH, which we investigated in the present study. Our results indicate that the enzymes that form the AEBS are involved in the catalytic activity of ChEH.

Author contributions: P.d.M., M.R.P., G.S., and M.P. performed research; P.d.M., M.P., and S.S.-P. analyzed data; M.P. and S.S.-P. designed research; and M.P. and S.S.-P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: marc.poirot@hotmail.com.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1002922107/-DCSupplemental.

Results

α -CE, β -CE, and CT Are Competitive Ligands of the AEBS. We began by investigating whether the substrates of ChEH (α -CE and β -CE) and CT, the product of ChEH activity, are ligands of the AEBS. We performed assays on rat liver microsomes, the richest source of the AEBS (6). Competitive binding assays showed that increasing concentrations of unlabeled Tam, α -CE, β -CE, or CT inhibited the binding of 2.5 nM [3 H]Tam to the AEBS in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). The IC_{50} was 5.9 ± 0.5 nM for Tam, 153 ± 0.5 nM for α -CE, 394 ± 1 nM for β -CE, and 16.3 ± 0.6 μ M for CT. To study the modality of the inhibition by α -CE, β -CE, and CT, we performed Scatchard analyses of [3 H]Tam binding in the absence or presence of two concentrations of α -CE (Fig. 1B), β -CE (Fig. 1C), and CT (Fig. 1D). For each experiment, a diminished slope of the lines indicated decreasing [3 H]Tam affinity, whereas the B_{max} remained unchanged. These data demonstrate that the substrates (α -CE and β -CE) and the product (CT) of ChEH are competitive ligands of the AEBS, with apparent K_i values of 66.5 ± 0.2 nM for α -CE, 171.3 ± 1.4 nM for β -CE, and 7.1 ± 0.6 μ M for CT.

The Prototypical AEBS Ligands Tam and PBPE Are Inhibitors of ChEH.

To test the effects of AEBS ligands on ChEH, we first measured ChEH activity by incubating rat liver microsomes with 20 μ M [14 C] α -CE and separated it from CT by TLC. The migration of CE and CT was validated by reference to commercially available standards. As shown in the TLC autoradiogram (SI Appendix, Fig. S2A, Left), the conversion of α -CE to CT was time-dependent. Steady-state kinetics were apparent for the first 10 min of incubation (SI Appendix, Fig. S2A, Right). Consequently, all subsequent experiments were performed using a 9-min incubation period. The K_m was 7.4 ± 0.5 μ M, and the V_{max} was 0.62 ± 0.01 nmol CT/mg protein/min (SI Appendix, Fig. S2B), consistent with data reported in the literature (14, 15). We then assessed ChEH activity, measured using [14 C] α -CE or [14 C] β -CE as the substrate,

in the presence of known inhibitors (6-ketocholestanol and 7-ketocholestanol) (14), as well as in the presence of prototypical AEBS ligands (Tam and PBPE). The conversion of α -CE or β -CE to CT was inhibited by 10 μ M 6-ketocholestanol or 7-ketocholestanol and by 1 μ M Tam or PBPE (SI Appendix, Fig. S2C). Taken together, these results indicate that Tam and PBPE inhibit ChEH activity.

Tam and PBPE Are Competitive Inhibitors of ChEH. We next carried out experiments to determine the modality of ChEH inhibition by Tam and PBPE. Tam inhibited ChEH in a concentration-dependent manner, as shown by a double-reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of the inhibition of [14 C] α -CE hydration by Tam in Fig. 2A. The x -intercept (i.e., the $1/K_m$ value) decreased, whereas the y -intercept (i.e., the V_{max} value) was not affected; these changes are characteristic of competitive inhibition. This was confirmed through a Dixon plot of the inverse of the velocity as a function of increasing Tam concentration in the presence of two concentrations of [14 C] α -CE (SI Appendix, Fig. S3A). The x -intercept gave a K_i value of 34 ± 8 nM for Tam. The same experiments carried out with PBPE, a selective AEBS ligand, showed competitive inhibition of ChEH, with a K_i value of 27 ± 6 nM (Fig. 2B and SI Appendix, Fig. S3B). These results indicate that Tam and PBPE are potent competitive inhibitors of ChEH activity.

Synthetic AEBS Ligands Are Inhibitors of ChEH. We tested the potency of AEBS ligands of different pharmacological classes to inhibit ChEH. All of the selective AEBS ligands (compounds 1–8; SI Appendix, Fig. S4A) inhibited ChEH activity (Table 1). The most potent inhibitors were PBPE, 1-(2-[4-(2-phenylpropan-2-yl)phenoxy]ethyl)pyrrolidine (PCPE), tesmilifene, 4-[2-(4-benzylphenoxy)ethyl]morpholine (MBPE), and 4-(2-[4-(2-phenylpropan-2-yl)phenoxy]ethyl)morpholine (MCPE) (5), with potencies in the nanomolar range, whereas 1-[4-(2-morpholino ethoxy)phenyl]-2-phenylethanone (MC-OCH₂PE) was the least potent, with a K_i value in the micromolar range for ChEH (Table 1). In the subsequent series, we found that SERMs (compounds 9–14; SI Appendix, Fig. S4B) inhibited ChEH

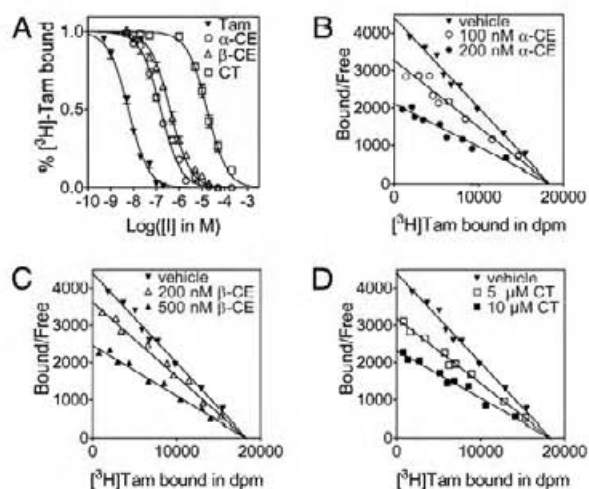


Fig. 1. Competition for [3 H]Tam binding to the microsomal AEBS by Tam, α -CE, β -CE, and CT. (A) Competition assays with increasing concentrations of unlabeled Tam (\blacktriangledown), α -CE (\bullet), β -CE (\blacktriangle), and CT (\blacksquare) were performed on rat liver microsomes using 2.5 nM [3 H]Tam. (B) Scatchard plots of [3 H]Tam binding to the microsomal AEBS in the absence (\blacktriangledown) or presence of 100 nM α -CE (\circ) or 200 nM α -CE (\bullet). (C) Scatchard plots of [3 H]Tam binding to the microsomal AEBS in the absence (\blacktriangledown) or presence of 200 nM β -CE (\triangle) or 500 nM β -CE (\blacktriangle). (D) Scatchard plots of [3 H]Tam binding to the microsomal AEBS in the absence (\blacktriangledown) or presence of 5 μ M CT (\square) or 10 μ M CT (\blacksquare). The lines intercept on the x -axis, indicating that α -CE, β -CE, and CT are competitive ligands of the AEBS with respect to Tam binding. Measurements were made in triplicate for at least three separate experiments. Data are presented as the mean \pm SEM.

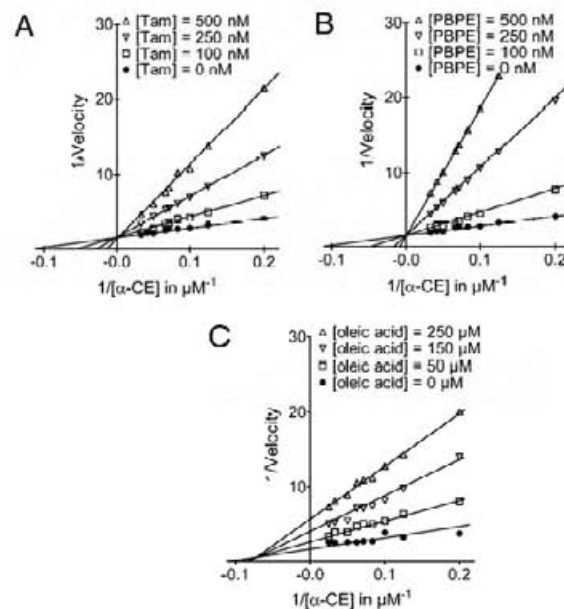


Fig. 2. Inhibition of ChEH by Tam, PBPE, and oleic acid. The relationship between the conversion rates of α -CE to CT and inhibitor concentrations is shown using 10 and 20 μ M Tam and PBPE with rat liver microsomal ChEH. Shown are double reciprocal plots of Tam (A), PBPE (B), and oleic acid (C) versus [14 C] α -CE.

Table 1. Inhibition of [³H]Tam binding to the AEBS and catalytic activity of ChEH by drugs

Compound	K_i AEBS, nM	K_i ChEH, nM
Selective AEBS ligands		
PBPE	1	9 ± 1
PCPE	2	10 ± 1
Tesmlifene	3	56 ± 2
MBPE	4	18 ± 1
MCPE	5	48 ± 2
PCOPE	6	64 ± 4
MCOPE	7	102 ± 16
MCOCH2PE	8	850 ± 12
SERMs		
Tamoxifen	9	2.5 ± 0.2
4OH-Tamoxifen	10	11 ± 1
Raloxifene	11	6 ± 1
Nitromiphen	12	2.4 ± 0.3
Clomiphene	13	1.5 ± 0.2
RU 39,411	14	38 ± 1
σ receptor ligands		
BD-1008	15	83 ± 1
Haloperidol	16	5,322 ± 9
SR-31747A	17	1.2 ± 0.1
Ibogaine	18	920 ± 12
AC-915	19	1,120 ± 8
Rimazole	20	640 ± 5
Amiodarone	21	437 ± 22
Trifluoperazine	22	14 ± 2
Cholesterol biosynthesis inhibitors		
Ro 48-8071	23	110 ± 4
U-18666A	24	84 ± 2
AY-9944	25	358 ± 12
Triparanol	26	17 ± 2
Terbinafine	27	3,720 ± 16
SKF-525A	28	897 ± 10
Ring B oxysterols		
6-Ketocholestanol	29	1,122 ± 30
7-Ketocholestanol	30	580 ± 12
7-Ketocholesterol	31	1,223 ± 31
7 α -Hydroxycholesterol	32	2,252 ± 32
7 β -Hydroxycholesterol	33	4,471 ± 22
6-Keto-5 α -hydroxycholestanol	34	5,320 ± 22
Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	35	7,131 ± 28
Fatty acids		
Oleic acid	36	48,144 ± 19
α -Linolenic acid	37	38,232 ± 41
ARA	38	26,171 ± 17
DHA	39	18,284 ± 19

Rat liver microsomes were incubated with a single concentration of 2.5 nM [³H]Tam and increasing concentrations of inhibitors ranging from 0.1 nM to 1,000 μ M under the conditions described in *SI Appendix, SI Materials and Methods*. IC_{50} values were determined using the iterative curve fitting program GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software). For the AEBS, the apparent K_i was expressed as $K_i = [IC_{50}]/(1 + ([^3H]Tam)/K_d)$, using 2.5 nM [³H]Tam and a K_d of 2 nM. The K_i values of drugs for ChEH inhibition were determined using 150 μ g of rat liver microsomal protein and 10 and 20 μ M of [¹⁴C] α -CE with increasing concentrations of inhibitors ranging from 0.01 to 1000 μ M, under the conditions described in *SI Appendix, SI Materials and Methods*. K_i was measured as the projection on the x-axis of the intersection of the lines obtained from 1/V versus [inhibitor] plots for ChEH. Values are the average of three experiments \pm SEM, each carried out in duplicate.

in the following order of potency: clomiphene > nitromiphen > Tam > raloxifene > 4OH-tamoxifen > RU 39,411 (Table 1). ER ligands with no affinity for the AEBS, such as 17 β -estradiol, diethylstilbestrol, ICI 164,384, RU 56668, and ICI 182,780 (*SI Appendix, Fig. S7*), did not inhibit the ChEH at concentrations up to 10 μ M (*SI Appendix,*

Table S1). Of the σ -receptor ligands (*SI Appendix, Fig. S5.4*), compounds 15–22 were both ligands of the AEBS and inhibitors of ChEH with the following order of potency: SR-31747A > BD-1008 > trifluoperazine > amiodarone > ibogaine \geq rimazole > AC-915 > haloperidol (Table 1). SR-31747A had the highest affinity for the AEBS and was the most potent ChEH inhibitor of the compounds tested, with a K_i value of 1.2 ± 0.1 nM for the inhibition of Tam binding to the AEBS and a K_i value of 6 ± 2 nM for ChEH inhibition. Other σ -receptor ligands (compounds S6–S10; *SI Appendix, Fig. S7*), including ditolyl guanidine (DTG), (+)-pentazocine, (+)-3PPP, PRE-084, and progesterone, failed to bind to the AEBS and inhibit ChEH, even at concentrations up to 1,000 μ M (*SI Appendix, Table S1*). In the last series of synthetic compounds, inhibitors of cholesterol biosynthesis already reported to be AEBS ligands (5) (compounds 23–28; *SI Appendix, Fig. S5.4*), including U-18666A, triparanol, AY-9944, and SKF 525A, and newly identified AEBS ligands, such as terbinafine and Ro 48-8071, were inhibitors of ChEH (Table 1). Together, these results establish that every tested drug that bound to the AEBS was an inhibitor of ChEH.

Unesterified Ring B Oxysterols Are Inhibitors of ChEH. We next evaluated a set of oxysterols (*SI Appendix, SI Appendix, Figs. S6 and S8*). Ring B oxysterols (compounds 29–34; *SI Appendix, Fig. S6*) inhibited ChEH according to the following order of potency: 7-ketocholestanol > 6-ketocholestanol > 7-ketocholesterol > 7 α -hydroxycholesterol > 7 β -hydroxycholesterol > 6-keto-5 α -hydroxycholestanol > CT (Table 1). In contrast, side-chain oxysterols (compounds S13–S16; *SI Appendix, Fig. S8*) did not inhibit ChEH activity or bind to the AEBS (*SI Appendix, Table S1*). Ring B oxysterols were previously shown to be competitive inhibitors of ChEH (14) as well as of Tam binding to the AEBS (8). In addition, the sulfate ester α -CE (S17) and the stearic acid ester of CE (S18) had no affinity for the AEBS and were not inhibitors of ChEH (*SI Appendix, Table S1*). Thus, unlike α -CE, esterified forms of α -CE are not substrates of ChEH. Our data indicate that unesterified ring B oxysterols are both inhibitors of ChEH and ligands of the AEBS, whereas side-chain oxysterols and esterified ring B oxysterols are not.

Unsaturated Fatty Acids That Are AEBS Ligands Are Inhibitors of ChEH. Because oleic acid is a noncompetitive ligand of the AEBS (20), we next studied whether oleic acid can inhibit ChEH activity, and analyzed the modality of its inhibition. Using Lineweaver-Burk analysis (Fig. 2C) and Dixon analysis (*SI Appendix, Fig. S3C*), we found that oleic acid is a noncompetitive inhibitor of ChEH, with a K_i value of 54 μ M (Table 1). We extended this study by testing other fatty acids [compounds 36–39 (*SI Appendix, Fig. S6*) and S19–S21 (*SI Appendix, Fig. S8*)]. Unsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA), α -linolenic acid, and arachidonic acid (ARA), are inhibitors of ChEH activity, whereas the saturated fatty acids stearic acid and palmitic acid and the methyl ester of oleic acid are not (*SI Appendix, Table S1*). These data indicate that unsaturated fatty acids are inhibitors of ChEH, and that oleic acid is a noncompetitive inhibitor.

Ligands' Affinity for the AEBS Positively Correlates with Their Inhibition of ChEH. Plotting the pK_i [$-\log(K_i)$] of compounds that bound to the AEBS as a function of their pK_i values for their inhibitory potency of ChEH activity yielded a positive linear correlation between both parameters, with an r^2 value of 0.95 ($n = 39$; $P < 0.0001$) (Fig. 3). This demonstrates a clear correlation between the affinity for the AEBS and ChEH inhibition for the different classes of molecules.

D8D7I and DHCR7 Coexpression Allows the Reconstitution of ChEH. We previously reported that the coexpression of D8D7I and DHCR7 is necessary for reconstitution of the AEBS in mammalian COS-7 cells (5). We evaluated whether these two enzymes were involved in ChEH activity. As shown in Fig. 4A, the basal

activity of ChEH was low in COS-7 cells transfected with the vector control (mock). The single expression of D8D71 (D8) or DHCR7 (D7) in COS-7 cells induced a slight increase in ChEH activity (1.8- and 2.6-fold, respectively) compared with the vector control. In contrast, the coexpression of D8D71 and DHCR7 (D8 + D7) in COS-7 cells potentiated ChEH activity by 8.5-fold (Fig. 4A). A V_{max} value of 0.46 ± 0.04 nmol CT/mg protein/min and a K_m value of 4.47 ± 0.05 μ M was measured in the D8D71 and DHCR7 coexpression experiments, compared with a $V_{max} = 0.05 \pm 0.002$ nmol CT/mg protein/min and $K_m = 7.01 \pm 0.05$ μ M for the vector-only transfected cells (Fig. 4B). These data indicate that coexpression of D8D71 and DHCR7 led to the reconstitution of robust ChEH activity in mammalian cells, indicating that ChEH activity requires both enzymes. We tested the inhibition of ChEH by various AEBS ligands on COS-7 cell lysates that coexpressed D8D71 and DHCR7 (Fig. 4C). The order of potency of AEBS ligands for inhibiting the reconstituted ChEH was as follows: clomiphene ($K_i = 32.3 \pm 0.5$ nM) > PBPE ($K_i = 43.3 \pm 0.4$ nM) > Tam ($K_i = 57.3 \pm 0.6$ nM) > 4OH-tamoxifen ($K_i = 295.8 \pm 0.8$ nM) > 7-ketocholestanol ($K_i = 711.6 \pm 0.9$ nM). 17 β -Estradiol, which does not bind to the AEBS (SI Appendix, Table S1), did not inhibit the reconstituted ChEH. These data establish that the pharmacological profile obtained with the ChEH is similar to that of the AEBS (5).

Knockdown of D8D71 and DHCR7 Abolishes ChEH Activity. To confirm that D8D71 and DHCR7 both contribute to ChEH, we conducted knockdown experiments using siRNA against D8D71 and DHCR7 in a human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells. The siRNA specificities were evaluated at the mRNA and at the protein levels for the expression of D8D71 and DHCR7. The impact of knockdowns on the kinetic parameters of ChEH and on the binding parameters of [3 H]Tam to the AEBS was measured. MCF-7 cells expressed the AEBS ($K_d = 5.2 \pm 1.4$ nM, $B_{max} = 1,553 \pm 25$ fmol/mg proteins) (4), and ChEH activity was found, with a V_{max} value of 0.38 ± 0.07 nmol CT/mg protein/min and a K_m value of 5.91 ± 0.06 μ M (Fig. 4G and H). Transfection of the cells with D8D71 siRNA, but not with scrambled siRNA, led to decreased D8D71 expression at the mRNA level (72%) (Fig. 4D) and protein level (60%) (Fig. 4E). Interestingly, it also reduced ChEH activity by 47% (Fig. 4F), with $V_{max} = 0.18 \pm 0.09$ nmol CT/mg protein/min, $K_m = 3.87 \pm 0.07$ μ M (Fig. 4G), and a 42% decrease in the amount of AEBS ($K_d = 6.1 \pm 0.4$ nM, $B_{max} = 897 \pm 18$ fmol/mg

proteins) (Fig. 4H). Transfection of the cells with DHCR7 siRNA, but not with scrambled siRNA, decreased DHCR7 expression at the mRNA level (73%) (Fig. 4D) and protein level (64%) (Fig. 4E). Knockdown of DHCR7 increased the K_m value of ChEH by 66% ($K_m = 17.22$ μ M) with no significant changes in the V_{max} value (Fig. 4G), and reduced the affinity of Tam for the AEBS with no changes in the B_{max} value ($K_d = 7.2 \pm 0.6$ nM, $B_{max} = 1,445 \pm 23$ fmol/mg proteins) (Fig. 4H). Finally, transfection of the cells with D8D71 siRNA and DHCR7 siRNA produced a comparable decrease in D8D71 and DHCR7 expression as in the single knockdown experiments, associated with a drastic reduction (92%) in ChEH activity (Fig. 4F) that was more than additive ($V_m = 0.023 \pm 0.06$ nmol CT/mg protein/min, with no change in the K_m value (5.75 ± 0.07 μ M) (Fig. 4G). A similar effect on the AEBS was observed, with a 93% decrease in the B_{max} value (103.5 ± 29 fmol/mg proteins) with no changes in the K_d value (Fig. 4H). These decreases are greater than expected based on the reduction in protein expression and strongly suggest that D8D71 and DHCR7 cooperate in the ChEH activity. These data further demonstrate that D8D71 and DHCR7 are involved in the ChEH activity.

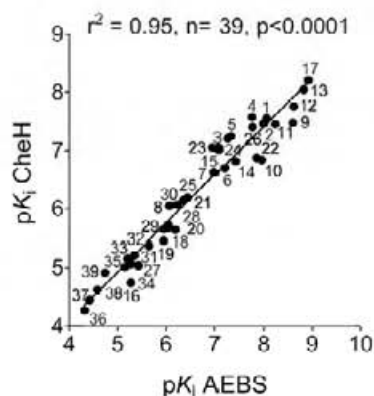


Fig. 3. Correlation between affinity of AEBS ligands for the AEBS and their potency to inhibit ChEH. Graph of the pK_i for 39 compounds tested for the inhibition of [3 H]Tam binding as a function of pK_i on ChEH activity. The drug numbers and the corresponding pK_i values [$-\log(K_i)$] are listed in Table 1. Here r is the correlation coefficient between pK_i values calculated for the inhibition of Tam binding and ChEH activity. The r^2 value of 0.95 and significance of correlation ($P < 0.0001$) are given for all structural classes of compounds ($n = 39$).

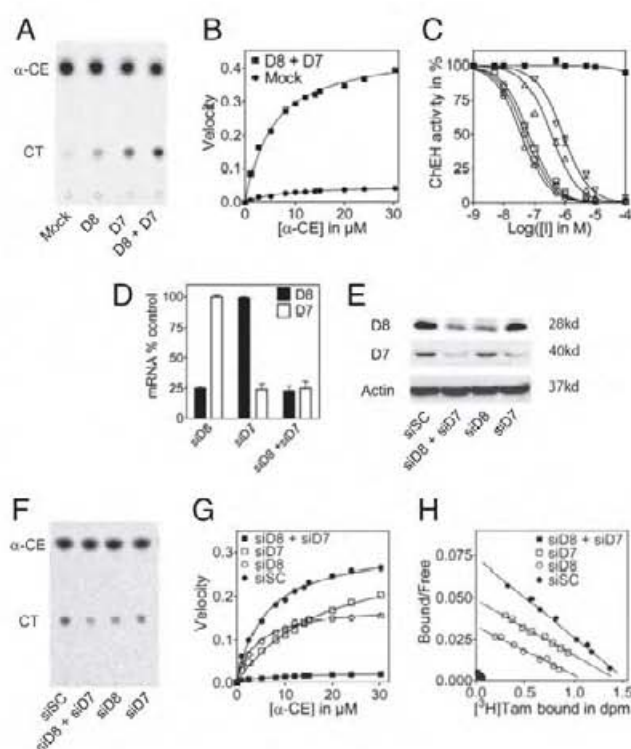


Fig. 4. Expression and knockdown of D8D71 and DHCR7 in mammalian cells: Impact on ChEH and AEBS activities. (A) ChEH activity of microsomal extracts from COS-7 cells transfected with control vector (mock), D8, D7, and D8 + D7. (B) Michaelis-Menten plot of velocity versus α -CE in ChEH assays from COS-7 cells transfected with mock (\bullet) or D8 + D7 (\blacksquare). (C) Inhibition of ChEH in microsomal extracts from COS-7 cells coexpressing human recombinant D8 and D7 with increasing concentrations of clomiphene (\circ), PBPE (\square), Tam (\square), 4OH-tamoxifen (Δ), 7-ketocholestanol (∇), or 17 β -estradiol (\blacksquare). (D, E) Expression of D8 and D7 in MCF-7 cells transfected with siSC scrambled, siD8, siD7, or siD8 + siD7 at the mRNA level (D) and at the protein level (E). (F) Representative TLC autoradiogram showing ChEH activity in MCF-7 cells from three independent experiments. (G) Michaelis-Menten plot of velocity versus α -CE in ChEH assays from MCF-7 cells transfected with control scrambled siRNA (siSC, \bullet), siD8 (\circ), siD7 (\square), or siD8 + siD7 (\blacksquare). (H) Scatchard plots of [3 H]Tam binding to microsomal AEBS from MCF-7 cells transfected with siSC (\bullet), siD8 (\circ), siD7 (\square), or siD8 + siD7 (\blacksquare). Measurements were made in triplicate for at least three separate experiments. Data are presented as mean \pm SEM.

Discussion

The present study provides evidence that the AEBS and ChEH are pharmacologically and molecularly related. We have shown that substrates (CEs) and the product (CT) of ChEH are competitive inhibitors of Tam binding to the AEBS, and have established that ChEH is inhibited by all AEBS ligands tested, demonstrating that inhibition of ChEH is a hallmark of AEBS ligands. We found that different structural classes of AEBS ligands inhibit ChEH with the same modality as they inhibit [3 H]Tam binding to the AEBS. We established the pharmacological similarities by showing a positive correlation between inhibition of ChEH activity and affinity of compounds for the AEBS. Importantly, compounds belonging to different pharmacological or biochemical classes that had no affinity for the AEBS did not inhibit ChEH. With the series of synthetic compounds, the arylaminoalkyl structure was not sufficient for ChEH inhibition; such compounds as (+)-3-PPP, (+)-pentazocine, PRE-084, and MCH₃PE did not inhibit ChEH or compete with Tam for binding to the AEBS.

As shown previously for reconstitution of the AEBS (5), transient coexpression of D8D7I and DHCR7 in COS-7 cells led to the reconstitution of ChEH. We confirmed the involvement of D8D7I and DHCR7 in ChEH through knockdown experiments using siRNA directed against D8D7I and DHCR7. These data show that both D8D7I and DHCR7 are required for the dual reconstitution of ChEH and the AEBS and provide more evidence of the molecular nature of the ChEH. The fact that our single knockdown experiments showed that D8D7I and DHCR7 affect the kinetic parameters of ChEH differently suggests that D8D7I carries the catalytic activity, and that DHCR7 cooperates in the binding of substrates to ChEH (Fig. 5). We find it interesting that three epoxide hydrolases in three unrelated structural classes have such high structural complexity. The leukotriene A₄ hydrolase/aminopeptidase (21) and the soluble epoxide hydrolase/phosphatase (22) are both bifunctional enzymes. Our data suggest even greater complexity with ChEH in being bifunctional and composed of two independent gene products that unite in the microsomes to create a functional protein.

Here we have shown that anticancer drugs of clinical interest are inhibitors of ChEH at pharmacologically and therapeutically active concentrations. In vitro studies on breast cancer cells have previously used 1- to 40- μ M concentrations of selective AEBS ligands, SERMS, or σ -receptor ligands (3, 4, 7) and 10–100 μ M polyunsaturated fatty acids (23). The present study has demonstrated the existence of ChEH activity in MCF-7 cells, and thus ChEH inhibition and CE accumulation are likely to play a role in

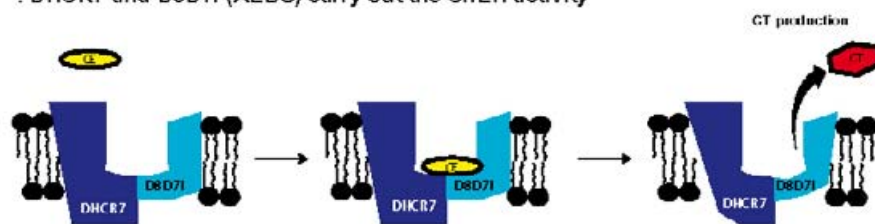
the mechanism of induction of breast cancer cell differentiation and apoptosis by AEBS ligands that require sterol autooxidation products. The therapeutic plasma concentration of Tam is 1–10 μ M (24), and that of toremifene is 5 μ M (25), whereas their respective K_i values for ChEH are 33 nM and 26 nM, indicating total inhibition of ChEH at therapeutic concentrations. The plasma concentration of nonesterified DHA is 2–10 μ M in humans receiving a diet supplemented with 1.5 g DHA/d (26), whereas the DHA K_i value for the AEBS is 12.1 μ M, indicating possible inhibition of ChEH. Thus, the accumulation of CEs is likely to be part of the pharmacologic action of these compounds and might be involved in the anticancer and chemopreventive actions of SERMS and DHA; this merits further investigation.

CEs are autooxidation products of cholesterol, and their production can be blocked by lipophilic antioxidants such as vitamin E (27). We recently established that AEBS ligands induce differentiation and apoptosis in breast cancer cells through a mechanism involving the production of sterol autooxidation products, and that vitamin E inhibits these effects (3, 4, 12). Consistent with these data, previous reports have shown a limited clinical outcome with Tam treatment when cholesterol metabolism enzymes (28) or antioxidant enzymes (29) are overexpressed in breast tumors. These data, along with our present findings, suggest that the modulation of CE metabolism resulting from ChEH inhibition by AEBS ligands might be involved in these effects. Further investigation is warranted. In particular, it will be interesting to study the relationship that may exist between CE metabolism and the sensitivity of and resistance to Tam of breast cancer cell lines and to define how accumulation of CEs or the products of their transformation might be involved in the effects of AEBS ligands.

The physiological function of ChEH has been proposed to be involved in the control of lipid metabolism (16) based on the biological properties of CT, not for detoxification as initially proposed (14). As opposed to toxic aliphatic and aromatic epoxides, which can spontaneously alkylate proteins and nucleic acids in association with their cytotoxicity or carcinogenicity, CEs are stable (30) and are less toxic than CT (13, 31) and nontumorigenic substances (32). CT's greater toxicity and the mutagenic nature of its oxidation products (33, 34) suggest that the inhibition of ChEH and the inhibition of CT production protects cells against cytotoxic insults.

Several other lines of evidence point to the existence of a dynamic metabolism centered on CEs. α -CE is the only epimer of CE found in the adrenal cortex, where it is produced by an as-yet-unidentified cytochrome p450 (35). α -CE can be esterified by Sult2B1b (36) to give a 3 β sulfated product that antagonizes liver X receptor sig-

A : DHCR7 and D8D7I (AEBS) carry out the ChEH activity



B : TAM and AEBS ligands bind to the AEBS and inhibit the ChEH activity

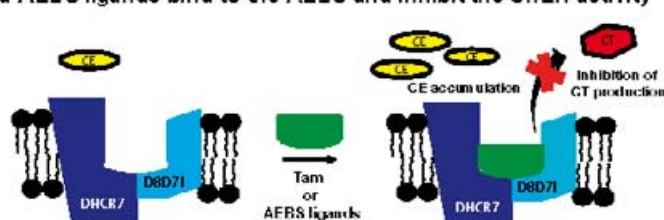


Fig. 5. Functional relationship between the AEBS and ChEH. (A) The subunits of the AEBS that bind Tam (D8D7I and DHCR7) carry out the ChEH activity. (B) Ligands of the AEBS, such as cationic SERMs (Tam and raloxifene), diphenylmethane compounds (toremifene and PPPE), ring B oxysterols (7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol) and polyunsaturated fatty acids (DHA), are inhibitors of ChEH, leading to the blockage of CT production and CE accumulation.

naling (37, 38), or it can be transformed by glutathione transferase into $3\beta,5\alpha$ dihydroxycholestan 6β -yl S glutathione (39, 40). In addition, we have reported that the aminolysis of α -CE by biogenic amines under catalytic conditions is possible and generates powerful cell-differentiating alkylaminoxyesters (30). In contrast, β -CE is nonreactive even under catalytic conditions (30) and has been reported to accumulate in breast fluids (41) and in the plasma of endometrial cancer patients (42). Thus, it would be interesting to study whether β -CE can deregulate CE metabolism at the level of the epoxidation step or of CE metabolism, including ChEH, leading to the appearance of toxic CT.

In conclusion, these data shed light on the molecular nature and potential functions of ChEH and open up the existence of an active metabolic pathway at the level of the CEs.

Materials and Methods

Descriptions of chemical synthesis, AEBs binding, cell culture, and transfections are provided in *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

- Jordan VC (2003) Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2:205–213.
- de Medina P, Favre G, Poirot M (2004) Multiple targeting by the antitumor drug tamoxifen: A structure-activity study. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4:491–508.
- de Medina P, et al. (2009) Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ* 16:1372–1384.
- Payré B, et al. (2008) Microsomal antiestrogen binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol Cancer Ther* 7:3707–3718.
- Kedjour B, et al. (2004) Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 279:34048–34061.
- Poirot M, et al. (2000) Synthesis, binding and structure affinity studies of new ligands for the microsomal anti-estrogen binding site (AEBs). *Bioorg Med Chem* 8:2007–2016.
- Kedjour B, et al. (1999) Structural similarities between cytotoxic antiestrogen-binding site (AEBs) ligands and cytotoxic sigma-receptor ligands: Evidence for a relationship between cytotoxicity and affinity for AEBs or sigma-2 receptor but not for sigma-1 receptor. *Biochem Pharmacol* 58:1927–1939.
- Hwang PL, Matin A (1989) Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites. Structural requirements for high-affinity binding. *J Lipid Res* 30:239–245.
- Hwang PL (1986) Unsaturated fatty acids as endogenous inhibitors of tamoxifen binding to antiestrogen-binding sites. *Biochem J* 237:749–755.
- Mocbis FF, et al. (1998) Pharmacological analysis of sterol delta8 delta7 isomerase proteins with [³H]fenpropil. *Mol Pharmacol* 54:591–598.
- Gray JM, Ziemian L (1992) Antiestrogen binding sites in brain and pituitary of ovariectomized rats. *Brain Res* 578:55–60.
- de Medina P, Silvente-Polrot S, Poirot M (2009) Tamoxifen and AEBs ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 5:1066–1067.
- Schroepfer GJ, Jr. (2000) Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80:361–554.
- Sevanian A, McLeod LL (1986) Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol epoxide hydrolase. *J Biol Chem* 261:54–59.
- Nashed NT, Michaud DP, Levin W, Jerina DM (1985) Properties of liver microsomal cholesterol 5,6-oxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys* 241:149–162.
- Newman JW, Morisseau C, Hammock BD (2005) Epoxide hydrolases: Their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 44:1–51.
- Nashed NT, Michaud DP, Levin W, Jerina DM (1986) 7-Dihydrocholesterol 5,6 beta-oxide as a mechanism-based inhibitor of microsomal cholesterol oxide hydrolase. *J Biol Chem* 261:2510–2513.
- Watts CK, Murphy LC, Sutherland RL (1984) Microsomal binding sites for nonsteroidal anti-estrogens in MCF 7 human mammary carcinoma cells: Demonstration of high affinity and narrow specificity for basic ether derivatives of triphenylethylene. *J Biol Chem* 259:4223–4229.
- Astrom A, et al. (1986) Subcellular and organ distribution of cholesterol epoxide hydrolase in the rat. *Biochim Biophys Acta* 887:359–366.
- Hwang PL (1987) Interaction of unsaturated fatty acids with antiestrogen-binding sites. *Biochem J* 243:359–364.
- Haegström JZ (2004) Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis. *J Biol Chem* 279:50639–50642.
- Newman JW, Morisseau C, Harris TR, Hammock BD (2003) The soluble epoxide hydrolase encoded by EPX2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1558–1563.
- Chamras II, Ardashian A, Heber D, Gaspy JA (2002) Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J Mole Biochem* 13:711–716.
- Trump DL, et al. (1992) High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: Phase I trial in combination with vinblastine. *J Natl Cancer Inst* 84:1811–1816.
- Brandes LJ, Braden SP, Ramsey EW (1995) N,N-diethyl-2-(4-(phenylmethyl)phenoxy) ethanamine in combination with cyclophosphamide: An active, low-toxicity regimen for metastatic hormonally unresponsive prostate cancer. *J Clin Oncol* 13:1398–1403.
- Bougnoux P, Hajjaji N, Maho K, Couet C, Chevalier S (2010) Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 49:76–86.
- Bergstrom S, Samusson B (1961) The autoxidation of cholesterol. *Autoxidation and Antioxidants*, ed Linnberg WO (Interscience, New York), Vol 1, pp 233–248.
- Pitroda SP, Khodarev NN, Beckett MA, Kufe DW, Welchselbaum RR (2009) MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5837–5841.
- Schiff R, et al. (2000) Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *J Natl Cancer Inst* 92:1926–1934.
- de Medina P, Faillasse MR, Payré B, Silvente-Poirot S, Poirot M (2009) Synthesis of new alkylaminoxyesters with potent cell differentiating activities: Identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* 52:7765–7777.
- Smith LL, Johnson BH (1989) Biological activities of oxysterols. *Free Radic Biol Med* 7:285–332.
- e-Rayoumy K, et al. (1996) Lack of tumorigenicity of cholesterol epoxides and estrone-3,4-quinone in the rat mammary gland. *Cancer Res* 56:1970–1973.
- Cheng YW, Kang JJ, Shih YL, Lo YL, Wang CF (2005) Cholesterol 3 beta, 5 alpha, 6 beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food Chem Toxicol* 43:617–622.
- Black HS (1980) Analysis and physiologic significance of cholesterol epoxide in animal tissues. *Lipids* 15:705–709.
- Watabe T, Sawahata T (1979) Biotransformation of cholesterol to cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol via cholesterol alpha-epoxide (3alpha,6alpha-epoxycholestan-3beta-ol) in bovine adrenal cortex. *J Biol Chem* 254:3894–3899.
- Fuda H, Javitt NB, Miltamura K, Ikegawa S, Strott CA (2007) Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *J Lipid Res* 48:1343–1352.
- Song C, Hlipakka RA, Liao S (2001) Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66:473–479.
- Argmann CA, et al. (2005) Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: A role for Krox1 in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 280:22212–22221.
- Meyer DJ, Ketterer B (1982) 5 alpha,6 alpha-epoxy-cholestan-3 beta-ol (cholesterol alpha-oxide): A specific substrate for rat liver glutathione transferase B. *FEBS Lett* 150:499–502.
- Watabe T, Sawahata T, Horie J (1979) Evidence for the formation of a steroid 5-glutathione conjugate from an oxysteroid precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 87:469–475.
- Wrench MR, et al. (1989) Breast fluid cholesterol and cholesterol beta-epoxide concentrations in women with benign breast disease. *Cancer Res* 49:2168–2174.
- Kügük O, et al. (1994) Increased plasma level of cholesterol 5 beta, 6 beta-epoxide in endometrial cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:571–574.
- de Medina P, et al. (2004) Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1165–1173.

Correction

PHARMACOLOGY

Correction for "Identification and pharmacological characterization of cholesterol 5,6 epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands," by Philippe de Medina, Michael R. Paillasse, Gregory Segala, Marc Poirot, and Sandrine Silvente-Poirot, which appeared in issue 30, July 27, 2010, of *Proc Natl*

Acad Sci USA (107:13520–13525; first published July 6, 2010; 10.1073/pnas.1002922107).

The authors note that, due to a printer's error, the online version of Table 1 was formatted incorrectly. The table appears correctly in the print version and is shown below.

Table 1. Inhibition of [³H]Tam binding to the AEBS and catalytic activity of ChEH by drugs

Compound		K _i , AEBS, nM	K _i , ChEH, nM
Selective AEBS ligands			
PBPE	1	9 ± 1	27 ± 6
PCPE	2	10 ± 1	35 ± 8
Tesmilifene	3	56 ± 2	62 ± 3
MBPE	4	18 ± 1	27 ± 6
MCPE	5	48 ± 2	57 ± 8
PCOPE	6	64 ± 4	203 ± 11
MCOPE	7	102 ± 16	241 ± 7
MCOCH2PE	8	850 ± 12	902 ± 13
SERMs			
Tamoxifen	9	2.5 ± 0.2	34 ± 8
4OH-Tamoxifen	10	11 ± 1	145 ± 4
Raloxifene	11	6 ± 1	36 ± 4
Nitromiphen	12	2.4 ± 0.3	18 ± 6
Clomiphene	13	1.5 ± 0.2	9 ± 2
KU 39,411	14	38 ± 1	155 ± 8
σ receptor ligands			
BD-1008	15	83 ± 1	99 ± 9
Haloperidol	16	5,322 ± 9	18,067 ± 14
SR-31747A	17	1.2 ± 0.1	6 ± 2
Ibogaine	18	920 ± 12	2,150 ± 11
AC-915	19	1,120 ± 8	3,527 ± 9
Rimcazole	20	640 ± 5	2,325 ± 8
Amiodarone	21	432 ± 22	733 ± 9
Trifluoperazine	22	14 ± 2	135 ± 7
Cholesterol biosynthesis inhibitors			
Ro 48-8071	23	110 ± 4	89 ± 5
U-18666A	24	84 ± 2	90 ± 5
AY 9944	25	358 ± 12	649 ± 6
Triparanol	26	17 ± 2	39 ± 3
Terbinafine	27	3,720 ± 16	9,105 ± 33
SKF-525A	28	897 ± 10	1,904 ± 11
Ring B oxysterols			
6-Ketocholestanol	29	1,122 ± 30	2,251 ± 21
7-Ketocholestanol	30	580 ± 12	864 ± 22
7-Ketocholesterol	31	1,223 ± 31	4,212 ± 32
7α-Hydroxycholesterol	32	2,252 ± 32	6,151 ± 22
7β-Hydroxycholesterol	33	4,471 ± 22	6,941 ± 21
6-Keto-5α-hydroxycholestanol	34	5,320 ± 22	8,522 ± 12
Cholestane-3β,5α,6β-triol	35	7,131 ± 28	9,744 ± 11
Fatty acids			
Oleic acid	36	48,144 ± 19	54,235 ± 38
α-Linolenic acid	37	38,232 ± 41	36,341 ± 42
ARA	38	26,171 ± 17	24,094 ± 18
DHA	39	18,284 ± 19	12,111 ± 16

Rat liver microsomes were incubated with a single concentration of 2.5 nM [³H]Tam and increasing concentrations of inhibitors ranging from 0.1 nM to 1,000 μM under the conditions described in *SI Appendix, SI Materials and Methods*. IC₅₀ values were determined using the iterative curve-fitting program GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software). For the AEBS, the apparent K_i was expressed as $K_i = [IC_{50}]/(1 + ([^3H]Tam)/K_d)$, using 2.5 nM [³H]Tam and a K_d of 2 nM. The K_i values of drugs for ChEH inhibition were determined using 150 μg of rat liver microsomal protein and 10 and 20 μM of [¹⁴C]α-CE with increasing concentrations of inhibitors ranging from 0.01 to 1000 μM, under the conditions described in *SI Appendix, SI Materials and Methods*. K_i was measured as the projection on the x-axis of the intersection of the lines obtained from 1/V versus [inhibitor] plots for ChEH. Values are the average of three experiments ± SEM, each carried out in duplicate.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010447107

www.pnas.org

PNAS | August 17, 2010 | vol. 107 | no. 33 | 14937

Supporting Information:

Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase: a target for tamoxifen.

Philippe de Medina^{a,d}, Michael R. Paillasse^{a,d}, Gregory Ségala^{a,b,c}, Marc Poirot^{a,b,c,1} and Sandrine Silvente-Poirot^{a,b,c}

^aINSERM, U563, ^bInstitut Claudius Regaud, ^cUniversité Toulouse III Paul Sabatier, ^dAffichem, Toulouse, France.

¹ Corresponding author

Dr. Marc Poirot

INSERM, U-563, Equipe Métabolisme, Oncogenèse et Différenciation Cellulaire, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Institut Claudius Regaud, 20 rue du Pont Saint Pierre, 31052, Toulouse Cedex; France

Tel: +335 61424648; Fax: +335 61424631; E-mail: Marc_Poirot@hotmail.com

SI Material and Methods

Chemicals: [¹⁴C]cholesterol (58 Ci/mol; 1 Ci = 37 GBq) and [³H]Tam (81 Ci/μmol) were purchased from General Electric. Sterols, fatty acids, oxysterols and drugs were from Steraloids or Sigma-Aldrich. Nitromiphen was from Park Davis; raloxifene, RU 39,411 and SR-31747A from Sanofi-Aventis and ICI 182,780 was from Toeris Cookson (UK). BID1008 was a kind gift from Prof. W. Bowen (Brown University, Providence, RI, USA). Other

compounds were synthesized in our laboratory according to published procedures (1, 2). TLC plates (LK-6-DF) were from Whatman. [^{14}C] α - and [^{14}C] β -CE (10 Ci/mol) were synthesized as described (3). The solution was diluted in 10 vol of dichloromethane, and the organic layer washed with 10% aqueous sodium sulfite, 5% aqueous sodium hydrogenocarbonate and then water. The reaction mixture was passed through a Sep-Pack cartridge (Vac C18, 1 cc; Waters) equilibrated with MeOH. CE epimers were then separated isocratically by reversed-phase HPLC (Ultrasep ES 100 RP 18, 6.0 μm ; Bischoff, Leonberg, Germany) with MeOH/ H_2O (95:5) as eluant at a flow rate of 0.7 ml/min. The reaction gave 75% α -CE and 25% β -CE, with a >98% radiochemical purity.

AEBS ligand binding assays. For competition and Scatchard assays, AEBS was labeled as described using rat liver microsomes or COS-7 cell microsomal extracts and [^3H]Tam in the presence of 1 μM 17 β -estradiol to mask residual estrogen receptors (4). 5% dimethylformamide was used to solubilized compounds.

Chemical synthesis of 5,6-epoxy-cholestan-3 β -stearate. Cholesteryl stearate (204 mg; 0.31 mmol; 1 eq) was dissolved in dichloromethane (5 ml). A solution of meta chloro perbenzoate (102 mg; 0.41 mmol; 1.3 eq) dissolved in dichloromethane (2 ml) was added to the solution and stirred at room temperature for 3 hr. The solution was diluted in 10 vol of dichloromethane, and the organic layer washed with 10% aqueous sodium sulfite, 5% aqueous sodium hydrogenocarbonate and then water and subsequently dried under MgSO_4 . The solution was evaporated, and the white solid was dissolved in 500 μl hexane/diethylether (1:3) and then purified on a silica column. The column was washed with hexane and the synthesis products were eluted with hexane/ethylacetate (8:2) to give a mixture of 5,6 α -

epoxy-cholestan-3 β -stearate (70%) and 5,6 β -epoxy-cholestan-3 β -stearate (30%). Yield: 65%; R_f (hexane 8/EtOAc 2): 0.56 (α isomer), 0.58 (β isomer); mass spectroscopy (m/z , DCl/NH₃): 669 (MH⁺); 686 (M-NH₄⁺); 651 (MH⁺-H₂O).

ChEH activity assays.

An initial kinetic analysis was carried out to determine the optimum incubation time for the subsequent inhibition experiments. The final assay volume was 150 μ l with 130 μ l buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM KCl), 10 μ l microsomal proteins (15 mg/ml) and 10 μ l acetonitrile (6.7%) containing the test compound/drug and the labeled α -CE. Tubes were incubated at 37°C for increasing periods of time, from 0 to 30 min. The reaction was stopped by immersing the sample in ice-water and adding 1.5 ml chloroform/methanol (2:1) and 500 μ l reaction buffer. After shaking, the lower phase was removed and saved, and the aqueous phase was extracted with 1.5 ml chloroform. The two organic layers were mixed, reduced to dryness under a flux of nitrogen and the residue resuspended in 60 μ l ethanol. More than 95% of radioactivity was recovered in the organic layers. Samples were applied to silica gel 60, 20 \times 20 plates (Fluka, Germany) that had previously been heated for 1 hr at 100°C and were developed using ethylacetate. The regions corresponding to authentic CE and CT standards were visualized by iodine vapor. Radioactive metabolites were visualized using a Storm apparatus (Molecular Dynamics) and quantified by densitometry with the software Imagequant (Molecular Dynamics). Retention factors (R_f) were determined for each spot on the TLC plates as the ratio of the distance of migration of the eluate from the origin and the distance of the solvent from the origin. α -CE had a R_f = 0.67 (top of the TLC, Fig 1), and CT had a R_f = 0.25. As a result of the initial kinetics, a 9-min incubation and 20 μ M [¹⁴C] α -CE was chosen for subsequent ChEH inhibition experiments.

Expression of D8D7I and DHCR7 in COS-7 cells. Plasmid constructs, COS-7 cell transfection and the measurement of AFBS binding were done as described in (4). For ChEH activity, microsomes were incubated with 20 μM [^{14}C] α -CE for 9 min and were then treated as described in the above paragraph.

Knockdown of D8D7I and DHCR7 expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells were plated in 10 cm dishes at 5×10^5 cells in RPMI medium containing 5% FBS. 24 hours after seeding, the cells were transfected in Opti-MEM with 100 nM Control siRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology), 100 nM D8D7I (EBP) siRNA (sc-77218, Santa Cruz Biotechnology) or 50 nM DHCR7 siRNA (sc-60533, Santa Cruz Biotechnology) for 4 h using Oligofectamine (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Cells were harvested at 3 days for enzymatic analyses. To validate the knock-down efficacy, protein levels were analysed on samples under the same conditions. 72 hours after transfection with siRNAs, MCF-7 cells were harvested in RIPA lysis buffer supplemented with protease inhibitors (Roche). Immunoblotting was carried out as described earlier (4). Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gels, electro-transferred onto PVDF membranes and incubated overnight at 4°C with antibodies against human D8D7I (ARP46742, Aviva Systems Biology), human DHCR7 (Ab67664, Abcam) or Actin (C4 Clone, MAB1501, Millipore). Bands were visualized using an ECL plus kit (Amersham Biosciences).

1. Song C, Hiiipakka RA, & Liao S (2001) Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66(6):473-479.

2. Poirot M, *et al.* (2000) Synthesis, binding and structure-affinity studies of new ligands for the microsomal anti-estrogen binding site (AEBS). *Bioorg Med Chem* 8(8):2007-2016.
3. Sevanian A & McLeod LL (1986) Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J Biol Chem* 261(1):54-59.
4. Kedjouar B, *et al.* (2004) Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 279(32):34048-34061.

SI figure legend

Fig.S1. Scheme describing the reaction of hydration of cholesterol epoxides catalyzed by the Cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH).

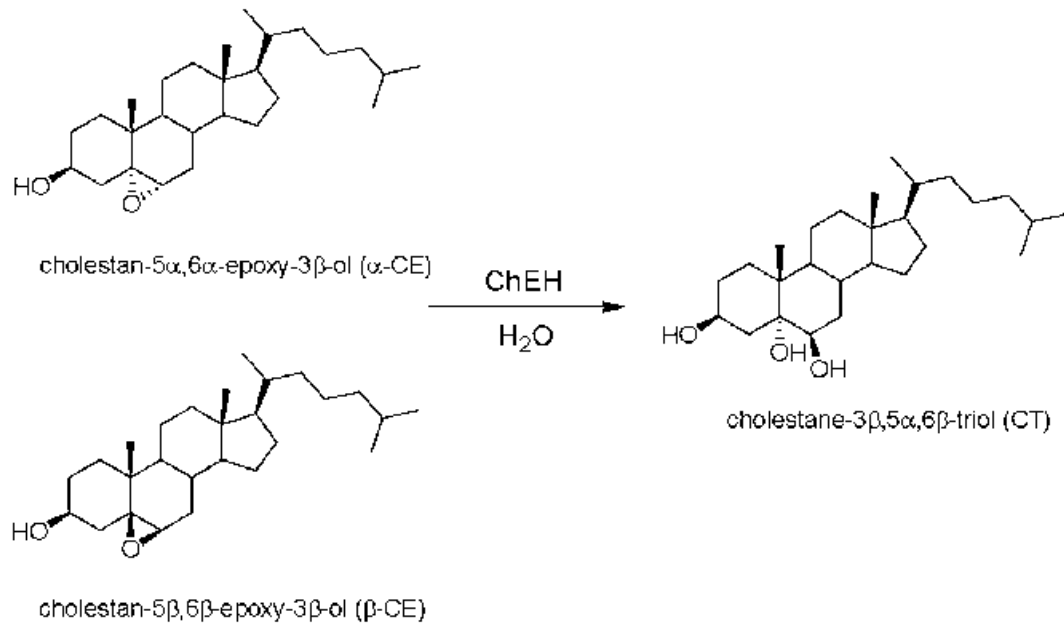


Fig.S2. Effect of the prototypical AEBS ligands Tam and PBPE on ChEH activity. A) A time course of ChEH activity. Rat liver microsomes were incubated with 20 μM [^{14}C] α -CE for the indicated time. ChEH activity was assayed by measuring the conversion of α -CE to CT by TLC. A representative autoradiogram of a TLC from two independent experiments is shown with a plot showing the time course of CT formation by α -CE hydration. The least-squares regression line was computed over the first 10 min. B) Michaelis-Menten plot of ChEH activity. C) Measurement of ChEH activity in rat liver microsomes using 20 μM [^{14}C] α -CE, solvent vehicle (control), 10 μM 6-ketocholestanol (6-KC), 10 μM 7-ketocholestanol (7-KC), 1 μM Tam or 1 μM PBPE. A representative autoradiogram of a TLC from three independent experiments is shown. A plot showing the inhibition of ChEH activity on the hydration of α -CE and β -CE by the test compounds is indicated. The hydration of 20 μM [^{14}C] α -CE or [^{14}C] β -CE into CT was inhibited by 10 μM 6-ketocholestanol, 10 μM 7-ketocholestanol, 1 μM Tam or 1 μM PBPE.

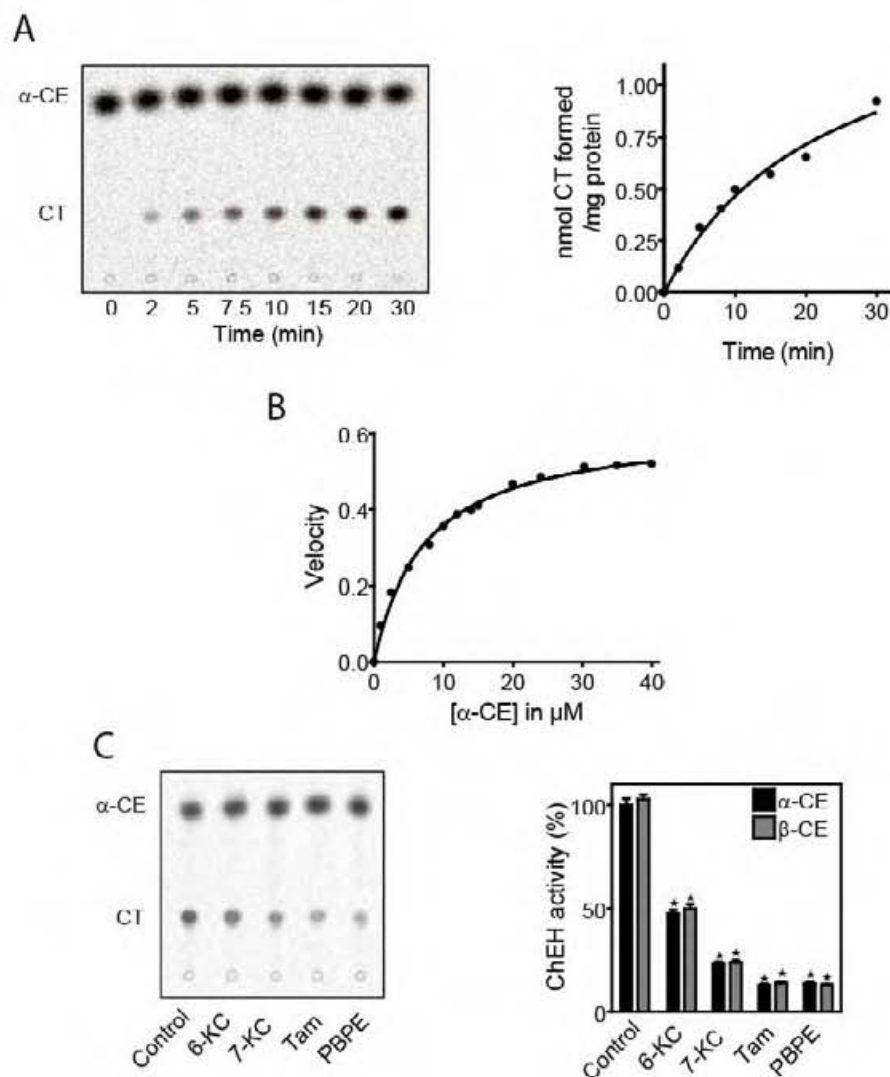


Fig.S3. Dixon Plot of ChEH inhibition by Tam, PBPE and oleic acid. The potency of Tam, PBPE and oleic acid to inhibit the ChEH activity was assayed as described in the legend of Fig.2. Dixon plots of [14 C] α -CE versus Tam (A), PBPE (B) or oleic acid (C) with rat liver microsome ChEH. Concentrations in Tam or PBPE used in the assay were: 0, 100, 250, 300, 400, 500, 750 and 1000 nM. Concentrations of oleic acid were: 0, 50, 100, 150, 200 and 250 μ M.

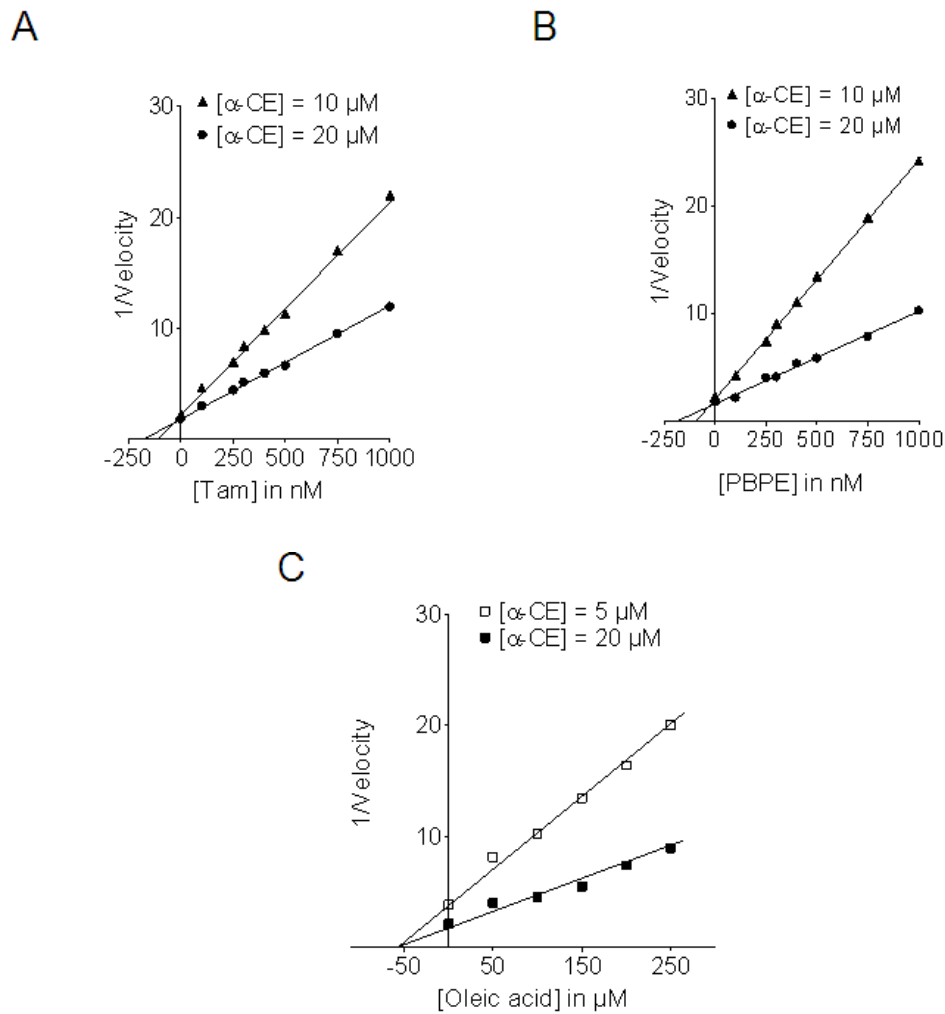


Table S1. Measurement of the inhibition of [³H]Tam binding to the AEBS and catalytic activity of ChEH by drugs. Rat liver microsomes were incubated with a single concentration of 2.5 nM [³H]Tam and increasing concentrations of test compounds ranging from 0.01 to 1000 μM under the condition described in the “Materials and Methods” section. For the ChEH inhibition tests 150 μg of rat liver microsomal proteins and 10 and 20 μM of [¹⁴C]α-CE with increasing concentrations of compounds ranging from 0.01 to 1000 μM were used under the conditions described in the “Material and Methods” section. N.M.: no measurable inhibition up to the maximal concentration of inhibitor used.

	Compound		K_i AEBS	K_i ChEH
Estrogen receptor ligands	17β-estradiol	S1	N.M.	N.M.
	DES	S2	N.M.	N.M.
	ICI 164,384	S3	N.M.	N.M.
	ICI 182,780	S4	N.M.	N.M.
	RU 58,668	S5	N.M.	N.M.
Sigma receptor ligands	(+)-pentazocine	S6	N.M.	N.M.
	(+)-3PPP	S7	N.M.	N.M.
	PRE-084	S8	N.M.	N.M.
	DTG	S9	N.M.	N.M.
	progesterone	S10	N.M.	N.M.
Miscellaneous	ketoconazole	S11	N.M.	N.M.
	MCH ₃ PE	S12	N.M.	N.M.
Side chain oxysterols	22(R)-hydroxycholesterol	S13	N.M.	N.M.
	24(S)-hydroxycholesterol	S14	N.M.	N.M.
	25-hydroxycholesterol	S15	N.M.	N.M.
	26-hydroxycholesterol	S16	N.M.	N.M.
Epoxysterol-esters	α-CE-sulfate	S17	N.M.	N.M.
	CE-stearate	S18	N.M.	N.M.
Fatty acids and ester	palmitic acid	S19	N.M.	N.M.
	stearic acid	S20	N.M.	N.M.
	oleic acid methyl ester	S21	N.M.	N.M.

Fig.S4. trivial names, IUPAC names and chemical structure of selective AEBS ligands (A) and estrogen receptor modulators (B) that bind to the AEBS and inhibit ChEH.
 PBPE: 1-(2-(4-benzylphenoxy)ethyl)pyrrolidin; PCPE: 1-(2-(4-(2-phenylpropan-2-yl)phenoxy)ethyl)pyrrolidine; tesmilifene: 2-(4-benzylphenoxy)-N,N-diethylethanamine, MBPE: 4-(2-(4-benzylphenoxy)ethyl)morpholine; MCPE: 4-(2-(4-(2-phenylpropan-2-yl)phenoxy)ethyl)morpholine; PCOPE: phenyl(4-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)methanone; MCOPE: (4-(2-morpholinoethoxy)phenyl)(phenyl)methanone; MCOCH2PE: 1-(4-(2-morpholinoethoxy)phenyl)-2-phenylethanone; tamoxifen: 2-[4-[(Z)-1,2-di(phenyl)but-1-enyl]phenoxy]-N,N-dimethylethanamine; 4OH-tam: 4-[(Z)-1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbut-1-enyl]phenol; raloxifene: [6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-1-benzothiophen-3-yl]-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)phenyl]methanone; nitromiphene: 1-[2-[4-[(Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-nitro-2-phenylethenyl]phenoxy]ethyl]pyrrolidine; clomiphene: 2-[4-[(Z)-2-chloro-1,2-di(phenyl)ethenyl]phenoxy]-N,N-diethylethanamine; RU 39,411: 11-[4-*N,N*-[diethylaminoethoxy]phenyl]-estra-1,3,5(10)triene-3,17-diol.

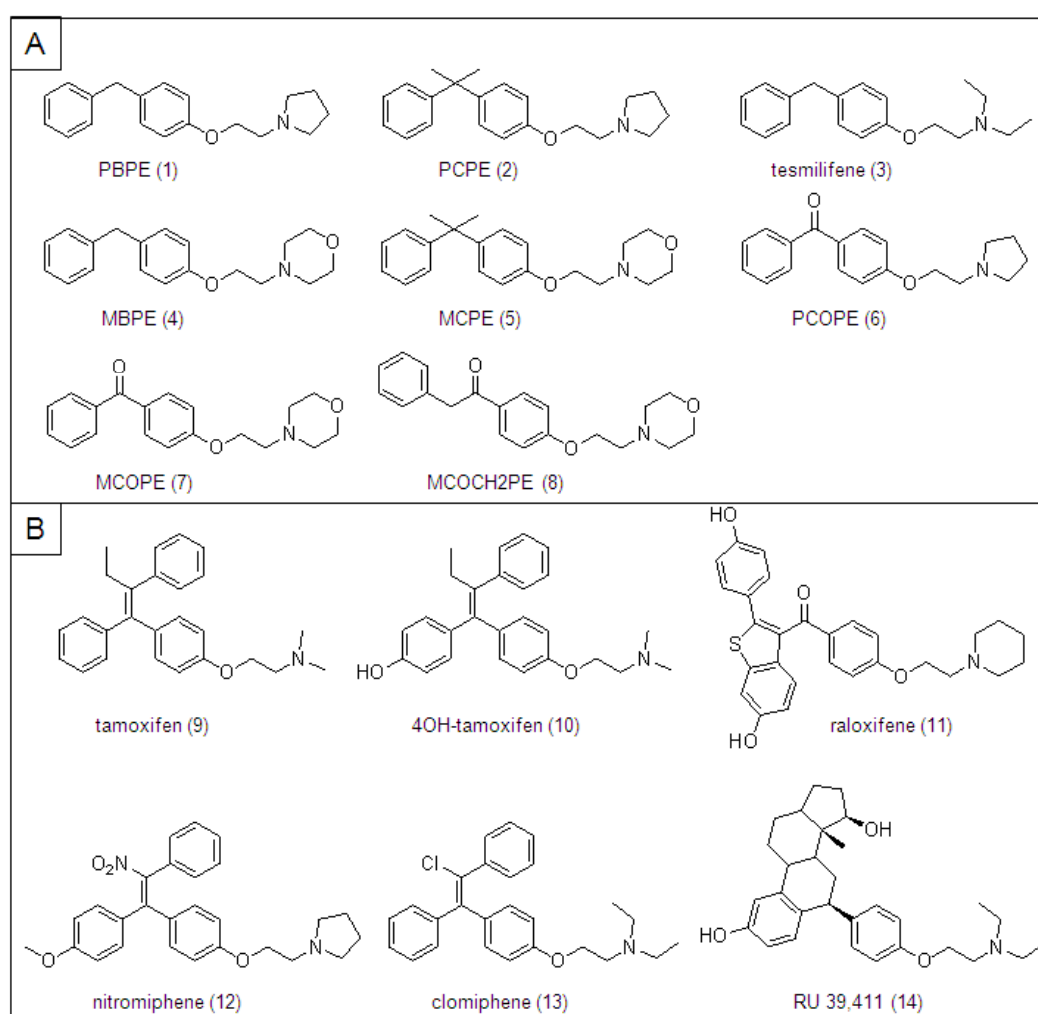


Fig.S5. name and chemical structure of Sigma-receptor ligands (A) and cholesterol biosynthesis inhibitors (B) that bind to the AEBS and inhibit ChEH. BD-1008: N-(3,4-dichlorophenethyl)-N-methyl-2-(pyrrolidin-1-yl)ethanamine; Haloperidol: 4-(4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)-1-(4-fluorophenyl)butan-1-one; SR-31747A: (E)-N-(4-(3-chloro-4-cyclohexylphenyl)but-3-enyl)-N-ethylcyclohexanamine; RO 48-8071: (4-(6-(allyl(methyl)amino)hexyloxy)phenyl)(4-bromophenyl)methanone; U-18666A: 3-beta-(2-(diethylamino)ethoxy)androst-5-en-17-one; AY-9944: trans-1,4-Bis(2-chlorobenzaminomethyl)cyclohexane; Triparanol: 2-(4-chlorophenyl)-1-(4-(2-(diethylamino)ethoxy)phenyl)-1-p-tolylethanol; terbinafine: (E)-N,3,6,6-tetra methyl-N-(naphthalene-1-ylmethyl)hept-2-en-4-yn-1-amine; SKF-525A: 2-diethylaminoethyl 2,2-diphenylpentanoate.

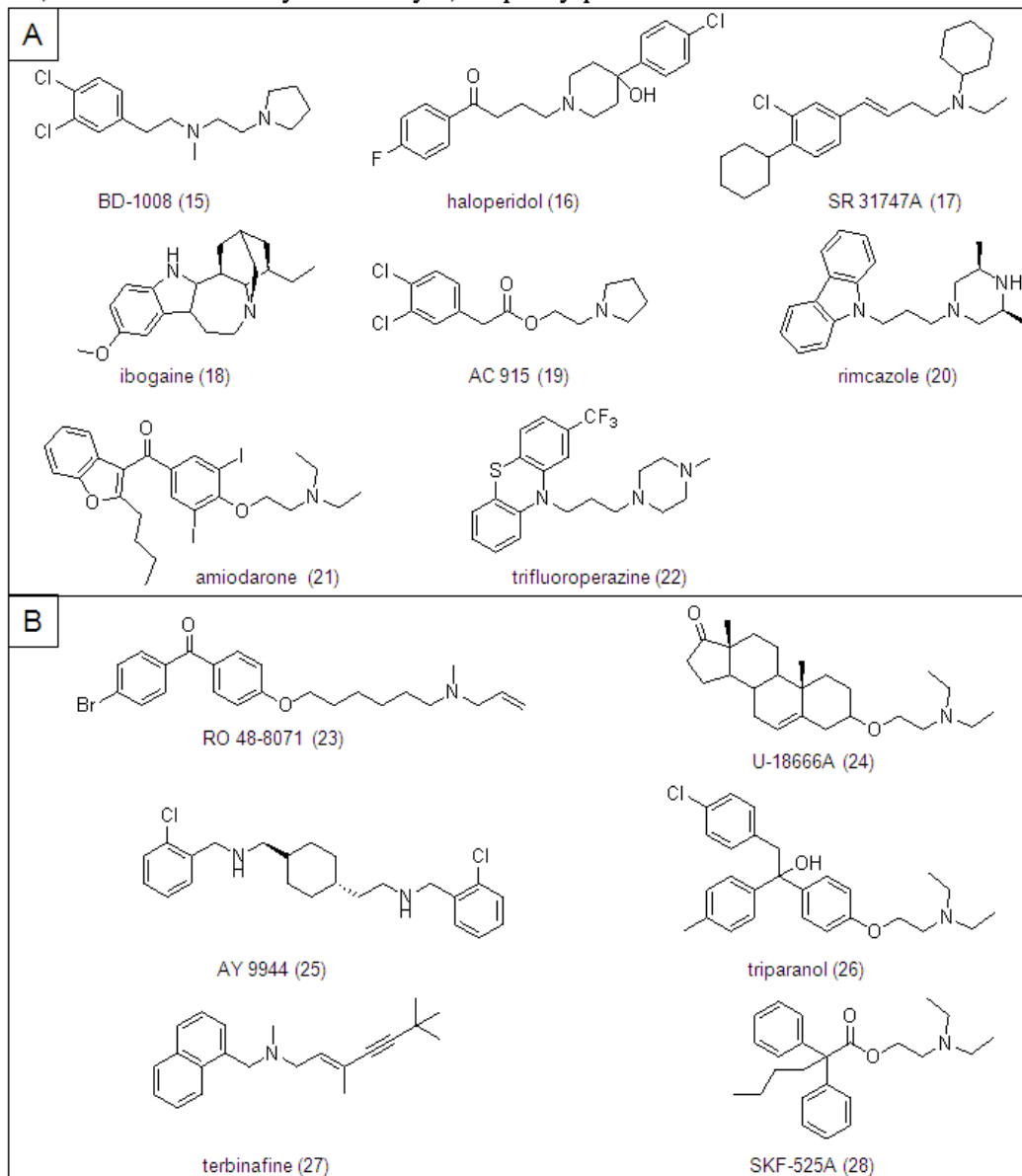


Fig.S6. Trivial name, chemical name and chemical structure of ring B oxysterols and fatty acids that bind to the AEBS and that inhibit ChEH.

6-ketocholestanol: 5 α -cholestan-3 β -ol-6-one; 7-ketocholestanol: 5 α -cholestan-3 β -ol-7-one; 7-ketocholesterol: 5-cholesten-3 β -ol-7-one; 7 α -hydroxycholesterol: 5-cholesten-3 β ,7 α -diol; 7 β -hydroxycholesterol: 5-cholesten-3 β ,7 β -diol; 6-keto-5 α -hydroxycholestanol: cholestane-3 β ,5 α -diol-6-one; oleic acid: (Z)-octadec-9-enoic acid; α -linolenic acid: (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoic acid; arachidonic acid: (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid; docosahexaenoic acid: (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid.

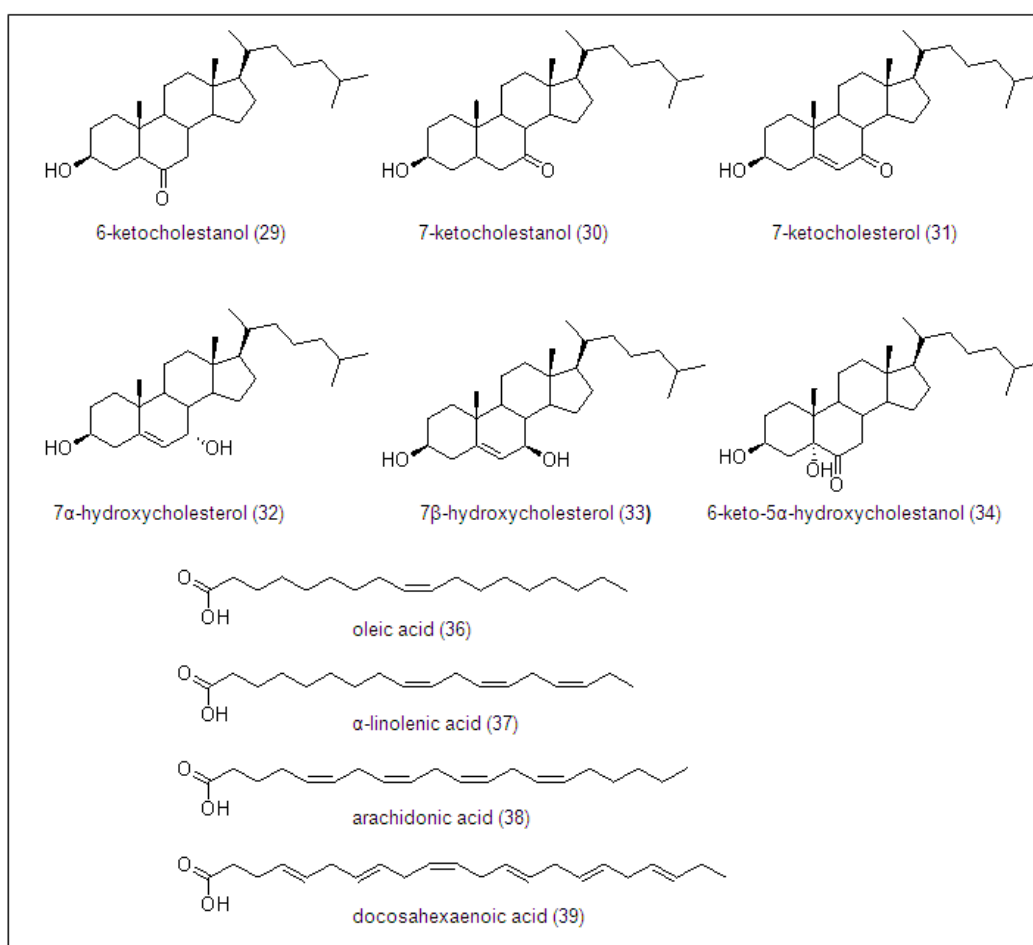


Fig.S7.Trivial name, chemical name and chemical structure of compounds that do not bind to the AEBS and do not inhibit ChEH up to 10 μ M (compounds S2-S5) or 1000 μ M (S6-S12). ICI 164,384: [(*N-n*-butyl-*N*-methyl-11-[3,17-di-hydroxyestra-1,3,5(10)-triene-7-yl]-undecanamide]; ICI 182,780: Faslodex, fulvestrant, 7- α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17- β -diol; RU 58668: 11-[[[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulfonyl]pentoxy]phenyl]-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol; (+)-3PPP: (R)-3-(1-propylpiperidin-3-yl)phenol; PRE-084: 2-morpholinoethyl-1-phenyl cyclohexanecarboxy late; DTG: 1,3-dio-tolylguanidine; progesterone; ketoconazole: 1-(4-(4-(((2R,4S)-2-((1H-imidazol-1-yl)methyl)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy) phenyl)piperazin-1-yl) ethanone; MCH3PE: 4-(2-(*p*-tolylloxy)ethyl)morpholine.

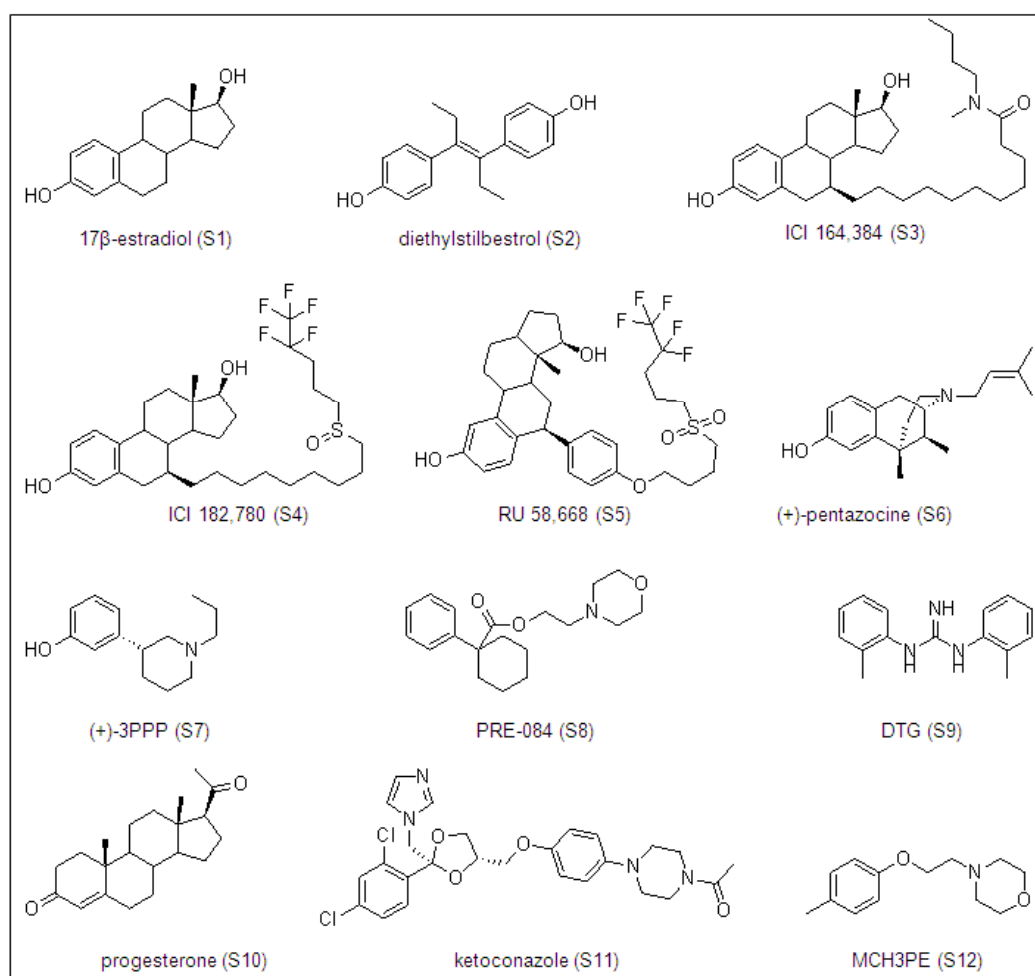
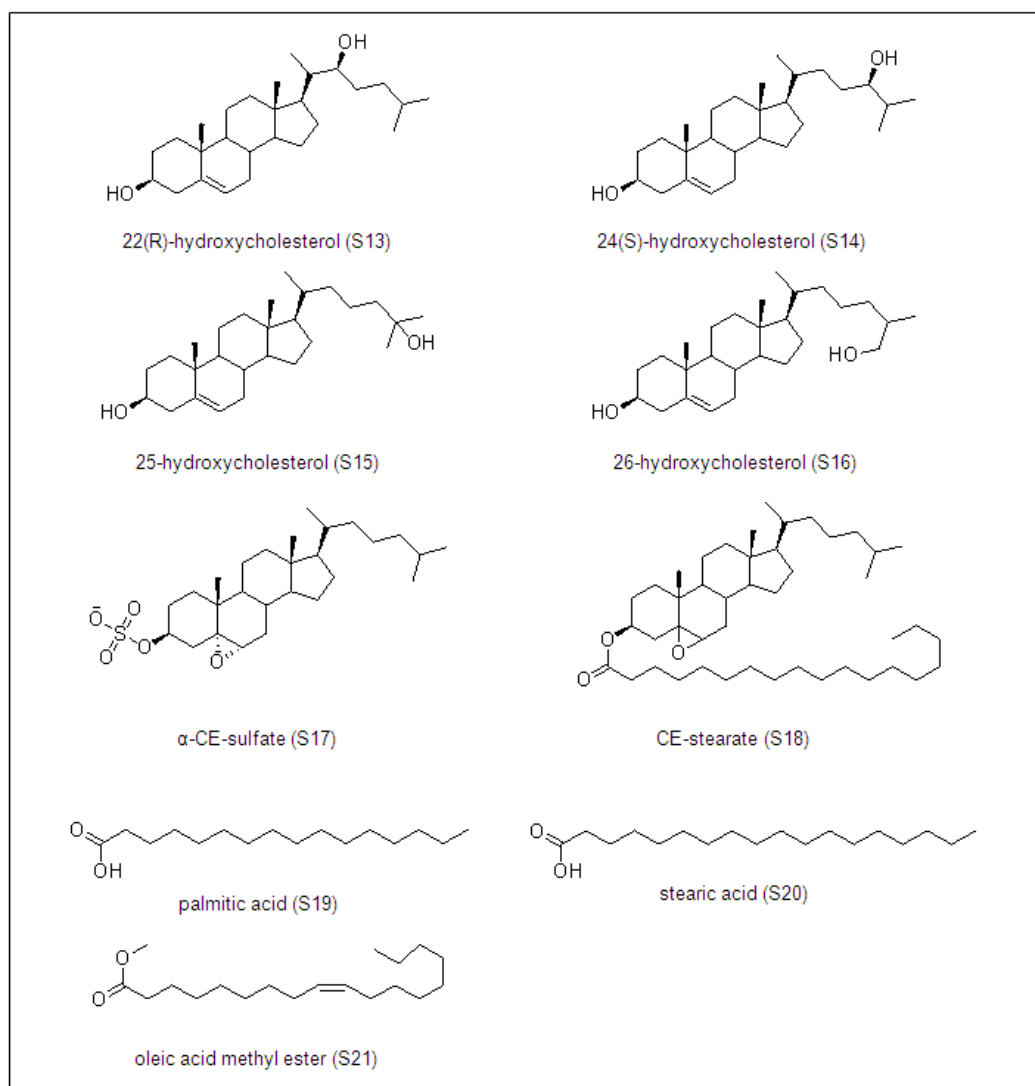


Fig.S8. Trivial name, chemical name and chemical structure of side chain oxysterols and fatty acids that do not bind to the AEBS and do not inhibit ChEH up to 50 μ M.

22(R)-hydroxycholesterol: 5-cholestene-3 β ,22R-diol; 24(S)-hydroxycholesterol: 5-cholestene-3 β ,24(S)-diol; 25-hydroxycholesterol: 5-cholestene-3 β ,25-diol; 26-hydroxycholesterol: 5-cholestene-3 β ,26-diol; α -CE-sulfate: cholestan-5 α ,6 α -epoxy-ol-3 β -sulfate; CE-stearate: cholestan-5,6-epoxy-3 β -ol-stearate; palmitic acid: hexadecanoic acid; stearic acid: octadecanoic acid;



DISCUSSION

Nous avons montré dans cette étude que le complexe AEBS porte l'activité enzymatique ChEH. Les ligands d'AEBS inhibent l'activité ChEH ce qui provoque une accumulation de CEs. Une droite de corrélation a été établie entre la constante de liaison des ligands d'AEBS sur AEBS et la constante d'inhibition de la ChEH qui montre qu'AEBS et la ChEH sont la même entité pharmacologique. L'équipe avait montré en 2004 que la réexpression combinée de DHCR7 et D8D7I permettait de reconstituer AEBS⁹³. Nous avons effectué la même expérience mais en évaluant l'activité ChEH dans des cellules COS-7 qui ne possèdent pas d'activité ChEH, ni d'expression de DHCR7 et D8D7I. Seule la réexpression combinée de DHCR7 et D8D7I permet d'observer une activité ChEH dans les cellules COS-7. Pour démontrer l'importance de ces deux enzymes dans l'activité ChEH, nous avons effectué une extinction de DHCR7 et D8D7I avec des siRNAs dans des cellules MCF-7 qui possèdent une activité ChEH. L'extinction combinée de DHCR7 et D8D7I diminue de 92% l'activité ChEH. Cela montre que l'association de DHCR7 et D8D7I porte l'activité ChEH dans des cellules qui possèdent cette activité. Les résultats d'extinction par siRNAs suggèrent que DHCR7 est impliquée dans la liaison du substrat de la ChEH, c'est-à-dire les CEs, puisque l'extinction de DHCR7 augmente le K_M de la ChEH alors que l'extinction de D8D7I ne l'affecte pas. D8D7I pourrait porter l'activité enzymatique puisque son extinction diminue la V_m de la ChEH alors que l'extinction de DHCR7 n'a pas d'effet sur la V_m . La ChEH n'est donc pas portée par une enzyme spécifique de cette activité mais par un complexe oligo-hétérodimérique des deux enzymes DHCR7 et D8D7I qui possèdent chacune sa propre activité enzymatique dans la cholestérogénèse.

L'identification de la ChEH met en évidence une nouvelle voie métabolique dans le métabolisme des stérols centrée sur les CEs. Son ciblage par le tamoxifène montre que la ChEH doit être prise en compte dans la pharmacologie du tamoxifène. L'inhibition de l'activité ChEH par les ligands d'AEBS peut être impliquée dans leurs effets différenciants et cytotoxiques dépendants de l'accumulation d'oxystérols. Les perspectives qui se dégagent de cette découverte sont principalement de connaître l'importance de la ChEH dans les effets anti-cancéreux des ligands d'AEBS et plus particulièrement du tamoxifène pour lesquels des phénomènes de résistance thérapeutiques existent en clinique⁴⁷⁷. Il serait intéressant de doser l'activité ChEH dans des lignées cellulaires cancéreuses et dans des tumeurs de patientes résistantes au tamoxifène afin de voir si les résistances impliquent une altération de la ChEH. En parallèle, la mesure de l'expression de DHCR7 et D8D7I dans des modèles de résistance

au tamoxifène pourrait permettre de connaître la représentativité d'AEBS et de la ChEH dans ces cancers. Ces études permettraient de savoir si DHCR7, D8D7I et l'activité ChEH pourraient être des marqueurs prédictifs et/ou pronostiques de la réponse thérapeutique au tamoxifène. Parmi les perspectives envisagées, l'une d'entre elles a fait l'objet de l'étude présentée par l'Article 2 de ma thèse qui traite la caractérisation du mécanisme d'action de métabolites du CEs dans les effets lipogéniques et cytotoxiques des ligands d'AEBS.

Article 4 (revue)

**Importance du métabolisme du cholestérol et des oxystérols dans
les effets du tamoxifène et des ligands d'AEBS**

(Accepté)



Review

Importance of cholesterol and oxysterols metabolism in the pharmacology of tamoxifen and other AEBS ligands

Philippe de Medina^{a,c}, Michael R. Paillasse^{a,c}, Gregory Ségala^{a,b}, Farid Khallouki^{a,b},
Severine Brillouet^{a,b}, Florence Dalenc^{a,b}, Frederic Courbon^{a,b}, Michel Record^{a,b},
Marc Poirot^{a,b,*}, Sandrine Silvente-Poirot^{a,b,*}

^a Cancer Research Center of Toulouse, UMR 1037 Inserm-University of Toulouse III, Toulouse, France

^b Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

^c Affichem, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 27 May 2011

Keywords:

Breast cancer
Antiestrogen
Diphenylmethane
Cholesterol
Zymosterol
Ring B oxysterols
Cholesteryl ester

ABSTRACT

Tamoxifen is one of the major drugs used for the hormonotherapy of estrogen receptor positive breast cancers. However, its therapeutic efficacy can be limited by acquired resistance and tumor recurrence can occur after several years of treatment. Tamoxifen is known as the prototypical modulator of estrogen receptors, but other targets have been identified that could account for its pharmacology. In particular, tamoxifen binds with high affinity to the microsomal antiestrogen binding site (AEBS) and inhibits cholesterol esterification at therapeutic doses. We have recently shown that the AEBS was a hetero-oligomeric complex composed of 3 β -hydroxysterol- Δ (8)- Δ (7)-isomerase and 3 β -hydroxysterol- Δ (7)-reductase, that binds different structural classes of ligands, including selective estrogen receptor modulators, several sigma receptor ligands, poly-unsaturated fatty acids and ring B oxysterols. We established a link between the modulation of cholesterol metabolism by tamoxifen and other AEBS ligands and their capacity to induce breast cancer cell differentiation, apoptosis and autophagy. Moreover, we showed that the AEBS carries out cholesterol 5,6 epoxide hydrolase activity and established that cholesterol 5,6 epoxide hydrolase is a new target for tamoxifen and other AEBS ligands. Finally in this review, we report on recent data from the literature showing how the modulation of cholesterol and oxysterol metabolism can be linked to the antitumor and chemopreventive properties of tamoxifen, and give new perspectives to improve the clinical outcome of the hormonotherapy of breast cancers.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	411
2. Tamoxifen inhibits cholesterol esterification	433
3. Tamoxifen produces an accumulation of precursors of cholesterol in breast cancer cells	411
4. Tamoxifen blocks the ChEH activity	434
5. Conclusions and perspectives	436
Acknowledgements	437
References	417

Abbreviations: AEBS, microsomal antiestrogen binding site; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; SERM, selective estrogen receptor modulator; Tam, tamoxifen; ACAT, Acyl-coA:Cholesterol Acyl-Transferase; SOAT, sterol O-acyltransferase; D8D7I, 3 β -hydroxysterol- Δ ⁸- Δ ⁷-isomerase; DHCR7, 3 β -hydroxysterol- Δ ⁷-reductase; DHCR24, 3 β -hydroxysterol- Δ ²⁴-reductase; ChEH, cholesterol-5,6-epoxide hydrolase; CYP2D6, cytochrome p450 2D6; PBPE, N-pyrrolidino-(phenylmethylphenoxy)-ethanamine.HCl; CE, cholesterol-5,6-epoxide; α CE, cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol; β CE, cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol; CT, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; AOX, alkylaminooxysterol.

* Corresponding authors at: Cancer Research Center of Toulouse, UMR 1037 Inserm-University Toulouse III, Team "Sterol Metabolism and Therapeutic Innovation in Oncology", Institut Claudius Regaud, 20 rue du Pont Saint Pierre, 31052 Toulouse Cedex, France. Tel.: +33 5 61424648; fax: +33 5 61424631.

E-mail addresses: marc.poirot@inserm.fr (M. Poirot), poirot.sandrine@claudiusregaud.fr (S. Silvente-Poirot).

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common female cancer. It affects more than 1 million women worldwide and about 400,000 patients die due to this disease every year (Jemal et al., 2009). Tamoxifen (Tam) is one of the major drugs used throughout the world for the management of breast cancers. Tam is a cytostatic drug initially conceived to block the mitogenic properties of 17β -estradiol by competition on the alpha isoform of the ER in breast tumors. Tam is used as an adjuvant treatment to prevent breast cancer recurrence and as a therapy to extend the lives of patients with metastatic disease (Jordan, 2007). In clinical practice, the levels of the estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) protein expression are the only markers used to predict the response to Tam. However, 25% of ER+/PR+ tumors, 66% of ER+/PR- tumors, and 55% of ER-/PR+ tumors fail Tam treatment (Ma et al., 2004). Today, the identification of new host and tumor characteristics that enable the optimal therapy to be selected for individual patients in the clinic is a challenge. Although genotypic studies of the expression of enzymes involved in Tam metabolism such as CYP2D6 were initially thought to be a marker of clinical outcome, results from epidemiological studies have been inconclusive (Higgins and Stearns, 2011; Lash et al., 2009). The mechanisms responsible for these treatment failures and the recurrence risks remain unclear, indicating that other targets have to be identified that may help to improve the efficacy of current treatments and to develop new anticancer compounds.

Tam displays a complex pharmacology and several additional targets and other mechanisms were identified that could account for its anticancer activity and may ultimately be involved in treatment failure and resistance (de Medina et al., 2004a). In particular, recent data from the literature have established that cholesterol metabolism is involved in the anticancer pharmacology of Tam. We identified the Acyl-coA:Cholesterol Acyl-Transferase (ACAT) as a target for Tam (de Medina et al., 2004b) and confirmed the molecular identification of the microsomal antiestrogen binding site (AEBS), showing that it is a hetero-oligomeric binding site made up of two cholesterologenic enzymes (Kedjouar et al., 2004) that are responsible for the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase activity (ChEH) (de Medina et al., 2010).

The impact of Tam on cholesterol metabolism and the relationship between the antitumor activity of Tam and cholesterol metabolism are the scope of this review.

2. Tamoxifen inhibits cholesterol esterification

ACAT (or SOAT) are intracellular membrane-bound enzymes that catalyze the formation of cholesteryl esters by using both cholesterol and long-chain fatty acyl-coenzyme A as substrates (Chang et al., 2009). ACATs were initially described as a putative target for the treatment of atherosclerosis, but more recently the involvement of cholesterol esterification in cancer cell growth has been described, suggesting that ACATs could be involved in cancer pathogenesis (Tosi and Tugnoli, 2005). Indeed, the increased production of cholesteryl esters, and ACAT expression and activation have been observed in different human tumors compared with normal tissue. In addition, a greater capacity to esterify and accumulate cholesterol in tumor cells has been associated with a higher growth rate, suggesting a link between cholesteryl ester production and cell proliferation (Tosi and Tugnoli, 2005). Moreover, ACAT inhibitors such as Sah 58-035 and avasimibe inhibit cancer cell growth (Bemli et al., 2010; Paillasse et al., 2009) whereas we established that one common cholesteryl ester (cholesteryl oleate) stimulates the proliferation and the invasiveness of cancer cells (Paillasse et al., 2009) showing that cholesteryl esters, in addition to being a storage form of cholesterol, can act as tumor promoters

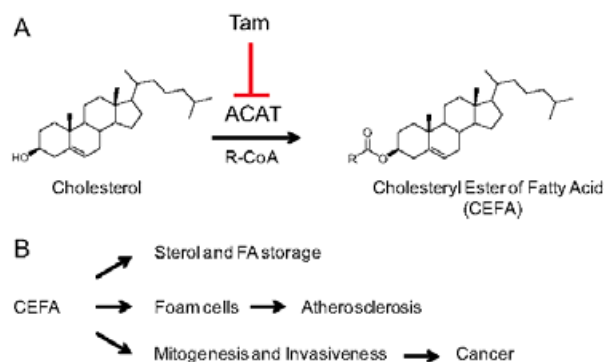


Fig. 1. (A) Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification at therapeutic concentrations. Cholesterol esterification is catalyzed by the Acyl-coA:Cholesterol Acyl Transferases (ACAT) using cholesterol and fatty acyl-co enzyme A esters (R-CoA) as substrates to produce cholesteryl esters of fatty acids (CEFA). (B) Cholesteryl esters of fatty acids (CEFA) are involved in the storage of sterols and fatty acids (FA) in normal tissues. CEFA is the major lipid found in foam cells and in the atheromatous plaques. CEFA has recently been implicated in cancer because it has been shown to stimulate cell proliferation and invasiveness.

(Fig. 1). On the basis of three dimensional structural homologies between antiestrogen and the ACAT inhibitor Sah 58-035, we have hypothesized that Tam and pure ER antagonists (Faslodex and ICI 164,384) could inhibit ACAT and we demonstrated this with rat liver microsomes (de Medina et al., 2004b). Next, we showed that Tam, but not pure ER antagonists, inhibits cholesterol esterification on intact cells including macrophage and breast cancer cell lines at therapeutic concentrations (de Medina et al., 2004b, 2006; Payre et al., 2008). These data strongly suggested that the inhibition of cholesterol esterification could contribute to the antitumor activity of Tam. Interestingly, ACAT activities are increased in a more aggressive ER negative breast cancer (MDA-MB-231) compared with ER positive breast cancer cells (Antalis et al., 2010). Moreover, the level of mRNA encoding ACAT proteins has been shown to be overexpressed in patients with ER positive breast cancers treated with Tam for which a significantly higher risk of death and recurrence have been established (Pitroda et al., 2009).

Consequently, the relationship between the inhibition of cholesterol esterification induced by Tam and the antitumor efficacy of this drug deserves further investigations.

3. Tamoxifen produces an accumulation of precursors of cholesterol in breast cancer cells

More than 30 years ago, Sutherland et al. (1980) discovered that Tam bound to a high affinity binding site that was different from the estrogen receptor. This binding site was named the microsomal antiestrogen binding site (AEBS). It binds principally synthetic drugs such as aryl aminoethoxy antiestrogens (tamoxifen, raloxifene), diphenylmethane derivatives of Tam (tesmilifene, PBPE) (Fig. 2A), and natural compounds such as ring B-oxysterols (7-ketocholestanol, 7-ketocholesterol, 5,6-epoxy-cholestanol), and unsaturated fatty acids (docosaheaxaenoic acid, arachidonic acid) (Fig. 2B). The AEBS has no affinity for estrogens or non-cationic steroidal antiestrogens such as Faslodex (de Medina et al., 2004a). The AEBS is thus a ring B-oxysterol binding protein (de Medina et al., 2010; Hwang and Matin, 1989; Schroepfer, 2000). Twenty five years after the first description of the AEBS (Sutherland and Foo, 1979), we established that the AEBS was a hetero-oligomeric complex including two post-lanosterol cholesterologenic enzymes: the 3β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase (D8D7I, EBP) and the 3β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase (DHCR7) (Kedjouar et al., 2004) (Fig. 3A). Binding of ligands such as Tam and the selec-

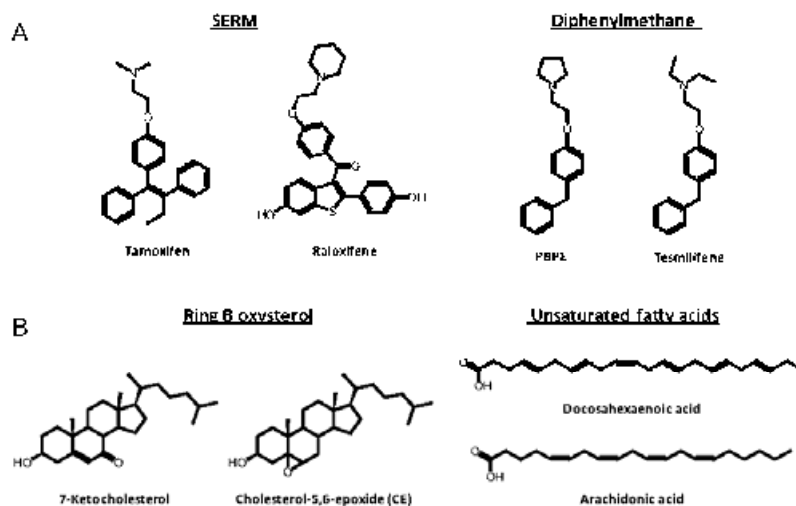


Fig. 2. Example of AEBS ligands: (A) Synthetic AEBS ligands include selective estrogen receptor modulators (SERMs) such as tamoxifen, diphenylmethane compounds such as PBPE, and several sigma-receptor ligands such as SR31747A. (B) Natural AEBS ligands are ring-B oxysterols and unsaturated fatty acids.

tive AEBS ligand PBPE to the AEBS led to the inhibition of these enzymes and induced the accumulation of their substrates (cholest-8-ene-3 β -ol or zymostenol and cholest-5,7-diene-3 β -ol or 7-dehydrocholesterol) in cancer cells (Fig. 3B). Interestingly, according to the structure of AEBS ligands the nature of the sterol that accumulated could change. Ring B oxysterols such as 6- and 7-ketocholestanol, and 7-ketocholesterol induced only the accumulation of zymostenol in tumor cells. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM), hydroxylated on their aromatic backbone such as 4OH-tamoxifen or triparanol, were inhibitors of the 3 β -hydroxysterol- Δ^{24} -reductase (DHCR24) leading to the accumulation of cholest-5,24-diene-3 β -ol (desmosterol). Raloxifene was both an inhibitor of the D8D7I and DHCR24 which led to the accumulation of cholest-8,24-diene-3 β -ol (zymosterol) in cells. Quantitative analyses of sterols showed us that the amount of free sterols was twice the amount found in untreated cells (Kedjouar et al., 2004). This phenomenon can be easily observed by labeling cells with filipin which revealed the presence of perinuclear intracytoplasmic labeled bodies that contained high amount of free sterols (de Medina et al., 2009b) (Fig. 3C).

We next established a link between the accumulation of cholesterol precursors by AEBS ligands and growth control and cytotoxicity to tumor cells. We established that Tam, AEBS ligands and the sterols identified as accumulating in cells, were all potent inducers of growth control, breast cancer cell differentiation and apoptosis (de Medina et al., 2009b,c; Payre et al., 2008). We observed that these cellular effects were associated with an increase in reactive oxygen species (ROS) and sterol oxidation products (Payre et al., 2008) (Fig. 4A). We further established that the autoxidation of intracellular sterols due to the ROS was necessary for the induction of cell differentiation and death, since alpha-tocopherol (vitamin E) fully inhibited these effects. On the other hand, the macroautophagy induced by AEBS ligands was shown to be sterol-dependent and did not require sterol autoxidation since vitamin E did not block autophagy. We showed that pharmacological and genetic impairment of autophagy increased cell death establishing that the macroautophagy induced by AEBS ligands was associated with cell survival and protected cancer cells against Tam induced cell differentiation and death (de Medina et al., 2009c) (Fig. 4B). These data established that the AEBS was necessary, but not sufficient, to induce cell differentiation and death but required additional oxidative stress and sterol oxidation to trigger the anticancer properties of AEBS ligands. Tam was known to

be antilactogenic to normal mammary glands in puerperal women (Masala et al., 1978; Shaaban, 1975) establishing an opposite effect between normal and tumor tissues.

Altogether, these results afford new perspectives for an optimal therapeutic use of Tam and other AEBS ligands for the treatment of breast cancers. Moreover, the level of mRNA encoding cholesterologenic enzymes including DHCR7, a subunit of the AEBS and ChEH, are overexpressed in breast cancer from patients resistant to Tam treatment (Pitroda et al., 2009). In addition, studies from Schiff et al. (2000) established that resistance to Tam in breast cancer cells xenografted into mice was accompanied by a loss in lipoxygenase activity. Lipoxygenases have been shown to produce ring B-oxysterols (Lund et al., 1992). This confirms the importance of sterol oxidative metabolism in the anticancer action of Tam.

On the other hand, diet supplementation with antioxidant such as vitamin E might need to be avoided for patients treated with Tam. The identification of the oxysterols accumulated under Tam treatment and their mechanism of action in the induction of cell differentiation and death deserve further investigations.

4. Tamoxifen blocks the ChEH activity

Cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol (α -CE), cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol (β -CE), and 7-ketocholesterol are among the major autoxidation products of cholesterol (Schroepfer, 2000). CEs (α -CE and β -CE) are the only known substrates of cholesterol epoxide hydrolase (ChEH), and 7-ketocholesterol inhibits it (Nashed et al., 1985; Sevanian and McLeod, 1986). ChEH (EC 3.3.2.11) catalyzes the hydrolysis of α -CE and β -CE into a unique geminal trans-diol, cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) (Newman et al., 2005) (Fig. 5A). We have observed that the AEBS and ChEH share similar biochemical characteristics and pharmacological properties. Indeed, ring B oxysterols, such as 6-ketocholestanol, 7-ketocholestanol, and 7-ketocholesterol, inhibit ChEH (Sevanian and McLeod, 1986) and bind to the AEBS (Hwang and Matin, 1989) with the same order of potency as that for their inhibition of ChEH. In addition, ChEH is inhibited by an autoxidation product of 7-dehydrocholesterol (Nashed et al., 1986), and 7-dehydrocholesterol is the substrate of DHCR7, an AEBS subunit (Kedjouar et al., 2004). Moreover, as with the AEBS, ChEH is located in the endoplasmic reticulum of cells and is found in most mammalian tissues, with the liver being the richest source of both the AEBS and ChEH (Watts and Sutherland, 1984). We recently established that the AEBS carries out the ChEH

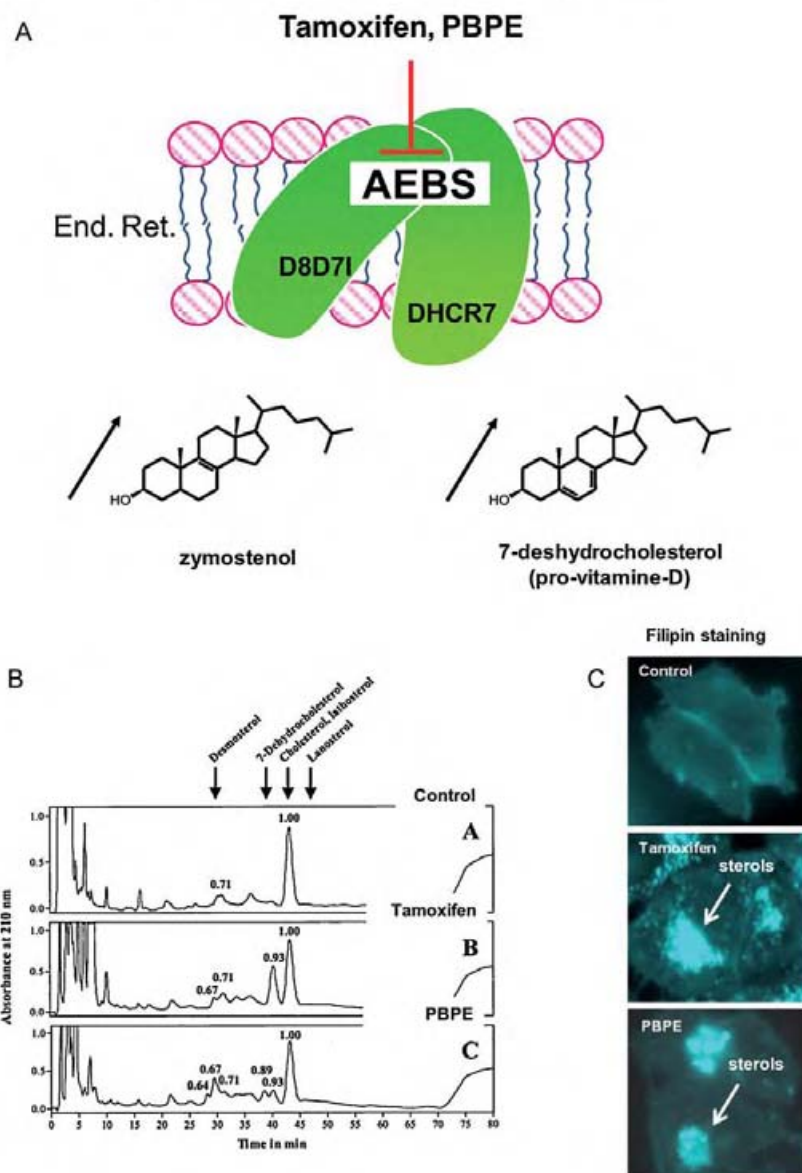


Fig. 3. (A) The AEBS is a hetero-oligomeric protein complex found in the endoplasmic reticulum (End. Ret.). It is made up of two sub-units both of which are involved in post-lanosterol cholesterol biosynthesis. The two sub-units of the AEBS are the 3β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase (D8D7I, EBP) and the 3β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase (DHCR7). The binding of Tam and PBPE to the AEBS induced the accumulation of substrates of these enzymes: zymostenol (the substrate of D8D7I) and pro-vitamin D (or 7-dehydrocholesterol) (the substrate of DHCR7). (B) Quantitative analyses of post-lanosterol intermediates of cholesterol synthesis by HPLC showed a large increase in MCF-7 cells treated with Tam and PBPE compared with solvent vehicle (EtOH 0.1%) treated cells as controls. (C) Filipin labeling of MCF-7 cells treated with Tam and PBPE highlights the increased accumulation of free sterols indicated by the presence of fluorescent vesicles that are not found in the controls.

activity (de Medina et al., 2010). We found that the two subunits of the AEBS are involved in ChEH activity: 3β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase (D8D7I, EBP) is the catalytic subunit whereas the 3β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase (DHCR7) is the regulatory subunit. ChEH has been proposed to be involved in the control of lipid metabolism (Newman et al., 2005) based on the biological properties of CT. We have reported that synthetic AEBS ligands including SERMs and diphenylmethane compounds competitively inhibit ChEH activity whereas unsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid are non-competitive inhibitors showing that the pharmacological profiles of the AEBS and ChEH were identical. Consequently, Tam and anticancer agents of clinical interest, such as raloxifene and docosahexaenoic acid (an omega 3 poly-unsaturated fatty acid), induce the accumulation of CEs. The accumulation of

CEs by compounds used for long term treatment of cancers and approved for the chemoprevention of breast cancers could have been of concern if the oxirane ring had been reactive towards nucleophiles and alkylated protein and DNA leading to toxicity and mutagenicity as observed with styrene oxide (Jagr et al., 2007). However, as opposed to toxic aliphatic and aromatic epoxides, CEs are very stable (de Medina et al., 2009a) and non-tumorigenic compounds (el-Bayoumy et al., 1996). In contrast, CT was reported to be mutagenic in the presence of reactive oxygen species (Cheng et al., 2005) suggesting that the inhibition of CT production through ChEH inhibition by Tam and other anti-cancer AEBS ligands might be linked to their chemopreventive activity. Therefore, modulation of CE metabolism resulting from ChEH inhibition could play a role in the antitumor activities of Tam and AEBS ligands and deserves

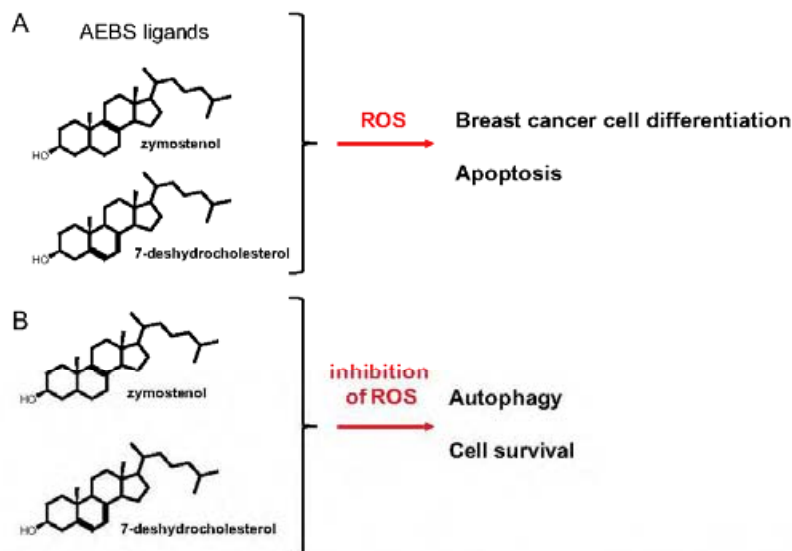


Fig. 4. (A) The relationship between AEBS and growth control of tumor cells by its cognate ligands was established by showing that AEBS ligands and the sterols that accumulated in treated cells induced breast cancer cell differentiation and death through the production of reactive oxygen species (ROS) and oxysterols. (B) When the production of ROS is blocked by anti-oxidants, AEBS ligands induced cell survival through an autophagic process.

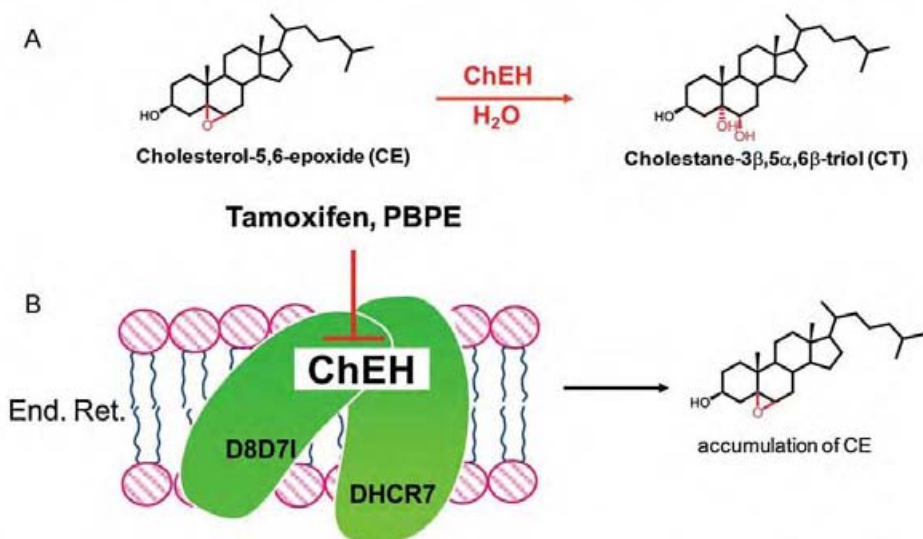


Fig. 5. (A) The cholesterol epoxide hydrolase (ChEH) catalyzes the hydration of Cholesterol-5,6-epoxide (CE) to produce cholestane-3β,5α,6β-triol (CT). (B) The AEBS carries out the ChEH activity. The inhibition of the ChEH by AEBS ligands such as Tam and PBPE induce the accumulation of CE.

further investigations. α -CE has been shown to be a modulator of the liver X-receptor (LXR) and an antagonist in its 3 β -sulfate ester form (Fuda et al., 2007). LXRs are nuclear receptors involved in lipogenesis and sterol efflux, and their implication in the mechanism of action of AEBS ligands is currently under investigation in our laboratory. The biotransformation of α -CE by glutathione transferase into 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6 β -yl-S-glutathione has also been described (Meyer and Ketterer, 1982), though its biological activity remains to be investigated. We have described the synthesis of alkylaminooxysterols (AOXs), resulting from the aminolysis of α -CE by biogenic amines. AOXs are potential metabolites which induce the differentiation and death of breast cancer cells (de Medina et al., 2009a). The existence of AOXs as biotransformation products of α -CE and their implications as mediators of the antitumor activity of Tam are currently under investigations in our laboratory.

5. Conclusions and perspectives

Tam is one of the main drugs used for the management of ER positive breast cancers and the first one approved by the North American Food and Drug Administration for preventive therapy. In this review we have highlighted recent discoveries from our lab showing that the modulation of cholesterol metabolism by Tam can participate in its anticancer pharmacology in addition to its modulation of estrogen receptors. In particular, we reported the role of ACAT and AEBS/ChEH as important targets of Tam that are involved in its antitumor activities and that may account for the acquisition of Tam-resistance by tumors. The inhibition of ACAT we measured was restricted to non-phenolic compounds in the SERMs series and was not observed with selective AEBS ligands from the diphenylmethane series (de Medina et al., 2004a,b). Thus an extensive 4-hydroxylation of Tam will decrease its capacity to

inhibit ACAT, which will favour the accumulation of mitogenic and pro-invasive cholesteryl esters and will facilitate the esterification of active oxysterols. The stimulation of sterol autoxidation by Tam and the inhibition of ChEH constitute a new mechanism linking sterol metabolism to cancer. The contribution of ChEH to the efficacy of Tam and other AEBs ligands as well as the importance of CE, CT and oxidized CT in the control of mitogenic processes in tumor cells deserve further investigations.

The study of sterol metabolism in patients treated with Tam might afford new predictive biomarkers and new therapeutic strategies to improve the clinical outcome for such patients.

Acknowledgements

This work was supported by an internal grant from INSERM, the Institut Claudius Regaud, the Conseil Regional Midi-Pyrénées and Affichem.

References

- Antalis, C.J., Arnold, T., Rasool, T., Lee, B., Bulman, K.K., Siddiqui, R.A., 2010. High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.* 122, 661–670.
- Benfili, S., Poirier, M.D., El Andaloussi, A., 2010. Acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase inhibitor Avasimibe affects survival and proliferation of glioma tumor cell lines. *Cancer Biol. Ther.* 9, 1025–1032.
- Chang, T.Y., Li, R.L., Chang, C.C., Huang, Y., 2009. Acyl coenzyme A:cholesterol acyl transferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1–9.
- Cheng, Y.W., Kang, J.J., Shih, Y.L., Lu, Y.L., Wang, C.F., 2005. Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food Chem. Toxicol.* 43, 617–622.
- de Medina, P., Boubekeur, N., Balaguer, P., Favre, C., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., 2006. The prototypical inhibitor of cholesterol esterification Sah 58 035 [3-[derythylmethylsilyl] n [2-[4-methylphenyl]-1-phenylethyl]propionamide], is an agonist of estrogen receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 139–149.
- de Medina, P., Favre, C., Poirot, M., 2004a. Multiple targeting by the anti-tumor drug tamoxifen: a structure activity study. *Curr. Med. Chem. Anticanc. Agents* 4, 491–508.
- de Medina, P., Paillasse, M.R., Payre, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., 2009a. Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 52, 7765–7777.
- de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Poirot, M., Silvente-Poirot, S., 2010. Identification and pharmacological characterization of cholesterol 5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBs ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 13520–13525.
- de Medina, P., Payre, B., Boubekeur, N., Bertrand Michel, J., Terce, F., Silvente Poirot, S., Poirot, M., 2009b. Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ.* 16, 1373–1384.
- de Medina, P., Payre, B.L., Bernad, J., Bosser, I., Pipy, B., Silvente Poirot, S., Favre, C., Faye, J.C., Poirot, M., 2009b. Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 1165–1173.
- de Medina, P., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., 2009c. Tamoxifen and AEBs ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 5, 1066–1067.
- el Bayoumy, K., Ji, D.Y., Upadhyaya, P., Chae, Y.H., Kortzke, C., Rivenson, A., Reddy, B.S., Anil, S., Hecht, S.S., 1996. Lack of tumorigenicity of cholesterol epoxides and estrone 3,4-quinone in the rat mammary gland. *Cancer Res.* 56, 1970–1973.
- Foda, H., Javitt, N.B., Mitamura, K., Ikegawa, S., Shott, C.A., 2007. Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *J. Lipid Res.* 48, 1343–1352.
- Higgins, M.J., Stearns, V., 2011. Pharmacogenetics of endocrine therapy for breast cancer. *Annu. Rev. Med.* 62, 281–293.
- Hwang, P.L., Matin, A., 1989. Interactions of sterols with antiestrogen binding sites: structural requirements for high-affinity binding. *J. Lipid Res.* 30, 239–245.
- Jagr, M., Mraz, J., Linhart, I., Srnansky, V., Pospisil, M., 2007. Synthesis and characterization of styrene oxide adducts with cysteine, histidine, and lysine in human globin. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1442–1452.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, L., Thun, M.J., 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 59, 225–249.
- Jordan, V.C., 2007. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen receptor modulators. *Nat. Rev. Cancer* 7, 46–53.
- Kedjoun, B., de Medina, P., Oulad-Abdelghani, M., Payre, B., Silvente-Poirot, S., Favre, C., Faye, J.C., Poirot, M., 2004. Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J. Biol. Chem.* 279, 34048–34051.
- Lash, T.L., Lien, L.A., Sorensen, H.T., Hamilton-Dutoit, S., 2009. Genotype-guided tamoxifen therapy: time to pause for reflection? *Lancet Oncol.* 10, 825–833.
- Lund, E., Dizackfus, U., Bjorkhem, I., 1992. On the mechanism of oxidation of cholesterol at C-7 in a lipoxygenase system. *J. Biol. Chem.* 267, 12467–12467.
- Ma, X.J., Wang, Z., Ryan, P.D., Kakoff, S.J., Barmettler, A., Fuller, A., Muir, B., Mohapatra, G., Salunga, R., Tuggle, J.T., Tran, Y., Tran, D., Tassin, A., Amou, P., Wang, W., Enright, E., Stecker, K., Escopa-Sabal, E., Smith, B., Younger, J., Balis, U., Michaelson, J., Bhan, A., Habibi, K., Baer, T.M., Brugge, J., Haber, D.A., Erlander, M.C., Sgroi, D.C., 2004. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 5, 607–616.
- Masala, A., Delirata, G., Lo Dico, G., Sroppelli, I., Alagna, S., Devilla, L., 1978. Inhibition of lactation and inhibition of prolactin release after mechanical breast stimulation in puerperal women given tamoxifen or placebo. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 85, 134–137.
- Meyer, D.J., Ketterer, B., 1982. 5 alpha, 6 alpha epoxy cholestan 3 beta ol (cholesterol alpha oxide): a specific substrate for rat liver glutathione transferase B. *FEBS Lett.* 150, 499–502.
- Nashed, N.T., Michaud, D.P., Levin, W., Jerina, D.M., 1985. Properties of liver microsomal cholesterol 5,6-oxide hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 241, 149–162.
- Nashed, N.T., Michaud, D.P., Levin, W., Jerina, D.M., 1986. 7-Dehydrocholesterol 5,6 beta-oxide as a mechanism-based inhibitor of microsomal cholesterol oxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 261, 2510–2513.
- Newman, J.W., Morisseau, C., Hammock, B.D., 2005. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 44, 1–51.
- Paillasse, M.R., de Medina, P., Amouroux, G., Mhamdi, L., Poirot, M., Silvente-Poirot, S., 2009. Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. *J. Lipid Res.* 50, 2203–2211.
- Payre, B., de Medina, P., Boubekeur, N., Mhamdi, L., Bertrand Michel, J., Terce, F., Fouquaux, I., Goudoumeche, D., Record, M., Poirot, M., Silvente Poirot, S., 2008. Microsomal antiestrogen binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3707–3718.
- Pitroda, S.P., Khodarev, N.N., Beckett, M.A., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R., 2009. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5837–5841.
- Schiff, R., Reddy, P., Abotupa, M., Coronado Heibolm, E., Crim, M., Hilsenbeck, S.G., Lawrence, R., Doncke, S., Herrera, R., Chamness, G.C., Fuqua, S.A., Brown, P.L., Osborne, C.K., 2000. Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1926–1934.
- Schroepfer Jr., C.J., 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554.
- Sevanian, A., McLeod, L.L., 1986. Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 261, 54–59.
- Sbaiban, M.M., 1975. Suppression of lactation by an antiestrogen, tamoxifen. *Lur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 4, 167–169.
- Sutherland, R.L., Foo, M.S., 1979. Differential binding of antiestrogens by rat uterine and chick oviduct cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 183–191.
- Sutherland, R.L., Murphy, L.C., San Foo, M., Green, M.D., Whybourne, A.M., Krozowski, Z.S., 1980. High affinity antiestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature* 288, 273–275.
- Tosi, M.R., Tugnoli, V., 2005. Cholesteryl esters in malignancy. *Clin. Chim. Acta* 359, 27–45.
- Watts, C.K., Sutherland, R.L., 1984. High affinity specific antiestrogen binding sites are concentrated in rough microsomal membranes of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 109–115.

Article 5

La Dendrogénine A : une nouvelle classe d'oxystérol retrouvée chez les mammifères et qui possède une forte activité anti-tumorale

(En révision pour *Nature Communications*)

INTRODUCTION

Nous avons caractérisé dans l'article 3 que le site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS) porte l'activité enzymatique cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH)¹²¹. La ChEH catalyse l'hydrolyse des cholestérol-5,6-époxydes (CEs) en cholestane-3,5,6-triol (CT). Les ligands d'AEBS inhibent l'activité ChEH ce qui provoque une accumulation de CEs. Il a été montré qu'AEBS porte un site de liaison de l'histamine¹²⁵. L'équipe de Marc Poirot a pensé que les CEs accumulés au niveau d'AEBS pouvait réagir avec l'histamine lié à AEBS grâce à une réaction nucléophile facilitée par la proximité spatiale de l'histamine avec les CEs. Par conséquent, de Medina *et al.* ont effectué la synthèse du produit de la réaction entre le CE α et l'histamine dans des conditions catalytiques¹²⁴. Même en présence de conditions catalytiques, le CE β ne réagit pas avec l'histamine ce qui montre que cette réaction est stéréosélective vis-à-vis des cholestérol-5,6-époxydes et qu'elle est en faveur du CE α . Il s'est avéré que le produit de cette réaction, le 6-histaminylcholestane-3,5-diol (HiCD) qui est un stéroïde alkaloïde, possède une forte capacité à induire la différenciation cellulaire de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. En raison de sa capacité à induire une dendritogenèse qui est une caractéristique de différenciation des précurseurs de neurones et des mélanocytes, le 6-histaminylcholestane-3,5-diol fut appelé Dendrogénine A (DDA)¹²⁴. A des concentrations de l'ordre du micromolaire, plus fortes que celles utilisées pour induire la différenciation cellulaire, la DDA est cytotoxique sur un vaste panel de lignées cellulaires cancéreuses. Cela suggère que la DDA puisse être une molécule intéressante à développer pour une application thérapeutique anti-cancéreuse. L'existence biologique de la DDA est possible puisque sa synthèse a été motivée par une hypothèse métabolique qui repose sur la réaction entre le substrat d'une enzyme identifiée (ChEH), le CE α , et l'histamine qui se lie à proximité de la ChEH. Dans cette étude, en utilisant le profil de fragmentation de la DDA de synthèse, nous avons dosé la DDA dans des extraits de tissus murins et humains afin de détecter la présence

de la DDA dans les organismes mammifères. Nous avons aussi caractérisé son potentiel anti-cancéreux sur des tumeurs implantées chez la souris.

Dendrogenin A: an endogenous mammalian conjugation product of cholesterol-5,6-alpha epoxide and histamine that triggers anti-tumor activities

Philippe de Medina^{1,4*}, Michael R. Paillasse^{1,4*}, Gregory Segala^{1,2,3}, Maud Voisin^{1,2,3}, Loubna Mhamdi⁴, Florence Dalenc^{1,2,3}, Magali Lacroix-Triki^{2,3}, Frédéric Pont⁵, Talal Al Saati⁶, Sandrine Silvente-Poirot^{1,2,3**} and Marc Poirot^{1,2,3**}

¹ Team « Sterol Metabolism and Therapeutic Innovations in Oncology», Cancer Research Center of Toulouse. UMR 1037 INSERM-University Toulouse III, Toulouse, France ; ²Université Paul Sabatier, Toulouse France. ³Institut Claudius Regaud, Toulouse, France; ⁴AFFICHEM, Toulouse France; ⁵UDEAR. UMR 5165 CNRS-University Toulouse III, Toulouse, France; ⁶INSERM-US006 ANENPIO/CREFRE, Toulouse, France.

Contact:

**Corresponding authors: M. Poirot: mail: marc.poirot@inserm.fr and S. Silvente-Poirot: mail: poirot.sandrine@hotmail.fr; phone, +33 (0)561424648; fax, +33 (0)561424631.

Additional Footnotes

*These authors contributed equally to this manuscript

Running title:

Dendrogenin A, a new class of mammalian oxysterol

SUMMARY

The present study reports the discovery of dendrogenin A (5 α -hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 β -ol) in mammalian tissues as a product of the conjugation of cholesterol-5,6-alpha-epoxide and histamine. By contrast, we did not detect dendrogenin A (DDA) in cancer cells of various origins and determined that its concentration was 5-fold lower in human breast tumors compared with the adjacent normal tissue, which suggests that a deregulation of DDA biosynthesis may occur during carcinogenesis. We showed that DDA is a direct inhibitor of cholesterol epoxide hydrolase, a target of chemopreventive anticancer agents, and established that DDA triggered tumor differentiation and growth control in mice and improved animal survival. The properties and targeting of DDA as well as its decreased level in tumors suggest it has a physiological function in maintaining cell integrity and differentiation. The discovery of DDA reveals the existence of a new metabolic pathway in mammals at the crossroads of histamine and cholesterol metabolism.

INTRODUCTION

Cholesterol Epoxide Hydrolase (ChEH) is a microsomal enzyme that is ubiquitous in mammalian tissues and selectively catalyzes the hydrolysis of the cholesterol epoxides (CEs) 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol (α -CE) and 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol (β -CE) into cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT)¹. We recently reported that ChEH activity is a property of the anti-estrogen binding site (AEBS), a heterodimeric complex formed by 3 β -hydroxysterol- Δ^7 -reductase (DHCR7) and 3 β -hydroxysterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerase (D8D7L, also known as the Emopamil Binding Protein; EBP), which is involved in the biosynthesis of cholesterol^{2,3}, organ development⁴, cell differentiation and cell death^{5,6}. We have shown that all AEBS ligands are inhibitors of ChEH, and that inhibition of ChEH results in an accumulation of cholesterol epoxides (CEs) and a decrease in CT that may contribute to the chemopreventive and anti-cancer properties of AEBS ligands such as tamoxifen². Tamoxifen is one of the main drugs widely used for the management of estrogen receptor positive breast cancers⁷.

Several lines of evidence point to the existence of an active metabolism centered on α -CE. Stereoselective biosynthesis of α -CE occurs in the adrenal cortex by a currently unidentified cytochrome p450⁸. α -CE is a direct modulator of the liver-X-receptor (LXR)⁹ and can antagonize LXR signaling in its 3 β -sulfated form¹⁰. α -CE can also be metabolized into 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6 β -yl-S-glutathione^{11,12}. We have recently reported that the aminolysis of α -CE by biogenic amines under catalytic conditions was possible and generated powerful cell differentiating 5 α -hydroxyl-6 β -aminoalkyl-sterols¹³. Among these active steroidal alkaloids, 5 α -hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 β -ol, also called dendrogenin A (DDA), was chemically synthesized¹³ (Fig. S1) based on the hypothesis that there could be a metabolic conjugation of CEs with histamine at the level of the AEBS, which binds both CEs and histamine¹⁴. *In vitro* studies showed that DDA induced cell differentiation and cell death in various tumor cells¹³. By contrast, the regio-isomer of DDA, 5 α -hydroxy-6 β -[4-(2-amino-ethyl)-imidazol-1-yl]-cholestan-3 β -ol, also called compound 17 (C17), in which histamine was conjugated by its imidazole ring to carbon C6 of α -CE (Fig. S1) was inactive in these different tests,

thus showing a regio-selectivity of action for these compounds¹³. In the present study, we sought to determine whether DDA is a naturally occurring metabolite in mammals. More generally, this question was motivated by the fact that no steroidal alkaloid has been discovered in mammals; however, different steroidal alkaloids have been isolated from plants, amphibians and ancestral fishes¹⁵. These molecules, such as squalamine and other analogues that have been isolated from several tissues of the dogfish shark *Squalus Acanthias* and the sea lamprey *Petromyzon Marimus*, show important pharmacological and therapeutic functions. For example, squalamine exhibits host-defense, anti-angiogenic and anti-tumor activities against different tumors¹⁶⁻¹⁹.

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

RESULTS

Identification of endogenous DDA in mouse brain. We first investigated whether DDA was detectable in mouse brain, a tissue rich in AEBSSs²⁰. Homogenates of whole brain with the cerebella were extracted using organic solvent, and the extracts were analyzed by liquid chromatography and nano-electrospray mass spectrometry. The mass fragmentation profiles of synthetic DDA (sDDA) (Fig. S2A-D and Table S1) and the synthetic regio-isomer C17 (sC17) (Fig. S3 A-D and Table S1) were used as references. Mass spectrometric analysis of the HPLC fractions, eluted at 18-21 min (Fig. 1A), showed the presence of a peak of $m/z = 514$, which corresponded to the expected mass of DDA (Fig. 1B). The MS/MS fragmentation of the $m/z = 514$ peak (Fig. 1C-E) resulted in profiles that were similar to sDDA (Fig. S2A-D) and distinct from sC17 by the absence of the $m/z = 367$ fragment in MS² (Fig. S3B and Table S1); therefore, these experiments established that DDA was endogenously present in mouse brain extracts.

We characterized whether DDA was synthesized in brain tissue by incubating [^{14}C]- α -CE or [^{14}C]- β -CE with mouse brain extracts in the presence of histamine. Thin-layer chromatography (TLC) analysis indicated that α -CE was transformed into CT, which is the product of ChEII activity², and also reacted with histamine to generate a product that co-migrated with synthetic [^{14}C]-DDA (Fig. 2A, lane 1). By contrast, β -CE was only transformed into CT (Fig. 2A, lane 2). These data showed that there was a selective transformation of α -CE with histamine to generate DDA, while β -CE did not react with histamine (Fig. 2B).

Quantification of DDA in mammalian tissues and tumors. Endogenous DDA was quantified through the establishment of a calibration curve (Fig. S4) using deuterated DDA (d7-DDA) as an internal standard (Fig. S5). We observed that DDA was present in mouse brain at a concentration of 46 ng/g of tissue (Fig. 3A). Analysis of other tissues from mice and humans showed that DDA was present at concentrations ranging from 68 ± 9 ng/g of tissue (human spleen) to 263 ± 49 ng/g of tissue (mouse liver), which results in a final concentration of 65 ± 13 nM to 485 ± 92 nM assuming that 1 g of tissue corresponds to 1 ml of water (Fig. 3A). The concentration of DDA detected in human plasma and in fetal bovine serum was 2.8 ± 1 nM and 6.2 ± 1.3 nM, respectively (Fig. 3A), which shows that DDA was also present in the circulation. Treatment of fetal bovine serum with dextran-coated charcoal reduced the DDA content to below the limit of detection (Fig. 3A). Because DDA was active against tumor cell lines at micromolar concentrations¹³, we quantified DDA in human and mouse cancer cells that were representative of several cancers. We used cell culture conditions in which DDA was stripped from the serum with dextran-coated charcoal. DDA was not detectable in any tumor cells, which indicated that there was either no production of DDA in these tumor cell lines or that the concentrations of DDA were below the limit of detection (Table S2). As these data suggested that there was a possible deregulation of DDA synthesis in tumor cells, we subsequently quantified DDA in human breast tumors and in the adjacent normal tissues from 10 patients. Indeed, we determined that the mean concentration of DDA was 5-fold lower in human breast tumors (15 ± 6 ng/g of tissue) compared with matched normal tissue (72 ± 28 ng/g of tissue) (Fig. 3B).

DDA is a direct inhibitor of ChEH. We previously reported that ligands of the AFBS were potent inhibitors of ChEH², which is associated with their capacity to induce tumor cell differentiation and death^{5,6}. We investigated whether DDA could be an inhibitor of ChEH activity because we previously had shown that ring B oxysterols inhibited ChEH². As shown in the TLC-autoradiogram in Fig. 4A, the conversion of α -CE to CT in human MCF-7 breast cancer cells was inhibited in a concentration-dependent manner by DDA with an IC_{50} of 120 ± 20 nM, while C17 was a very weak inhibitor of ChEH activity (Fig. 4A). Experiments performed on MCF-7 cell extracts² showed that the inhibition of ChEH by DDA was competitive because K_m increased and V_{max} remained unchanged (Fig. 4B). The potency of DDA to inhibit ChEH was compared with the natural ring B oxysterols, 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OHCh) and 7-ketocholesterol (7-kCh), that inhibited ChEH in microsomes from rat liver². 25-hydroxycholesterol (25-OHCh), that did not inhibit ChEH, was used as control². As shown in Fig. 4C, 7 α -OHCh and 7-kCh inhibited ChEH in MCF-7 cells with IC_{50} values that were 100-fold and 42-fold higher than DDA, respectively, while 25-OHCh was unable to inhibit ChEH. We determined the ability of DDA to inhibit ChEH in other human (SK-MEL28, melanoma) and murine (TS/A, mammary and B16F10, melanoma) cancer cell lines that responded to DDA¹³. As indicated in Fig. 4D, DDA inhibited ChEH activity in all the tested cell lines with a high potency, while C17 was inactive. These data indicated that DDA is a direct inhibitor of ChEH and is the most potent natural inhibitor of this enzyme reported to date.

DDA is not a modulator of the estrogen receptor (ER). Several AFBS ligands and oxysterols have been shown to modulate ER-dependent transcription²¹⁻²³. We therefore examined whether DDA could function as an ER modulator using MELN cells, which are MCF-7 cells stably transfected with a plasmid that encodes an estrogen-responsive promoter fused to the luciferase gene²¹. As shown in Fig. 4E, DDA did not stimulate the expression of luciferase in these cells and did not inhibit luciferase stimulation by 17 β -estradiol (E2), while Tam used as a positive control completely inhibited luciferase

expression. Therefore, DDA is not a modulator of the estrogen receptor transcriptional activity, and its pharmacology is distinct from Tam.

DDA exerts anti-tumor properties *in vivo*. We established previously that DDA induced tumor cell differentiation and death *in vitro* in various tumor cell lines of different types of cancers, and in particular, DDA induced lactation characteristics in breast cancer cell lines and melanogenesis in melanoma cell lines¹³. Because DDA is endogenous in mammals, we assessed its anti-tumor activity against syngeneic tumors grafted onto a natural environment using immunocompetent mice. In a chemotherapeutic setting, mice were grafted subcutaneously (s.c.) with a melanoma (B16F10) or a mammary (TS/A) tumor and treated on the same day and subsequently with DDA, or the indicated compounds or vehicle (control group). In B16F10-grafted mice, DDA at a concentration of 0.37 µg/kg significantly inhibited tumor growth compared with the control (Fig. 5A), and prolonged animal survival: 40 % at day 50 compared with no survivors in the control group (Fig. 5B). By contrast, similar dosing with C17 and dacarbazine at a concentration of 50 mg/kg²⁵ did not significantly inhibit tumor growth (Fig. 5A) or enhance animal survival (Fig. 5B). In TS/A-grafted mice, DDA treatment (0.37 µg/kg) significantly reduced tumor growth in comparison with the control group, (Fig. 5C) and prolonged animal survival up to 60 % at day 50 (Fig. 5D). A significant reduction in tumor volume was also observed with 5.6 mg/kg of Tam, but C17 did not significantly reduce tumor growth compared with the controls (Fig. 5C). At day 50, the survival of the mice treated with Tam was 30 %, and the survival rate of the mice treated with the vehicle or C17 was 20 % (Fig. 5D). We then investigated the efficacy of DDA against established B16F10 and TS/A tumors (Fig. 5E and 5F, respectively). In this setting, immunocompetent mice were treated s.c. once a day with DDA or the indicated compounds or the vehicle (control group). As shown in Fig. 5E, 3.7 µg/kg of DDA treatment resulted in a significant decrease in B16F10-tumor growth compared with the control group, while a similar dose of C17 had no anti-tumor effect. A significant reduction in tumor volume was also obtained with 50 mg/kg of dacarbazine. As shown in Fig. 5F, treatment of TS/A-grafted mice with 3.7 µg/kg of DDA resulted in a

significant reduction in tumor growth, while C17 and Tam did not significantly inhibit tumor growth compared with the control group.

DDA induces tumor cell differentiation associated with increased infiltration of T-lymphocytes and dendritic cells into tumors. Histological and immunohistochemical analyses of tumors isolated from control and DDA-treated animals revealed that the inhibition of tumor growth by DDA was associated with increased tumor differentiation in both tumor models; B16F10-tumor sections showed an increased production of melanin after Masson-Fontana's staining (Fig. 6A), and TS/A-tumor sections had an increased accumulation of neutral lipid droplets stained with Orange Red Oil (ORO) and an increased expression of Milk Fat Globules (MFGF8/lactadherin), which was assessed by immunohistochemistry (Fig. 6B). Similarly, cell differentiation was also observed after *in vitro* treatment of B16F10 and TS/A cells with DDA. In B16F10 cells treated with DDA for 24 h, the melanin content increased in a concentration-dependent manner up to 2.5 μ M DDA (Fig. S6A-B) and was associated with increased activity of tyrosinase, which is the enzyme that catalyzes the initial and rate-limiting step of melanin production (Fig. S6C). Moreover, TS/A cells treated for 24 h with 1 and 2.5 μ M DDA showed a 2.4- and 3-fold increase in staining of neutral lipid droplets with ORO (Fig. S7A-B) and a 7- and 9-fold increase in intracellular triglycerides (Fig.S7C) compared with solvent vehicle-treated cells. In addition, Milk Fat Globule (MFGF8/lactadherin) was increased after treatment with 2.5 μ M DDA, as determined by immunostaining and flow cytometry analysis (Fig. S7D, left and right panels, respectively). Interestingly, we observed that DDA-mediated tumor differentiation was accompanied by an increased infiltration of CD3⁺ T lymphocytes and CD11c⁺ dendritic cells into B16F10 (Fig. S8A) and TS/A (Fig. S8B) tumors compared with the control groups, which indicated an enhanced recognition of the tumors by the immune system after DDA treatment.

DISCUSSION

We describe here the isolation and structural characterization of DDA as the first endogenous steroidal alkaloid identified in mammals. Using nano-electrospray mass spectrometry after HPLC

enrichment, we were able to measure DDA in various tissues; DDA was present at various concentrations, ranging from 46 to 263 ng/g of tissue in brain, lung, liver, spleen and breast tissues (65 to 485 nM). In comparison, the concentration of α -CE in mouse liver was reported to be 170 ng/g of tissue²⁶, which indicates that DDA is present at the same concentration range as α -CE in the liver. In plasma and serum, the concentration of DDA was between 2.8 ± 1.0 and 6.2 ± 1.3 nM. Numerous steroidal alkaloids have been isolated from plants (tomatidine in *Solanum lycopersicum*), amphibians (batrachotoxins in *Phyllobates* and *Dendrobates*)¹⁵ and fish (squalamine in *Squalus acanthias* and petromyzonamine in *Petromyzon Marinus*)^{27,28}. The structure of DDA is distinct from these steroidal alkaloids. DDA is a derivative of cholesterol, and the nitrogen source is from histamine, which is derived from the amino acid histidine. DDA is the first steroidal alkaloid reported to date in which the basic group is attached to ring B of the steroid backbone. We showed through pulse-chase metabolic studies that DDA is formed in mammalian tissues only from α -CE and not from β -CE showing a stereoselectivity in CE conjugation. This indicates that the presence of the Δ^5 double bond enables a stereospecific transformation to take place that leads to the biosynthesis of only one CE stereoisomer. This Δ^5 double bond has been shown to contribute to the specific physicochemical properties of cholesterol that drive its membrane interactions²⁹, and to be required for the down regulation of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A³⁰ and for cell viability³¹. In addition, the accumulation of dihydrocholesterol (cholestanol), which lacks the Δ^5 double bond, is linked to severe genetic diseases, such as lathosterolosis associated with perinatal death⁴ and cerebrotendinous xanthomatosis³²; both syndromes lead to severe impairment of development. This supports our observation that an active metabolism of the Δ^5 double bond can generate products such as DDA with potent cell differentiation properties that may be required for development. Because we observed that other products of aminolysis from α -CE can be produced and have different properties according to the nature of the biogenic amine that has been grafted¹³, it will be important to determine whether other steroidal alkaloids exist in mammals as well.

Pharmacological assays indicate that DDA is the most potent natural inhibitor of ChEH found to date, with an IC_{50} around 100 nM, which suggests that physiological tissue concentrations of DDA (between 65 + 13 and 485 + 92 nM) may control the activity of ChEH and the accumulation of CEs. We recently reported that the inhibition of ChEH, and the CT production that leads to CE accumulation are likely to play a role in the chemopreventive and therapeutic effects of drugs that are of high clinical interest, such as Tam². A similar mechanism of action can be proposed for DDA that exhibits potent tumor differentiating and anti-tumor activities in different cancer cells and tumor-grafted models, and enhances animal survival. Interestingly, the anti-tumor effects of DDA have been associated with an increased tumor infiltration of T lymphocytes and CD11c+ dendritic cells. Oxysterol metabolism has been linked to innate and adaptive immune responses through Liver-X-receptor (LXR) signalling^{33,34}, and α -CE was recently reported to be a direct modulator of LXR⁹. In addition, α -CE is the substrate of cholesterol sulfotransferase SULT2B1b^{35,36}, and the resulting 5.6 α -epoxycholesterol-3-sulfate (ECHS) is an antagonist of LXR¹⁰. A recent study showed that human and mouse tumors produce LXR agonists that inhibit CC chemokine receptor-7 (CCR7) expression on maturing DCs and the ability of DCs to initiate an immune T cell response against tumors. Engineering the expression of Sult2B1b in these tumors reversed this process through inactivation of LXR agonists and resulted in tumor growth control, increased animal survival and inhibition of tumor immunoescape³³. This work shed light on the importance of inhibiting LXR to mediate anti-tumor responses, immunity and animal survival. This could be achieved by DDA through the direct inhibition of ChEH, which may generate LXR antagonists¹⁰. Interestingly, we showed that DDA does not modulate the transcriptional activity of the ER compared with Tam. This excludes the risk of endometrial cancer that is increased with Tam treatment through an ER stimulation-dependent mechanism⁷. Moreover, most immune cells, including myeloid progenitors and dendritic cells, express the ER, and estrogen is recognized as a growth and/or differentiation factor for these cells³⁷. By inhibiting the ER, Tam may depress immunity by impairing estrogen-promoted dendritic differentiation and activation³⁸ while DDA acts independently of the ER.

Overall, these data suggest that DDA is an endogenous factor that may help to maintain cell integrity and differentiation. Consistent with these properties, DDA was not detectable in cancer cells of diverse origin, and its concentration in human breast tumor samples was determined to be 5-fold lower than in the adjacent normal tissue, suggesting that deregulation of DDA biosynthesis may occur during carcinogenesis and lead to a deficiency in DDA that may be complemented by treatment of tumor cells with exogenous DDA.

We previously reported that α -CE is chemically unreactive towards nucleophiles, and its reaction with histamine was only possible under catalytic conditions to give DDA¹³. Together these data indicate that an enzyme is required to catalyze the biosynthesis of DDA and that it has yet to be identified. Its identification will be the focus of our future efforts.

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

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

METHODS

Materials. Chemicals and solvents were from Sigma unless otherwise specified. [¹⁴C] cholesterol (58 Ci/mol) was purchased from GE Healthcare. [25,26,26,26,27,27,27-d₇]cholesterol (99% D) was purchased from Sigma-Aldrich. HPLC-MS grade acetonitrile was from Pierce. HPLC purification of synthetic compounds was done on a Gilson HPLC equipped with two 305 pumps, a gradient former and a UV-visible detector. HPLC purifications and analyses were carried out using an LC200 series Perkin

Elmer apparatus, and diode array UV detector, using an Ultrasep C18 RP 100 column from Bishoff Chromatography. The purification of radiolabeled compounds was carried out on a different LC200 series Perkin Elmer apparatus equipped with a beta radioactivity detector. Autoradiography experiments were done with GE-Healthcare or Kodak Phosphor screens and images were generated with a STORM 840 Imager (Amersham Biosciences). A FACScalibur, Becton-Dickinson, was used for cytometry flux analyses. Synthetic DDA (sDDA) and compound 17 (C17) were prepared as previously described¹³ and were 99 % pure. Dacarbazine was donated by the Claudius Regaud Institute (Toulouse, France) and was of clinical grade. The antibodies used were from the following companies: the anti-MFGE8 used for *in vitro* studies was from Clinisciences (France) (clone 2422). The anti-MFGE8 used for immunohistology was from MBL International, MA (clone 18A2-G18). The anti-CD3 (ready to use) was from Dako (France) and anti-CD11c (clone N418) was from Tebu-bio (France).

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

Cell culture. All cell lines were from the American Tissue Culture Collection, except for the TS/A spontaneous mammary adenocarcinoma of BALB/c (H-2^b) mice kindly provided by Dr. Pier-Luigi Lollini (Bologna, Italy)³⁹, the GL261 brain carcinoma of C57BL/6 (H-2^b) mice kindly provided by Dr Geza Safrany (Budapest, Hungary)⁴⁰ and the MELN cells established by transfecting MCF-7 cells with the ERE- β -globin-Luc-SV-Neo plasmid²¹. All cell lines were grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. All culture media contained penicillin and streptomycin (50 U/ml each) and 1.2 mM glutamine (3.2 mM glutamine for B16F10). MELN and MCF-7 cells were grown in RPMI supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). TS/A, A549, SK-N-SH, SH-SY5Y, SW620, UIC-8, HIT29, SK-Mel-2, SK-Mel-28, U937, NB4 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (FBS was heat-inactivated for SK-Mel-28 cells). A375, B16F10, GL261, Neuro2A and U87 were

grown in DMEM supplemented with 10% FBS. KG1 were grown in IMDM supplemented with 20% FBS. FBS was replaced by steroid-free FBS one month before quantification of endogenous DDA.

Preparation of tissues and cell extracts. All human samples were collected with the approval of institutional review board of the Purpan University Hospital of Toulouse, France (Tumorothèque CHU Toulouse-Cancéropole Grand Sud-Ouest) and the Institut Claudius Regaud. Written informed consent was received prior to inclusion in this study. Human plasma was recovered from buffy-coat preparations from blood samples obtained at the Etablissement Français du Sang (Toulouse, France) from healthy donors. For mouse tissue homogenate preparation, the indicated organs from Balb/c mice (8 weeks old) were resected and kept at 4 °C to be prepared immediately. Normal and tumor human tissues obtained by surgical resection were stored frozen at -80 °C and thawed in ice before used. Patients' clinical characteristics and tumor pathological features were obtained from the medical reports and followed the standard procedures in our institution. Human and mouse tissues were homogenized at 4 °C in buffer A (50 mM Tris, 0.5% butylated hydroxytoluene (5mg/ml), 150 mM KCl, pH 7.4) (5 vol./g of tissue) with a Polytron B homogenizer and centrifuged 5 min at 2500 rpm. Mouse and human tissue homogenates, human plasma and bovine serum were diluted with buffer A to obtain samples at 10 mg protein/ml. To obtain cell extracts, cells were grown as described above and were washed with Ca²⁺ and Mg²⁺-free phosphate-buffered saline. Three independent batches of 10⁷ cells were prepared for each cell line. After harvesting, cells were homogenized in buffer A (vol/vol) in the presence of 0.5% butylated hydroxytoluene (5mg/ml) to obtain samples at 5 mg protein/ml.

Lipid extraction, HPLC purification and nano electrospray ionization (nano-ESI) mass spectrometry analysis. Tissues and cell homogenates were extracted as described previously³ and 0.1 µCi [¹⁴C]-DDA were added in separate experiments for determination of the yield of DDA extraction. The solvent was removed by gentle argon flux and the samples were dissolved in 200 µl MeOH, and first passed through a C18 Sep-Pak[®] cartridge (Waters) equilibrated with MeOH. HPLC purification was carried out as described for sDDA in the "supplementary information" section. The 18-21 min fractions of each sample were dried *in vacuo* and stored at -80 °C under Argon until use. The percentage recovery of [¹⁴C]-DDA during the purification was 91 ± 6 % relative to the amount of radioactivity recovered, establishing that the extraction procedure was adapted to DDA recovery. d7-DDA standard

was added to the purified fractions of interest to a final concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$. Blank injections with EtOH were carried out before sample analysis until no trace of the standards was detectable by MS to insure the absence of contamination. Mass spectrometry was performed using an LCQ ion-trap mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, CA). Nano electrospray analyses were carried out using a commercial nanospray ESI source (The Protein Analysis Co., Odense, Denmark) using glass capillaries (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) that were positioned using a stereomicroscope, directly at a distance of 1 mm from the entrance hole of the heated transfer capillary. The capillaries were palladium and gold-coated for electrical contact. The glass capillaries were filled with 5 μL of analyte solution. A nebulizer gas was not necessary in this spray mode. The nanospray needle voltage was set to 700 V. The heated transfer capillary was kept at a temperature of 150 $^{\circ}\text{C}$. Samples were analyzed in the positive ion mode. To avoid a possible alteration of the assay by drifts of the mass spectrometer during long time injection time in the ion trap, a simultaneous fragmentation of the internal standard and the analyte was done. This strategy was validated by a calibration curve. DDA (m/z 514) and deuterated d7-DDA (m/z 521) were fragmented simultaneously using the following parameters: parent ion mass, m/z 518, parent ion isolation width, 8 m/z ; collision energy, 33%. MS³ analysis of the DDA and deuterated DDA fragments at m/z 496 (Fig. S2) and m/z 503 (Fig. S5), was performed using the following parameters: parent ion mass, m/z 500; parent ion isolation width, 8 m/z ; collision energy, 45%. MS⁴ analysis of the DDA and deuterated DDA fragments at m/z 478 and m/z 485 was performed using the following parameters: parent ion mass, m/z 482; parent ion isolation width, 8 m/z ; collision energy, 50%. MS⁴ quantification of DDA was calculated from the m/z 424/431 ratio obtained by averaging 100 spectra. The software used for the analysis was Xcalibur 1.2 from Thermo Electron (San Jose, CA). sDDA and sC17 display different MS² profiles (Fig.S2 and S3 and Table S1). Peaks m/z 496 (sDDA and C17) and 367 (C17) were used to determine the relative amounts of each molecule in samples before quantification. HPLC purified fractions from mouse brain extracts were injected into the capillary for nanoESI experiments and submitted to MSn analysis for analytical purposes.

Quantification of DDA. Increasing concentrations of sDDA ranging from 0.5 to 5000 ng/ml containing 1000 ng/ml d7-DDA were analyzed by MS⁴. The ratio between peak areas of m/z 424 and 431 (from

sDDA and d7-DDA respectively) was monitored, and plotted versus the nominal DDA concentration. A calibration curve was constructed using a quadratic regression with 1/x weighting that was linear in the concentration range of DDA (Fig S4). HPLC fractions excluding the 18-21 min HPLC fractions from mouse brain homogenates without endogenous DDA trace were used as a quality control matrix. The 18-21 min HPLC fractions from tissue and cells homogenates containing d7-DDA were then submitted to nano-ESI analysis. Samples from three separate experiments were prepared and each sample was analyzed twice.

DDA neosynthesis assay. The evaluation of DDA biosynthesis was done with mouse brain tissue extracts as described above. Mouse brain homogenates (280 µg of proteins) were suspended in 140 µl buffer A and 10 µl acetonitrile (6.7%) containing 100 µM histamine and 20 µM [¹⁴C]-α-CE or [¹⁴C]-β-CE and incubated at 37°C for 5 min. The reaction was stopped by immersing the samples in ice-water and lipids were extracted using 1.5 ml chloroform/methanol (2:1) and 0.5 ml of H₂O was added. The organic layers were dried *in vacuo* and resuspended in 40 µl MeOH. Samples were applied to silica gel 60, 20 × 20 plates (Fluka, Germany) that had previously been heated for 1 h at 100°C and were developed using 6:3:2:2 EtOAc/Acetic Acid/Butanol/H₂O. After a 6 cm migration of the eluant, plates were dried and developed with Et₂O. The regions corresponding to authentic CE, CT and DDA standards were visualized using [¹⁴C]-CE, [¹⁴C]-CT and [¹⁴C]-DDA standards. Radioactive metabolites were visualized using a Storm apparatus (Molecular Dynamics) and quantified by densitometry with the software Imagequant 5.2 (Molecular Dynamics).

Melanin and tyrosinase assays. Tumor cells were treated for 24 h with the vehicle or DDA at the indicated concentration. Pellets of 3 × 10⁶ cells were used to measure melanin content⁴¹ or tyrosinase activity⁴² spectrophotometrically. The tyrosinase activity was measured during the first 10 min, and a correction for auto-oxidation of L-DOPA was made using L-DOPA in the enzyme buffer in the absence of cell lysates.

Tumor growth analysis. Exponentially growing B16F10 and TS/A cells were harvested, washed twice in PBS, and resuspended in PBS (35,000 cells in 150 μ l PBS). B16F10 and TS/A tumors were prepared by subcutaneous (s.c.) transplantation into the flanks of C57Bl/6 or BALB/c mice respectively. For chemotherapeutic experiments, on the day of transplantation, animals were treated with the indicated doses of either 1) dacarbazine administered intraperitoneally (i.p.), 2) DDA, C17 or vehicle administered subcutaneously (s.c.) or Tamoxifen (Tam) administered i.p. at the indicated doses and time. For therapeutic experiments, when the volume of tumors reached 50-100 mm³, animals were treated once a day s.c. with DDA or C17 or i.p. with dacarbazine or Tam at the indicated doses. Animals were examined daily and body weights were measured twice per week. In all the experiments, the tumor volume was determined by direct measurement with a caliper and was calculated using the formula $[\text{width}^2 \times \text{length}]/2$. The Kaplan-Meier method was used to compare the mice survival.

Histology and immunohistochemistry. Tumors were resected at the indicated time and either frozen in liquid nitrogen or fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin for histomorphological analyses. Melanin pigment was detected with Masson-Fontana's staining. For lipid staining, frozen sections were fixed in 10% neutral buffered formalin and then stained with Oil red O and counterstained with hematoxylin. Immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded tissue sections, using a specific hamster monoclonal to MFG-E8 antibody (4 μ g/ml). Immunostaining of paraffin sections was preceded by an antigen retrieval technique by heating in 10 mM citrate buffer, pH 6 with a microwave oven twice for 10 minutes each. After incubation with the antibody for 1 hour at room temperature, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal anti-hamster immunoglobulin antibody followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA) and then were counter-stained with hematoxylin. Negative controls were incubated in buffered solution without primary antibody. Immunohistochemical staining of the inflammatory infiltrate was carried out on paraffin-embedded tissue sections using several rat monoclonal antibodies directed against leukocyte-associated antigens. These antibodies were anti-CD3 (ready to use) and anti-CD11c (1:25) that was used on frozen sections to label DCs in the cellular infiltrates. For anti-CD3, immunostaining of paraffin sections was preceded by an antigen retrieval technique using the target retrieval solution S1700 (Dako)

in a 95°C water bath for 40 min. Following primary antibody incubation, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal secondary antibodies, followed by incubation with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA). Diaminobenzidine (DAB) chromogen solution was used to visualize the signal, and the sections were then counter-stained with hematoxylin.

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

References

1. Newman, J.W., Morisseau, C. & Hammock, B.D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **44**, 1-51 (2005).
2. de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5.6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEB5 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13520-5 (2010).
3. Kedjouar, B. et al. Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* **279**, 34048-61 (2004).
4. Porter, F.D. & Herman, G.E. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lipid Res* **52**, 6-34 (2011).
5. de Medina, P. et al. Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ* **16**, 1372-1384 (2009).
6. Payre, B. et al. Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol Cancer Ther* **7**, 3707-18 (2008).
7. Jordan, V.C. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer* **7**, 46-53 (2007).
8. Watabe, T. & Sawahata, T. Biotransformation of cholesterol to cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol via cholesterol alpha-epoxide (5alpha,6alpha-epoxycholestan-3beta-ol) in bovine adrenal cortex. *J Biol Chem* **254**, 3854-60. (1979).
9. Berrodin, T.J. et al. Identification of 5{alpha}.6{alpha}-Epoxycholesterol as a Novel Modulator of Liver X Receptor Activity. *Mol Pharmacol* **78**, 1046-58 (2010).

10. Song, C., Hiipakka, R.A. & Liao, S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* **66**, 473-9 (2001).
11. Meyer, D.J. & Ketterer, B. 5 alpha,6 alpha-Epoxy-cholestan-3 beta-ol (cholesterol alpha-oxide): A specific substrate for rat liver glutathione transferase B. *FEBS Lett* **150**, 499-502 (1982).
12. Watabe, T., Sawahata, T. & Horie, J. Evidence for the formation of a steroid S-glutathione conjugate from an epoxysteroid precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **87**, 469-75 (1979).
13. de Medina, P., Paillasse, M.R., Payre, B., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Synthesis of new alkylaminoxyesters with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **52**, 7765-77 (2009).
14. Brandes, L.J., Bogdanovic, R.P., Cawker, M.D. & LaBella, F.S. Histamine and growth: interaction of antiestrogen binding site ligands with a novel histamine site that may be associated with calcium channels. *Cancer Res* **47**, 4025-31 (1987).
15. Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, (John Wiley & Sons, Ltd, New York, 2002).
16. Herbst, R.S. et al. A phase IIIA trial of continuous five-day infusion of squalamine lactate (MSI-1256F) plus carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 4108-15 (2003).
17. Li, D., Williams, J.I. & Pietras, R.J. Squalamine and cisplatin block angiogenesis and growth of human ovarian cancer cells with or without HIF-2 gene overexpression. *Oncogene* **21**, 2805-14 (2002).
18. Williams, J.I. et al. Squalamine treatment of human tumors in nu/nu mice enhances platinum-based chemotherapies. *Clin Cancer Res* **7**, 724-33 (2001).
19. Sills, A.K., Jr. et al. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. *Cancer Res* **58**, 2784-92 (1998).
20. Gray, J.M. & Ziemian, I. Antiestrogen binding sites in brain and pituitary of ovariectomized rats. *Brain Res* **578**, 55-60 (1992).
21. Umetani, M. et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med* **13**, 1185-92 (2007).
22. Sato, H. et al. Oxysterol regulation of estrogen receptor alpha-mediated gene expression in a transcriptional activation assay system using HeLa cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1790-3 (2004).
23. de Medina, P., Favre, G. & Poirot, M. Multiple targeting by the antitumor drug tamoxifen: a structure-activity study. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **4**, 491-508 (2004).
24. de Medina, P. et al. The prototypical inhibitor of cholesterol esterification, Sah 58-035 [3-[decyldimethylsilyl]-n-[2-(4-methylphenyl)-1-phenylethyl]propanamide], is an agonist of estrogen receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 139-49 (2006).
25. Senff-Ribeiro, A., Echevarria, A., Silva, E.F., Sanches Veiga, S. & Oliveira, M.B. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Res* **13**, 465-71 (2003).
26. Schroepfer, G.J., Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* **80**, 361-554 (2000).
27. Moore, K.S. et al. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1354-8 (1993).
28. Sorensen, P.W. et al. Mixture of new sulfated steroids functions as a migratory pheromone in the sea lamprey. *Nat Chem Biol* **1**, 324-8 (2005).
29. Beattie, M.E., Veatch, S.L., Stottrup, B.L. & Keller, S.L. Sterol Structure Determines Miscibility versus Melting Transitions in Lipid Vesicles. *Biophys J* **89**, 1760-1768 (2005).
30. Lund, E. & Bjoerkhem, I. Down-regulation of hepatic HMG-CoA reductase in mice by dietary cholesterol: Importance of the DELTA.5 double bond and evidence that oxidation at C-3, C-5, C-6, or C-7 is not involved. *Biochemistry* **33**, 291-297 (1994).

18

31. Xu, F. et al. Dual roles for cholesterol in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14551-14556 (2005).
32. Björkhem, I. & Hansson, M. Cerebrotendinous xanthomatosis: An inborn error in bile acid synthesis with defined mutations but still a challenge. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 46-49 (2010).
33. Villablanca, E.J. et al. Tumor-mediated liver X receptor- α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* **16**, 98-105 (2010).
34. Bensinger, S.J. et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* **134**, 97-111 (2008).
35. Fuda, H., Javitt, N.B., Mitamura, K., Ikegawa, S. & Strott, C.A. Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *J Lipid Res* **48**, 1343-52 (2007).
36. Chen, W., Chen, G., Head, D.J., Mangelsdorf, D.J. & Russell, D.W. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* **5**, 73-9 (2007).
37. Nalbandian, G. & Kovats, S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res* **31**, 91-106 (2005).
38. Nalbandian, G., Paharkova-Vatchkova, V., Mao, A., Nale, S. & Kovats, S. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J Immunol* **175**, 2666-75 (2005).
39. Nanni, P., de Giovanni, C., Lollini, P.J., Nicoletti, G. & Prodi, G. TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* **1**, 373-80 (1983).
40. Szatmari, T. et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* **97**, 546-53 (2006).
41. Lee, J. et al. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Br J Dermatol* **157**, 242-8 (2007).
42. Ando, H. et al. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J Lipid Res* **40**, 1312-6 (1999).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Conseil Régional Midi-Pyrénées, the Ministère Français de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur through the GenHomme project and a predoctoral fellowship (G.S.), and Affiehem. S.S.-P. is in charge of research at the Centre National de la Recherche Scientifique.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

P.D.M., S.S.-P. and M.P. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper and, M.R.P., G.S., M.V., L.M., F.D., M. L.-T., F.P., T.A.S. performed experiments

COMPETING INTEREST STATEMENTS

P.deM., M.R.P. and L.M. are employees of the company Affichem of which S.S.-P. and M.P. are founders.

Figure Legends

Figure 1. Characterization of DDA in mouse brain homogenates

(A) HPLC profile from a total mouse brain extract. The extraction of sterols and HPLC separation were performed as described in the “Methods” section. Arrows indicate peaks corresponding to the authentic standards: histamine (His), synthetic dendrogenin A (sDDA), cholestane-triol (CT) and cholesterol-5,6-epoxide (CE). (B) The fractions collected between 18 and 21 min from HPLC purification of the mice brain extract were submitted to nano electrospray ionization (nanoESI) mass spectrometry fragmentation (MS^1) and resulted in a molecular ion of $[M+H]^+$ (m/z 514) obtained in MS^1 . (C) MS^2 fragmentation of the $[M+H]^+$ (m/z 514). (D) MS^3 fragmentation of the (m/z 496) peak obtained in MS^2 . (E) MS^4 fragmentation of the (m/z 478) peak obtained in MS^3 .

Figure 2. Formation of DDA from the reaction of histamine with α -CE in the presence of brain extracts.

(A) 20 μ M [14 C]- α -CE or [14 C]- β -CE were incubated for 5 min at 37°C with mouse brain homogenates in the presence of 100 μ M histamine. Lipids were extracted and analyzed by TLC. A representative autoradiogram from three independent experiments is shown: lane 1 and lane 2 correspond to the reaction with [14 C]- α -CE and [14 C]- β -CE, respectively. Radioactive metabolites were identified by co-migration with radiolabeled standards and quantified by densitometric analysis. The migration of authentic [14 C]-labeled standards is indicated. (B) Schemes describing the transformation of α -CE and β -CE in the presence of histamine and brain extracts.

Figure 3. Determination of the concentrations of endogenous DDA in mammalian tissues, fluids and breast tumors.

(A) Quantification of endogenous DDA purified from human, mouse and bovine tissue extracts was performed by nanoESI mass spectroscopy by determining the under peak-area ratio of DDA (m/z 424) and d7-DDA (m/z 431), which was used as an internal standard. The peaks were obtained on MS⁺ spectra and quantifications were performed as described in the “Supplementary information” section. Concentrations were calculated from the mass of tissue assuming that 1 g of tissue corresponded to 1 ml of water. Values are the means from three independent samples analyzed twice. N.M.: not measurable, below the lowest values of the calibration curve. (B) Quantification of endogenous DDA from human breast tumors and adjacent normal tissues from 10 patients was performed as described in (A). Each symbol represents the mean concentration of DDA determined in each normal or tumor sample that was analyzed twice. The black lines indicate the group sample mean \pm SEM, * $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

Figure 4. DDA is the most potent natural inhibitor of ChEH.

(A) Concentration-dependent inhibition of ChEH in intact MCF-7 cells by DDA, which shows that DDA is a potent inhibitor of ChEH whereas its regio-isomer C17 was ineffective. Cells were incubated with 0.6 $\mu\text{mol/l}$ [¹⁴C]- α -CE for 8 h with or without DDA (\blacktriangle) or C17 (\blacksquare) at the indicated concentrations. ChEH activity was assayed by measuring the conversion of [¹⁴C]- α -CE to [¹⁴C]-CT by TLC and quantified by densitometric analysis. On the left panel, a representative autoradiogram of a TLC run from three independent experiments; on the right panel, the dose-response curves of the inhibition of [¹⁴C]-CT formation by TLC. The curve represents the mean \pm SEM of three independent experiments and was used to calculate the IC₅₀. (B) Modality of ChEH inhibition by DDA. The relationship between the conversion rates of α -CE to CT and DDA concentrations is shown using 0.5, 1 and 5 $\mu\text{mol/l}$ DDA with rat liver microsomal ChEH. A double reciprocal plot of velocity versus [¹⁴C]- α -CE at the given DDA concentrations is presented. (C) IC₅₀ values of the inhibition of ChEH activity in MCF7 cells by

different natural oxysterols; 7 α -hydroxycholesterol (7- α -OHCh), 7-ketocholesterol (7-kCh) and 25-hydroxycholesterol (25-OHCh) were calculated as in (A) and are the mean + SEM of three independent experiments. (D) DDA inhibits ChEH activity in different cell lines. IC₅₀ values were calculated as in (A) from the dose-response curves of the inhibition of CT formation by DDA or C17 in different tumor cells and is the mean + SEM of three separate experiments. (E) Measurement of ER-dependent transcriptional activity in MELN cells. Cells were incubated with the solvent vehicle (control), 10 nM E2 or increasing concentrations of DDA with or without 10 nM E2 or 1 μ M Tam with 10 nM E2.

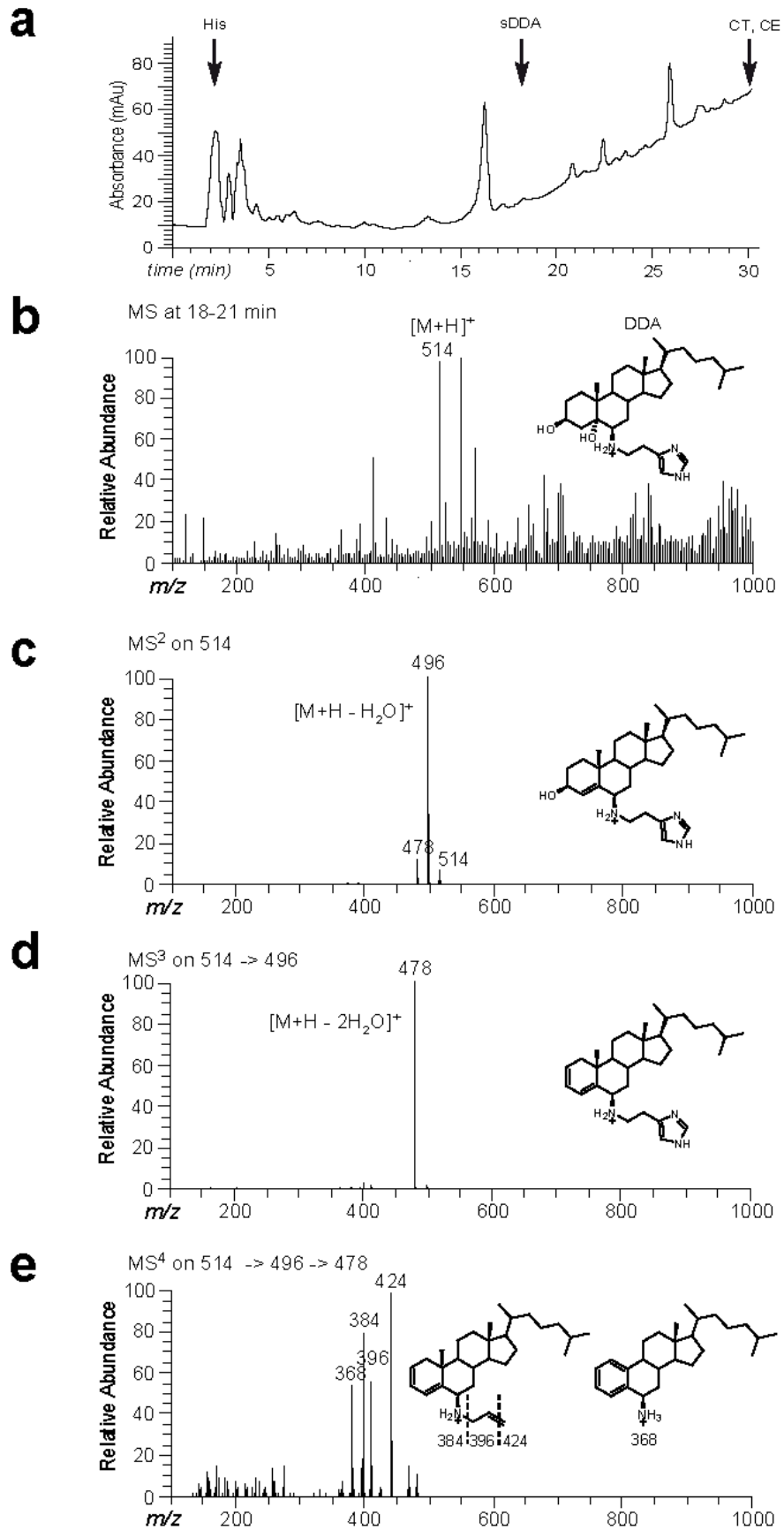
Figure 5. DDA inhibited the growth of B16F10 melanoma and TS/A mammary tumors implanted into immunocompetent mice and enhanced animal survival.

Immunocompetent mice were implanted s.c. with (A) B16F10 cells or (C) TS/A cells and animals (n = 10) were treated every five days starting the day of tumor implantation with the indicated doses of either dacarbazine (i.p.), DDA (s.c.), C17 (s.c.), vehicle (s.c.) or Tam (i.p.). Animals were monitored for tumor growth (A and C). * P < 0.05; ** P < 0.01 (ANOVA, Dunnett's post-test) and survival (B and D). * P < 0.05; *** P < 0.0001 (log-rank tests). Immunocompetent mice were implanted s.c. with (E) B16F10 cells or (F) TS/A cells, and when the tumor reached a volume of 50-100 mm³, animals (n = 10) were treated once per day with the indicated doses of dacarbazine (i.p.), DDA (s.c.), C17 (s.c.), vehicle (s.c.) or Tam (i.p.) and were monitored over time for tumor growth, *P < 0.05; **P < 0.01 (ANOVA, Dunnett's post-tests). The mean tumor volume \pm SEM is shown. The data are representative of three independent experiments.

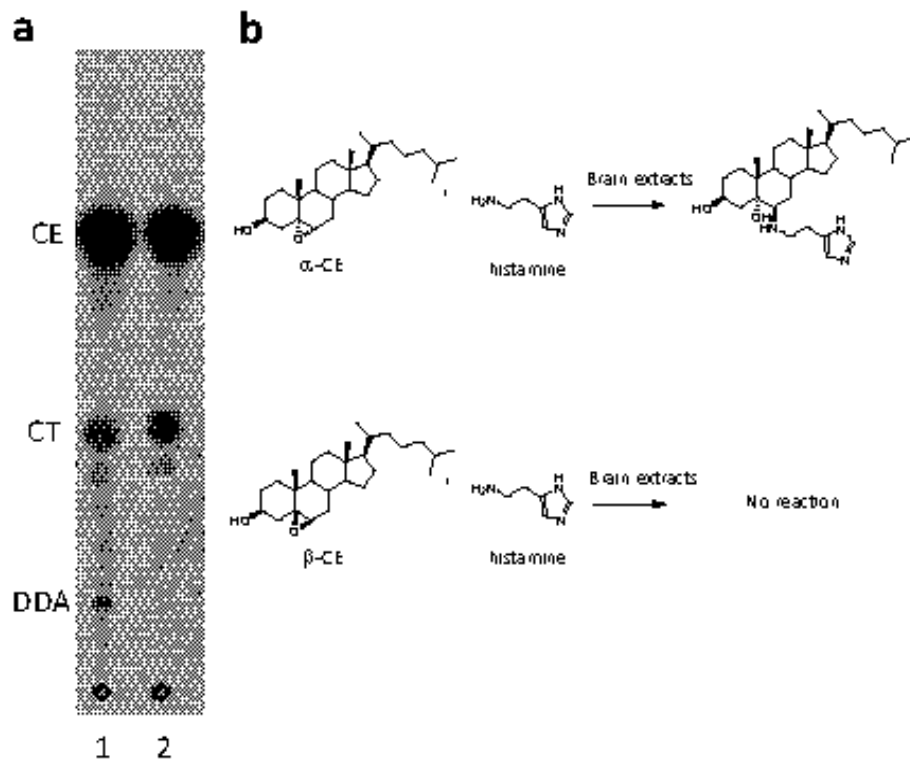
Figure 6. DDA treatment induced *in vivo* differentiation of B16F10 and TS/A tumors implanted into immunocompetent mice.

Histology of tumors resected from immunocompetent mice treated with vehicle (left panels) or DDA (3.7 μ g/kg) (right panels) and stained for specific markers of cell differentiation. (A) B16F10 tumor

sections from mice treated for 23 days were analyzed for melanin production with Masson-Fontana staining (black labeling). (B) TS/A tumor sections from mice treated for 30 days were analyzed for MFG8 expression with a specific antibody (brown staining) and for neutral lipid production by Oil Red O staining (red labeling). Magnification is 200x.



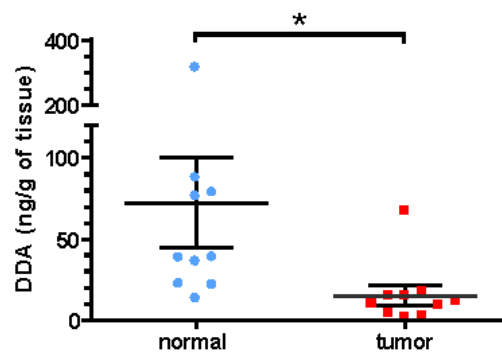
Poirot figure 1



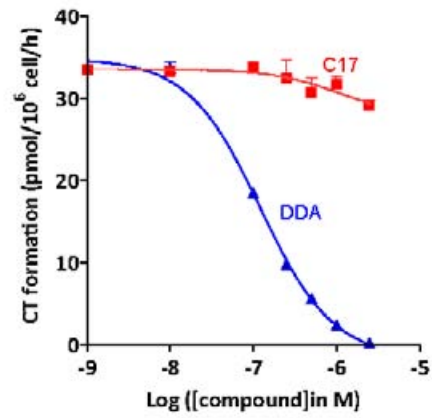
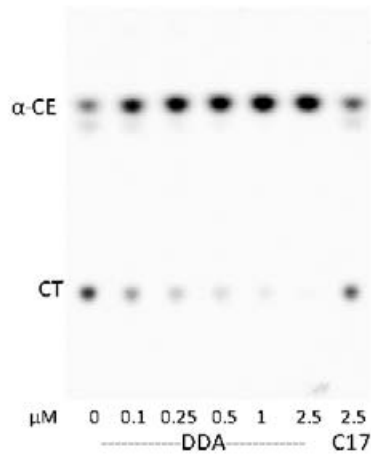
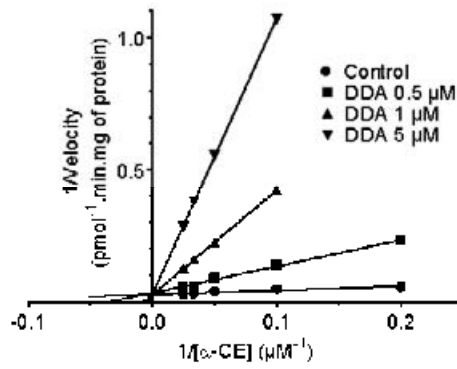
Poirot figure 2

a

Tissues/fluids	Concentration in DDA		
	ng/g tissue	nM	ng/mg protein
Brain (M)	46 ± 7	87 ± 14	1.06 ± 0.17
Liver (M)	263 ± 49	485 ± 92	3.16 ± 0.60
Lung (M)	36 ± 7	65 ± 13	0.54 ± 0.11
Spleen (M)	112 ± 1.7	207 ± 31	1.51 ± 0.22
Spleen (H)	68 ± 9	126 ± 16	0.76 ± 0.10
Foetal Serum (B)	3.1 ± 0.6	6.2 ± 1.3	0.07 ± 0.01
Charcoal-treated FBS	N.M.	N.M.	N.M.
Plasma (H)	1.4 ± 0.5	2.8 ± 1.0	0.05 ± 0.04

b

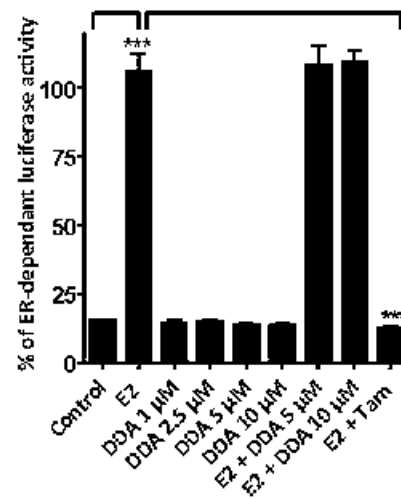
Poirot figure 3

a**b****c**

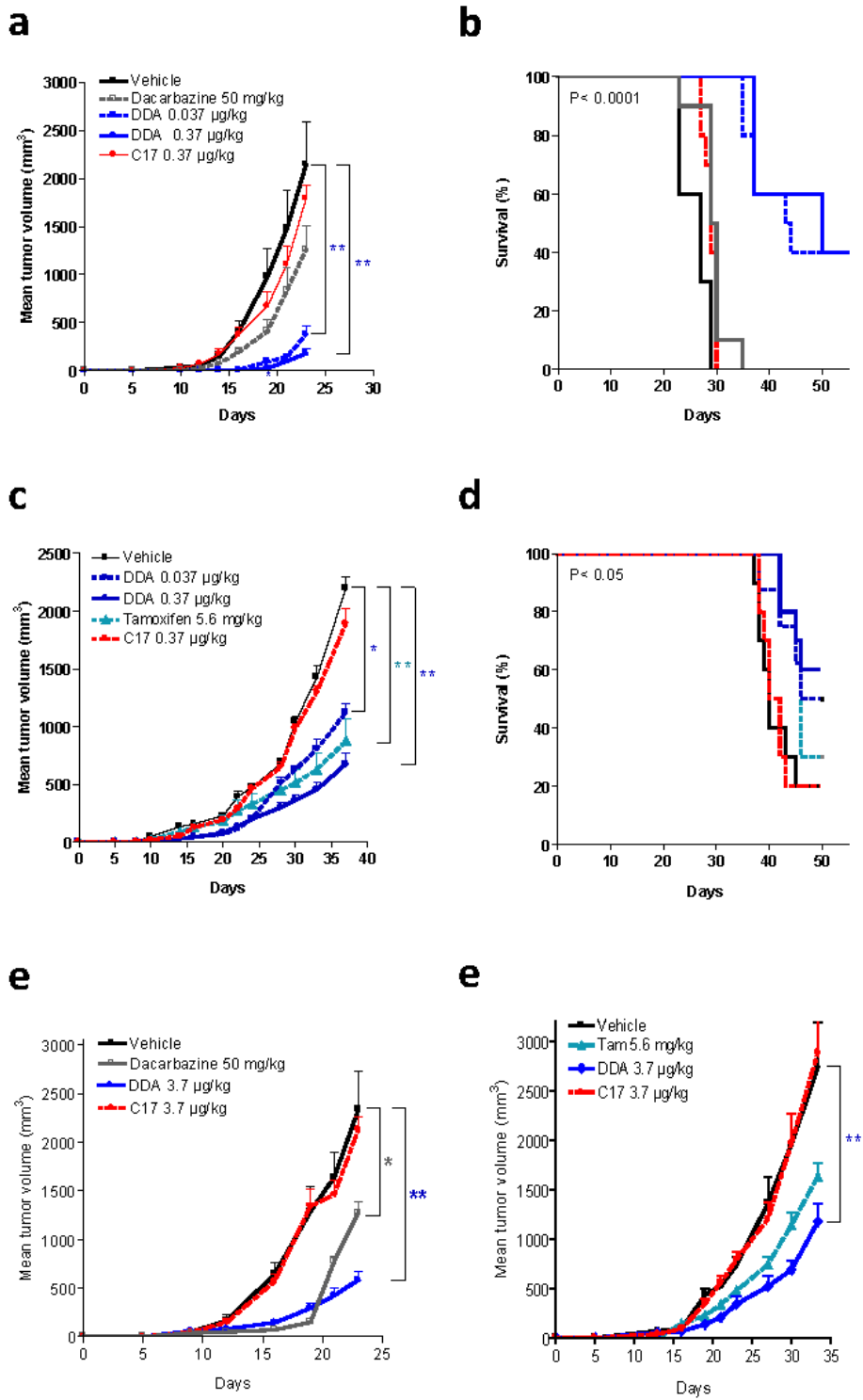
Compounds	IC_{50} (nM)
7- α -OHCh	12 200 \pm 2900
7-kCh	5 090 \pm 1400
25 OHCh	N.M.

d

Cell lines	IC_{50} (nM)	
	DDA	C17
MCF7	120 \pm 20	N.M.
TS/A	284 \pm 70	N.M.
SKMEL 28	72 \pm 15	N.M.
B16F10	252 \pm 81	N.M.

e

Poirot figure 4

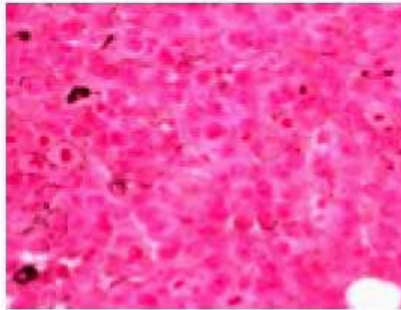


Poirot figure 5

a

Control

DDA

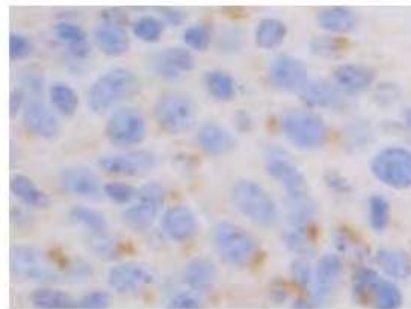
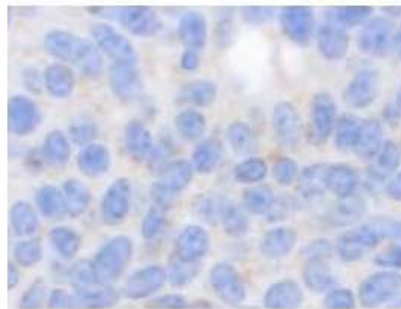


Fontana

b

Control

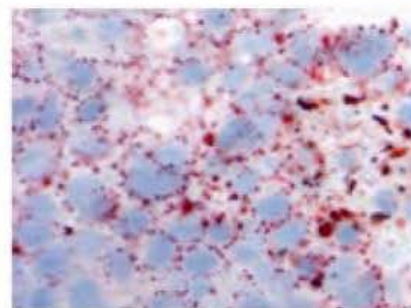
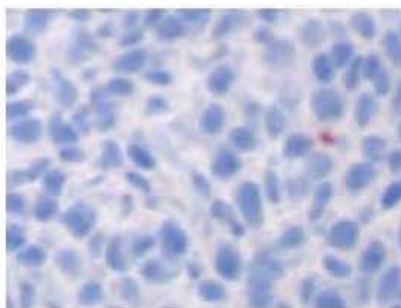
DDA



MFGE8

Control

DDA



ORO

Poirot figure 6

Supplementary information

Dendrogenin A: an endogenous mammalian conjugation product of cholesterol-5,6- α epoxide and histamine that triggers anti-tumor activities

Philippe de Medina, Michael R. Paillasse, Gregory Segala, Maud Voisin, Loubna Mhamdi, Florence Dalenc, Magali Lacroix-Triki, Frédéric Pont, Talal Al Saati, Sandrine Silvente-Poirot and Marc Poirot

Supplementary experimental procedures

Chemical synthesis.

[25,26,26,26,27,27,27- d_7]-5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 β -ol (d7-DDA): d7-DDA was synthesized according to the previously published procedure using [25,26,26,26,27,27,27- d_7]-cholesterol instead of cholesterol¹. The crude product was purified by column chromatography using triethylamine-deactivated silica and eluted with 0-10% methanol in an EtOAc gradient to give the expected product as a light yellow powder (3.5 mg, 35%). d7-DDA was further purified by HPLC using an acetonitrile gradient (40% B for 8 min, then to 100% B in 20 min; A was 95:5 water/acetonitrile, 0.1% TFA; B was 95:5 acetonitrile/water 0.1% TFA) with a retention time of 18.5 min, a mass with the expected molecular ion (m/z 521.5 [M+H]⁺) and a purity > 98%.

[4-¹⁴C]-5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 β -ol ([¹⁴C]-DDA): A mixture of [¹⁴C]-Cholesterol (58 Ci/mol; 100 μ Ci; 1.7 μ mol) and meta-chloro perbenzoic acid (*m*CPBA) (0.7 mg/ml) in 100 μ l dichloromethane were stirred for 5 hours. The reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with sodium sulfite, potassium carbonate and brine. The product was filtered through a column filled with silica inactivated with triethylamine and equilibrated with ethyl acetate with a 1:1 mixture MeOH-ethyl acetate. The eluate was evaporated and the residue was resuspended in MeOH and passed through a C18 Sep-Pack cartridge pre-equilibrated with MeOH. The solvent was evaporated and the crude product was purified by HPLC through isocratic conditions 95:5 methanol/water. [¹⁴C]- α -CE had a retention time of 51 min (43 μ Ci; 43 %). [¹⁴C]- β -CE has a retention time of 32 min (14.5 μ Ci, 14.5 %). [¹⁴C]- α -CE (58 Ci/mol; 30 μ Ci; 0.52 μ mol) and histamine (3 eq) in *n*BuOH (10 μ l) were refluxed for 3 days. The mixture was evaporated under reduced pressure and resuspended in 40 μ l of ethanol and then purified by HPLC using the method used for d7-DDA to give [¹⁴C]-DDA (7.0 μ Ci; 23 %) with a purity > 98%.

ChEH activity assays.

ChEH enzyme assays were performed as previously described². Briefly, cell lysates (150 μ g of protein) were suspended in 140 μ l buffer A and 10 μ l acetonitrile (6.7%) containing DDA and [¹⁴C]- α -CE at the indicated concentrations and incubated at 37°C for 9 min. The reaction was stopped by immersing the samples in ice-water and lipids extracted using 1.5 ml chloroform/methanol (2:1). The organic layers were dried *in vacuo* and resuspended in 40 μ l ethanol. Samples were applied to silica gel 60, 20 \times 20 plates (Fluka, Germany) that had previously been heated for 1 h at 100°C and

were developed using ethyl acetate. Radioactive metabolites were visualized as described above. α -CE had an $R_F = 0.67$ and CT had an $R_F = 0.25$. For whole cell ChEH assays, 24 hours after seeding in 6-well plates (100 000 cells/well), cells were pre-treated for 30 min with the indicated compound and then treated for 8 h with [14 C]-cholesterol (0.1 μ Ci/ μ l–2 μ l/dish). After incubation, cells were washed, scraped and neutral lipids were extracted with chloroform/methanol (2/1, v/v) and the samples were analysed as described above for cell lysates.

Estrogen-dependent luciferase assays.

MELN cells expressing luciferase in an estrogen-dependent manner were grown for 5 days in phenol red-free medium, containing 5% dextran-coated charcoal treated FBS, and luciferase assays were carried out as described in ³.

Immunocytochemistry studies.

Tumor cells were plated on sterile coverslips in complete medium at 50% confluency and the next day treated for 24 h at 37 °C with the vehicle or DDA at the indicated concentrations. Cells were then fixed with a methanol/acetone solution (1:1) for 15 s and nuclei stained with propidium iodide as described in ⁴. After washing, cells were incubated for 1 h at 37 °C with a primary antibody against MFGE8 (1:100) and then with a secondary anti-fluorescein-conjugated antibody (1:100) for 1 h at 37 °C. The slides were then washed with PBS and mounted with Moviol 4-88 reagent (Calbiochem). Cells were observed using confocal fluorescence microscopy (Leica DMRE). Images were prepared using a Zeiss LSM Image Viewer.

Flow cytometry studies.

Cells (250,000) were seeded onto 100-mm plates and the next day treated for 24 h with vehicle or DDA at the indicated concentrations. Cells were then washed, fixed with 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.05% saponin in PBS containing 1% BSA for 10 minutes. Cells were incubated at 4°C for 1 h with primary antibodies against MFGE8 (1:500) or control isotypes (1:100) and then with secondary antibodies (1:500). Cells were then washed and analyzed using flow cytometry.

Oil red O staining and neutral lipid quantification.

For Oil Red O (ORO) staining and quantification, tumor cells were grown on glass coverslips and were then treated for 24 h with the vehicle or DDA at the indicated concentration. Cells were then fixed with 3.7% paraformaldehyde for 1 h at room temperature followed by washing twice with PBS. ORO staining and quantification was done exactly as described before ⁴. Cells were observed by light microscopy (Nikon Diaphot). For triglyceride quantification, 5 million cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of DDA or the vehicle. Cells were then washed three times with PBS. Lipids were extracted and triglycerides were analyzed as described ⁴.

Supplementary references:

1. de Medina, P., Paillasse, M.R., Payre, B., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **52**, 7765-77 (2009).

2. de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13520-5 (2010).
3. de Medina, P. et al. The prototypical inhibitor of cholesterol esterification, Sah 58-035 [3-[decyldimethylsilyl]-n-[2-(4-methylphenyl)-1-phenylethyl]propanamide], is an agonist of estrogen receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 139-49 (2006).
4. Payre, B. et al. Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol Cancer Ther* **7**, 3707-18 (2008).

Supplementary tables S1 and S2

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

<i>m/z</i>	DDA	C17
514	6.5	2.6
497		28.3
496	100	7.6
478	12.3	2.2
396	0.7	
385		49.5
368	1.5	
367		100
159		12.6

Table S2, Quantification of endogenous DDA in tumor cells. Quantification of DDA was done by nanoESI mass spectroscopy, by determining the under peak-area ratio of DDA (m/z 424) and d7-DDA (m/z 431) used as internal standard. These peaks were obtained on MS⁺ spectra (Figure S2 and S4) and quantification was achieved according to the equation obtained from the calibration curve drawn on Figure S5. Studies were done with three different samples analyzed twice. N.M = no measurable detection of DDA.

Cell line	Cell type	Concentration in DDA
B16F10	Melanoma, mouse	N.M.
SK-MEL-28	Melanoma, human	N.M.
SK-MEL-2	Melanoma, human	N.M.
A375	Melanoma, human	N.M.
MCF-7	Breast carcinoma, human	N.M.
TS/A	Breast carcinoma, mouse	N.M.
A549	Lung carcinoma, human	N.M.
SK-N-SH	Neuroblastoma, human	N.M.
SH-SY5Y	Neuroblastoma, human	N.M.
Neuro2A	Neuroblastoma, mouse	N.M.
U87	Glioma, human	N.M.
GL261	Glioma, mouse	N.M.
U937	Monocyte leukemia, human	N.M.
NB4	Promyelocytic leukemia, human	N.M.
KG1	Acute myeloid leukemia, human	N.M.
HT29	Colon carcinoma, human	N.M.
HCT-8	Colon carcinoma, human	N.M.
SW 620	Intestinal carcinoma, human	N.M.

Supplementary figures S1 to S9

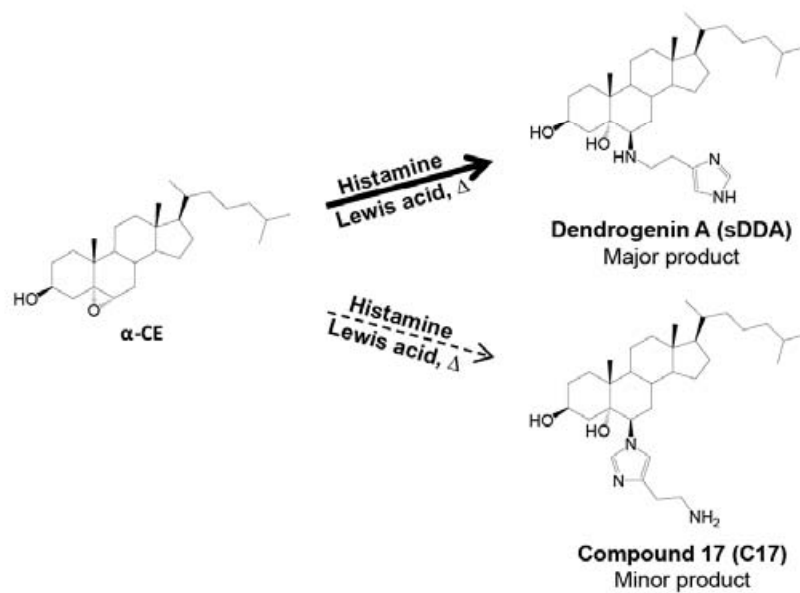


Figure S1, Scheme describing the chemical synthesis of DDA under catalytic conditions

The reaction of α -CE with histamine was possible in the presence of a catalyst to give DDA as the major product and C17 as a minor product as previously published¹.

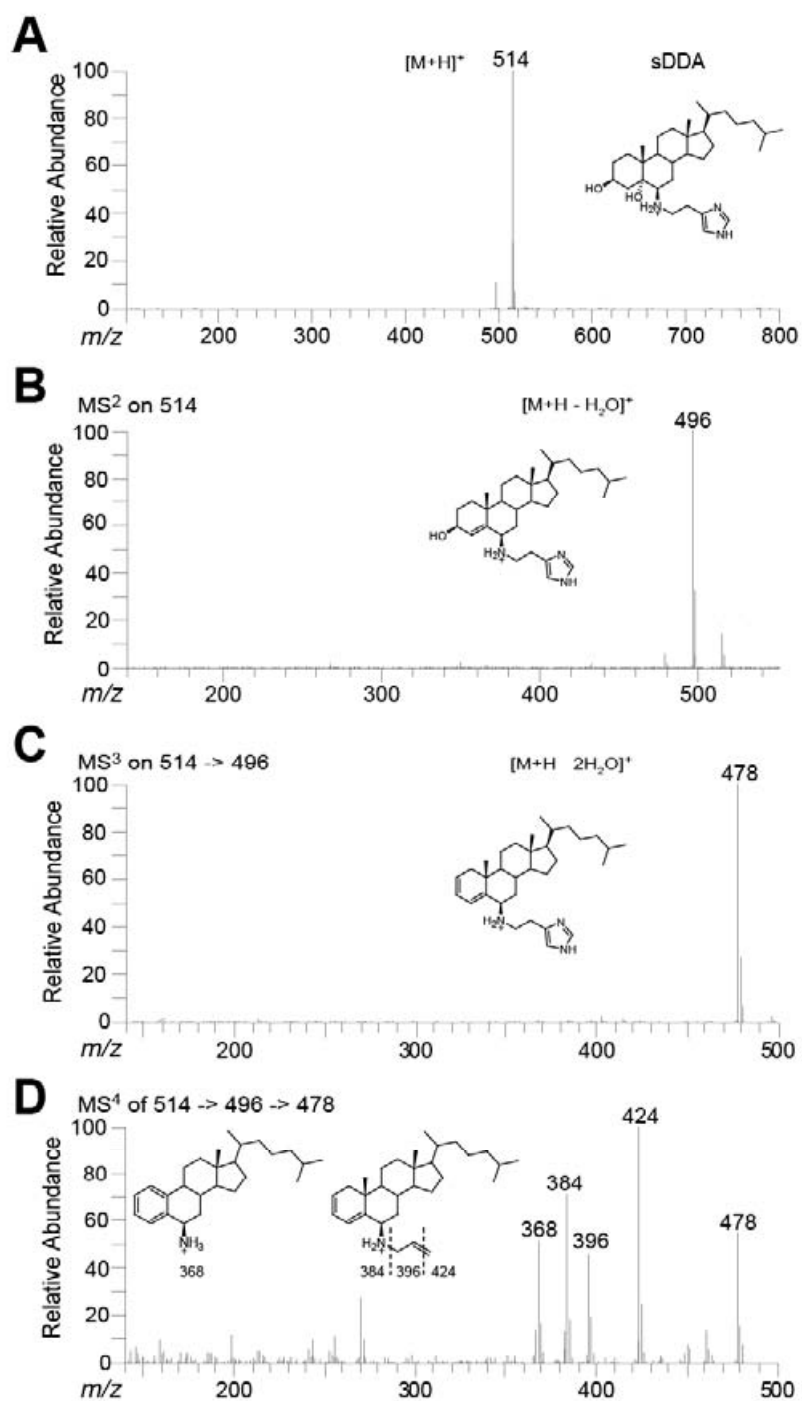


Figure S2, nanoESI fragmentation of synthetic DDA (sDDA).

(A) NanoESI Mass spectrometry fragmentation (MS¹) profile of sDDA and chemical structure of sDDA. (B) MS² fragmentation of the $[M+H]^+$ (m/z 514) peak obtained in MS¹. (C) MS³ fragmentation of the (m/z 496) peak obtained in MS². (D) MS⁴ fragmentation of the (m/z 478) peak obtained in MS³.

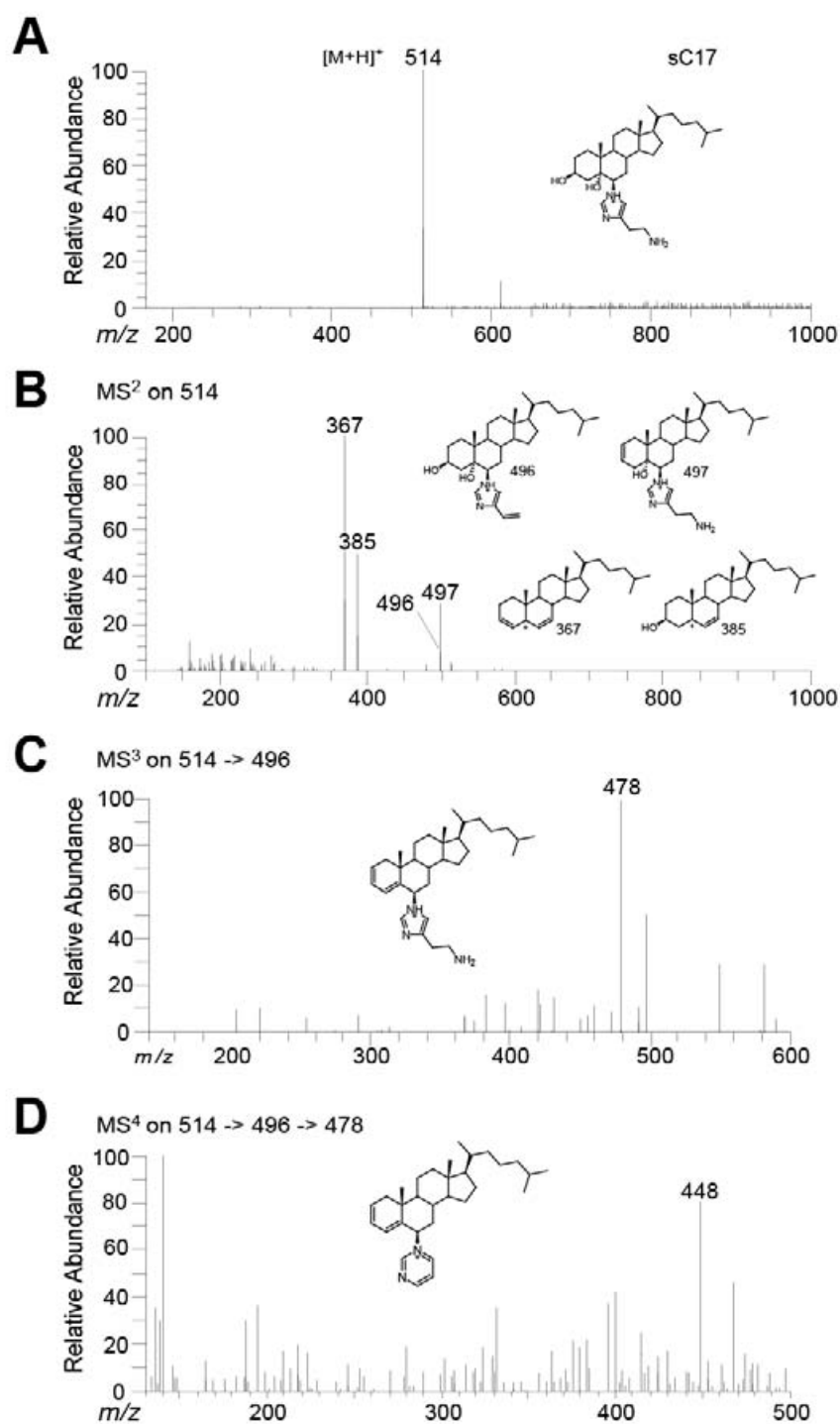


Figure S3, nanoESI fragmentation profiles of synthetic C17 (sC17). (A) nanoESI Mass spectrometry fragmentation (MS¹) profile of C17 and chemical structure of C17. (B) MS² fragmentation of the $[M+H]^+$ (m/z 514) peak obtained in MS¹. (C) MS³ fragmentation of the (m/z 496) peak obtained in MS². (D) MS⁴ fragmentation of the (m/z 478) peak obtained in MS³.

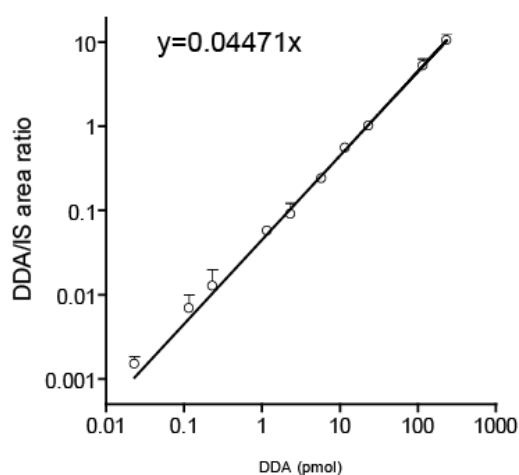


Figure S4, Calibration curve for quantification of DDA.

MS⁴ nanoESI mass spectrometry was used to determine m/z 424 (DDA) (Figure S2) over 431 (d7-DDA (Figure S5) used as internal standard (IS)) ratios. Increasing concentrations of DDA were used with a constant IS concentration to obtain the calibration curve.

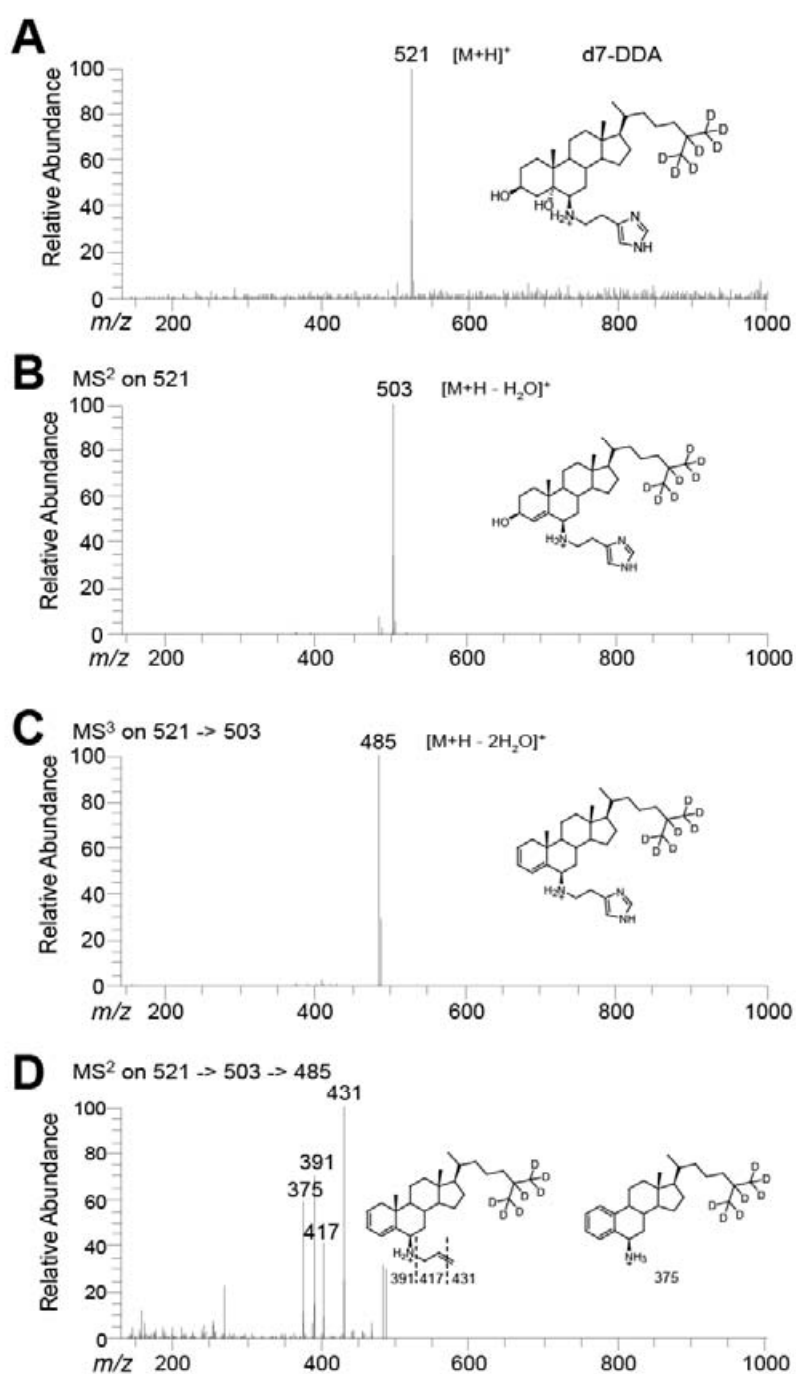


Figure S5, nanoESI fragmentation profiles of d7-DDA.

(A) nanoESI Mass spectrometry fragmentation (MS¹) profile of d7-DDA and chemical structure of d7-DDA. (B) MS² fragmentation of the [M+H]⁺ (*m/z* 521) peak obtained in MS¹. (C) MS³ fragmentation of the (*m/z* 503) peak obtained in MS². (D) MS⁴ fragmentation of the (*m/z* 485) peak obtained in MS³.

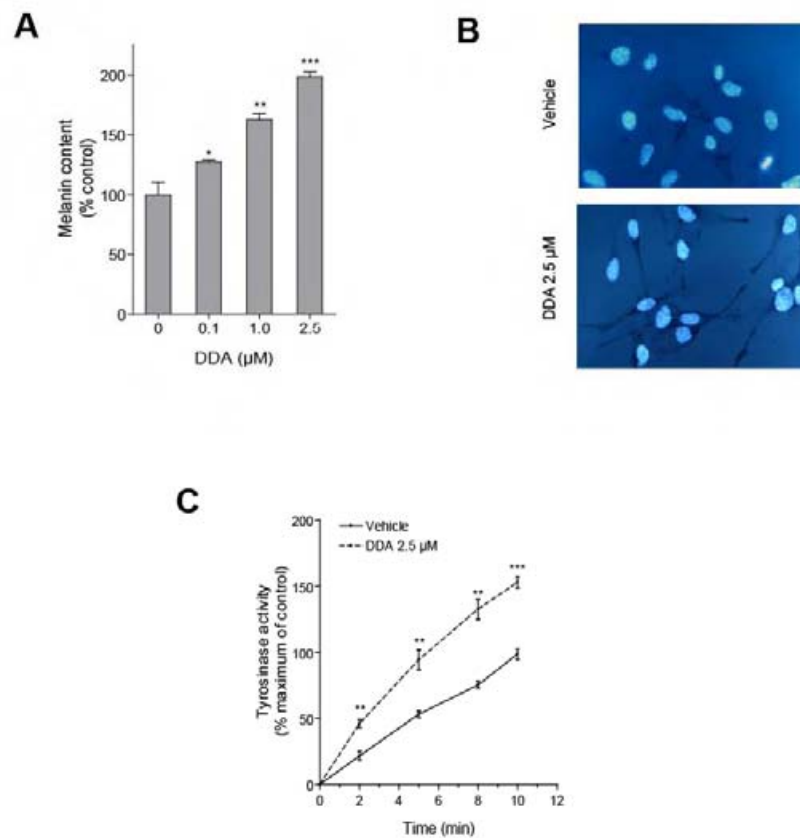


Figure S6, DDA induces B16F10 cell differentiation *in vitro*.

Cells were treated for 24 h with vehicle or the indicated concentrations of DDA. (A) DDA stimulated melanin biosynthesis in cells in a concentration-dependent manner and the appearance of melanin containing vesicles (B) and increased the tyrosinase activity (C). The melanin content is expressed as the percentage of the control; tyrosinase activity was measured as reported in the "Methods" section. Results are the mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate.

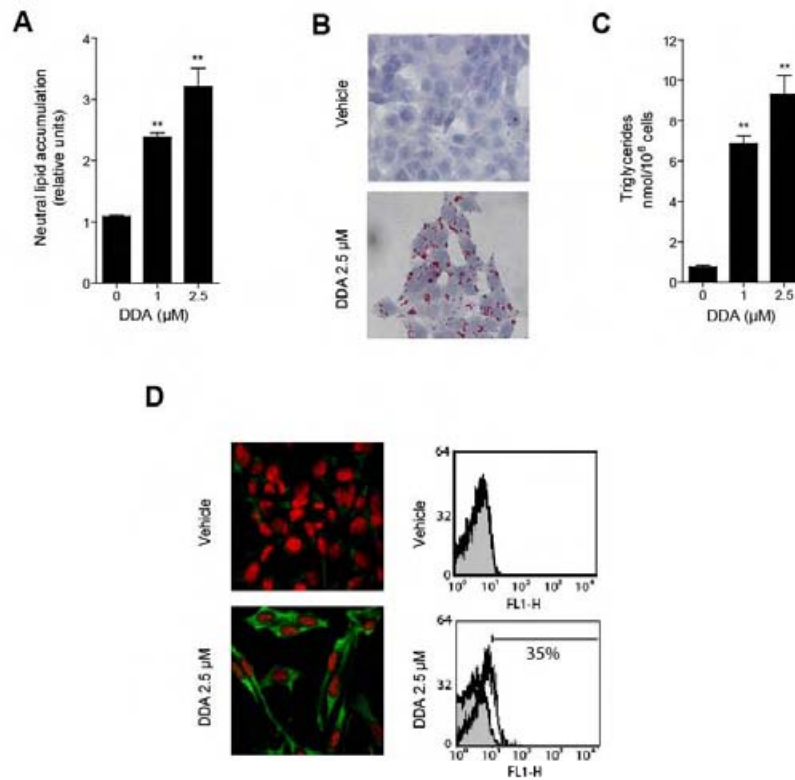


Figure S7, DDA induces TS/A cell differentiation *in vitro*.

TS/A cells were treated for 24 h with the vehicle or the indicated concentrations of DDA: Neutral lipids were stained with ORO and (A) quantified after extracting the ORO-stained cells by measuring the absorbance at 492 nm and (B) ORO-stained cells were observed with light microscopy ($\times 25$) after counterstaining with Mayer's hematoxylin; (C) triglycerides were quantified. (D) MFGE8 was analyzed by confocal fluorescence microscopy ($\times 63$) using an anti-MFGE8 antibody and a fluorescein-labeled anti-mouse secondary antibody and the nuclei were stained with propidium iodide (left panel); its expression was quantified by flow cytometry with an anti-MFGE8 antibody (white peaks) or control isotype (grey peaks). Values indicated in the panel are the percentage of cells positive for the antibody relative to the isotype staining. Data are representative of three independent experiments.

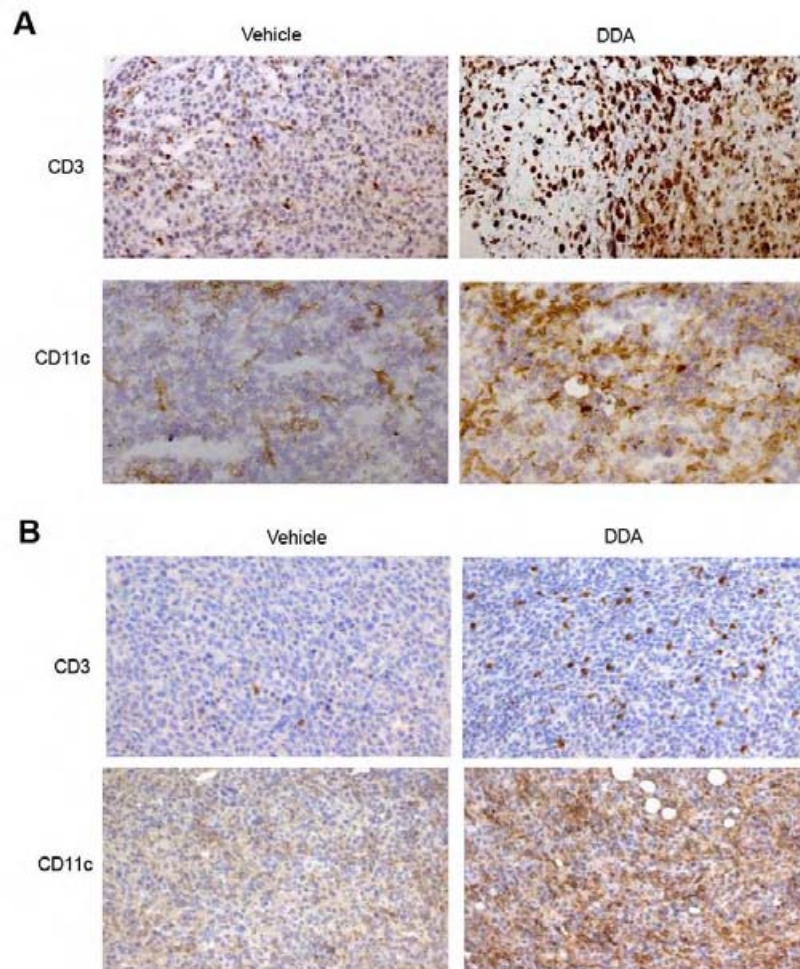


Figure S8, DDA induces intratumor immune cell infiltration in B16F10 and TS/A tumors implanted into immunocompetent mice.

Histology of established tumors resected from immunocompetent mice treated with vehicle (left panels) or DDA (3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (right panels). (A) B16F10 tumor sections from mice treated for 23 days and (B) TS/A tumors from mice treated for 30 days were analyzed for T lymphocytes (CD3) and DCs (CD11c) (brown staining) tumor infiltration using specific antibodies.

DISCUSSION

Nous montrons dans cette étude que la DDA est naturellement présente dans des tissus murins et humains. De façon intéressante, la DDA n'est pas présente dans des lignées cellulaires cancéreuses et sa concentration est fortement diminuée dans des tumeurs de patients. Le traitement de cellules cancéreuses ou de tumeurs avec la DDA peut donc être assimilé à une complémentation métabolique puisqu'on apporte un métabolite qui a été perdu partiellement ou totalement au cours de l'oncogenèse. Nous avons montré *in vivo* que le traitement par la DDA de souris dans lesquelles nous avons implanté des tumeurs diminue considérablement la croissance des tumeurs et augmente la survie des souris. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la DDA puisse être un métabolite suppresseur de tumeur dont le métabolisme est affecté au cours de l'oncogenèse. Nos données suggèrent fortement qu'une enzyme est responsable de la production de la DDA. En effet, la production de DDA à partir de CE α et d'histamine ne se fait que dans des conditions catalytiques. Aussi la production de DDA est observée lorsque le CE α et l'histamine sont incubés en présence d'extrait de cerveau de souris. En revanche, le traitement préalable des extraits de cerveau de souris par la chaleur ou par la protéinase K ne permet pas la production de DDA ce qui suggère qu'une protéine présente dans le cerveau des souris produit la DDA. Pour approfondir nos connaissances à ce sujet, il est donc nécessaire que nous identifions l'enzyme qui produit la DDA. L'identification de cette enzyme putative pourra permettre de caractériser si son expression ou sa fonctionnalité sont affectées dans les cellules cancéreuses et dans les tumeurs, ce qui pourrait expliquer la diminution voire l'absence de la DDA. La caractérisation du métabolisme de la DDA comme par exemple sa catabolisation ou son transport intracellulaire pourrait aussi permettre de comprendre la diminution de sa concentration dans les tumeurs et son absence dans les lignées cellulaires cancéreuses.

Des analyses histologiques des tumeurs traitées avec la DDA montrent une induction de la différenciation des cellules cancéreuses constituant la tumeur ce qui concorde avec les résultats que nous avons obtenu sur des cellules cancéreuses en culture. Nous avons aussi observé que la DDA stimule l'infiltration de cellules dendritiques et de lymphocytes T dans les tumeurs, ce qui favoriserait une réponse immunitaire anti-tumorale. Cette observation pourrait être expliquée par le ciblage des LXRs par la DDA que nous avons montré dans l'article 1. En effet, les LXRs sont impliqués dans le contrôle du système immunitaire. Notamment, ils contrôlent la maturation des cellules dendritiques en régulant l'expression de la fascine qui est une protéine du cytosquelette responsable de la formation de la synapse

immunologique⁴²³. Récemment, il a été montré que les LXRs régulent la mobilité des cellules dendritiques dans les tumeurs. Le groupe de Vincenzo Russo a établi que les cellules tumorales produisent des oxystéroïdes qui agissent de façon paracrine au sein de la tumeur en inhibant l'expression de CCR7 (CC Chemokine Receptor-7) via le LXR α dans les cellules dendritiques infiltrées²⁶⁴. L'inhibition de CCR7 empêche le retour des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques pour activer une réponse immunitaire anti-tumorale ce qui provoque l'échappement de la tumeur au système immunitaire. Lorsqu'il y a une activation du système immunitaire par les cellules dendritiques, des lymphocytes T reconnaissant des antigènes tumoraux infiltrent la tumeur et détruisent les cellules cancéreuses. L'infiltration de lymphocytes T dans les tumeurs traitées avec la DDA suggère une étude dans laquelle nous pourrions caractériser l'implication des LXRs dans l'activation du système immunitaire par la DDA et au cours de laquelle nous pourrions évaluer l'expression de CCR7 et de la fascine dans les cellules dendritiques infiltrées dans ces tumeurs.

La DDA appartient à la famille biochimique des stéroïdes alkaloïdes au sein de laquelle des molécules avaient été retrouvées chez les plantes, les amphibiens et les poissons mais jamais chez les mammifères^{478, 479}. La découverte de la DDA chez la souris et chez l'Homme fait donc de la DDA le premier stéroïde alkaloïde retrouvé chez les mammifères. La découverte de l'existence d'un stéroïde alkaloïde chez les mammifères peut désormais motiver des études approfondies pour détecter d'autres stéroïdes alkaloïdes au sein de cette famille animale. Cela ouvre un champ entier de recherche sur une nouvelle famille moléculaire ainsi que sur la caractérisation de ses rôles biologiques. La capacité de la DDA à induire la différenciation cellulaire suggère qu'elle puisse avoir un rôle au cours du développement où l'on assiste à la mise en place de programmes complexes de différenciation permettant la génération de cellules différenciées à partir de cellules souches indifférenciées. Les programmes de différenciation font intervenir une succession d'acteurs moléculaires de nature variée qui agissent dans un ordre précis, à une concentration particulière et pendant une durée déterminée. Il a été montré que des oxystéroïdes interviennent pendant la différenciation des neurones dopaminergiques en agissant sur les LXRs⁴⁸⁰. L'ajout de 22(R)-hydroxycholestérol pendant la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines entre le jour 35 et le jour 50 augmente la génération de neurones dopaminergiques. Cela représente une découverte majeure pour le développement de thérapies de restauration de neurones dopaminergiques dont la perte est responsable de la maladie de Parkinson. La présence de la DDA dans le cerveau des souris et sa capacité à induire la différenciation de précurseurs de neurones en

neurones différenciés ¹²⁴ suggère que la DDA puisse être impliquée dans des programmes de différenciation de neurones au cours du développement. De plus, nous avons mis en évidence que la DDA agit via les LXRs pour induire la mort des cellules cancéreuses (Article 1). Par conséquent, l'étude de l'implication des LXRs dans la différenciation cellulaire induite par la DDA, notamment dans les précurseurs de neurones, pourrait être une perspective d'étude importante et rationnelle puisqu'il a été montré que les LXRs sont impliqués au cœur d'un programme de différenciation neuronal. Comme il a été caractérisé que la DDA induit aussi la différenciation de monocytes en cellules dendritiques, et qu'elle a une capacité à induire la différenciation cellulaire sur tous les types cancéreux testés, il est possible que la DDA soit un acteur général de la différenciation cellulaire dans les organismes murins et humains, en intervenant dans la différenciation de plusieurs tissus. L'étude de la DDA dans le domaine de la biologie du développement pourrait permettre une avancée significative de la compréhension du rôle physiologique de cette molécule, en plus de son potentiel anti-cancéreux qui est actuellement le mieux caractérisé. La biologie du développement est intrinsèquement liée à l'étude de la conservation des processus physiologiques et des molécules au cours de l'Evolution. Il serait aussi intéressant de doser la DDA dans des tissus d'organismes modèles tels que *Caenorhabditis elegans* (nématode), *Drosophila melanogaster* (drosophile), *Danio rerio* (poisson zèbre), *Xenopus laevis* (xénope) et *Gallus gallus* (poulet) afin de déterminer le moment où la DDA est apparu au cours de l'Evolution. Nous savons déjà que la DDA est apparu avant l'Homme puisqu'elle est présente chez la souris (Article 5). Toutefois, ce genre d'étude est complexifié par le fait que des analogues structuraux ancestraux de la DDA ont pu précéder son apparition. Chez *C.elegans*, on sait déjà que l'homologue des LXRs est le récepteur DAF-12 qui lie un stéroïde particulier, l'acide dafachronique ⁴⁸¹ qui serait donc l'analogue ancestral des oxystérols que lient les LXRs chez les mammifères. Cela montre que la signalisation dépendante de l'homologue des LXRs chez *C.elegans* est modifiée d'un point de vue structural. Le point commun entre l'acide dafachronique et de nombreux oxystérols que lient les LXRs est une oxydation de la chaîne aliphatique du squelette stéroïde. Dans le cas où la DDA n'est pas retrouvée dans des organismes modèles, une recherche plus générale d'autres stéroïdes aminoalkylés pourrait permettre de détecter ce genre d'analogue ancestral. Aussi, la mise en évidence d'une conservation d'un métabolisme et d'une signalisation analogues à ceux caractérisés pour la DDA serait facilitée par l'identification du gène codant l'enzyme produisant la DDA chez les mammifères. Une étude phylogénétique de la séquence de ce gène permettrait dans un premier temps de détecter la présence de séquences homologues dans des organismes modèles

et d'évaluer leur pourcentage de conservation au cours de l'Evolution. Cela pourrait être une donnée préliminaire importante pour connaître la conservation du métabolisme de la DDA.

En conclusion, la découverte de la DDA chez les mammifères et son appartenance à une famille moléculaire encore jamais retrouvée au sein de cette famille ouvre un nouveau champ de recherche qui peut inspirer des études allant de la cancérologie à la biologie du développement. En plus du rôle biologique de la DDA dans la différenciation cellulaire qui reste à caractériser, la diminution de sa concentration au cours de l'oncogenèse et son potentiel anti-cancéreux rendent compte de l'importance de la découverte de la DDA pour la compréhension de la biologie humaine et de la physiopathologie des cancers qui pourront tenir compte de cette nouvelle molécule naturelle.

Article 6

Production d'anticorps anti-Dendrogénine A et mise au point d'une méthode de dosage ELISA de la Dendrogénine A

(Accepté)

INTRODUCTION

Dans l'article 5, nous avons découvert que la dendrogénine A (DDA) est un métabolite présent dans les tissus de mammifères comme la souris et l'Homme. Nous avons observé que la DDA est absente dans les cellules cancéreuses et que sa concentration est fortement diminuée dans des tumeurs de patients. Nous avons montré que la DDA a un fort potentiel anti-cancéreux sur des tumeurs implantées chez l'animal et que son mécanisme d'action anti-cancéreux implique l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Nos résultats suggèrent que la DDA puisse être un métabolite suppresseur de tumeur dont la concentration est diminuée au cours de l'oncogenèse par un mécanisme qui reste à identifier. Le traitement des cellules cancéreuses avec la DDA peut donc être vu comme une complémentation métabolique qui agit contre l'oncogenèse en provoquant la différenciation cellulaire, la mort des cellules cancéreuses ainsi que le contrôle de la pousse tumorale, le résultat clinique étant une augmentation de la survie des souris. Pour approfondir efficacement nos connaissances sur la DDA, il est nécessaire que nous développions des outils qui nous permettront de faciliter son étude au niveau fondamental ainsi qu'au niveau de son développement pour une utilisation en thérapie anti-cancéreuse. Par conséquent, dans cette étude nous avons mis au point une méthode de production d'anticorps dirigés spécifiquement contre la DDA que nous avons réussi à produire et dont nous avons démontré la spécificité.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

Technical note: Hapten synthesis, antibody production and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the natural steroidal alkaloid Dendrogenin A

Philippe de Medina^{a,b,*}, Michael R. Paillasse^{a,b}, Gregory Segala^{a,f}, Talal Al Saati^{c,d}, Jeannine Boyes^{a,d}, Georges Delsol^{a,d}, Cuider Allal^{e,f}, Sabrina Marsili^{e,f}, Sandrine Silvente-Poirot^{a,f}, Marc Poirot^{a,f}

^a Cancer Research Center of Toulouse, UMR 1037 Inserm-University Toulouse III, Toulouse, France

^b Affichem, Toulouse, France

^c INSERM, US006, ANEXPLO/CREFRE, Service d'Histopathologie, CHU Purpan, Toulouse, France

^d Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Purpan, Place Baylac, Toulouse, France

^e EA4553, University Toulouse III, Toulouse, France

^f Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2012

Accepted 4 June 2012

Available online xxx

Keywords:

Dendrogenin A

Antibody

Cancer

Biomarker

Hapten

ABSTRACT

We have recently discovered the existence of 5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -ol, called Dendrogenin A (DDA), as the first endogenous steroidal alkaloid ever described in mammals. We found that the DDA content of tumors and cancer cell lines was low or absent compared with normal cells showing that a deregulation in DDA biosynthesis was associated with cancer and therefore suggesting that DDA could represent a metabolomic cancer biomarker. This prompted us to produce antibodies that selectively recognize DDA. For this purpose, the hapten 5 α -hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -o-hemisuccinate with a carboxylic spacer arm attached to the 3 β -hydroxyl group of DDA was synthesized. The hapten was coupled to bovine serum albumin and keyhole limpet hemocyanin for antibody production to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein conjugates were injected into BALB/c mice to raise antibodies. The monoclonal antibodies that were secreted from the hybridoma cell lines established were assessed with indirect ELISA by competitive assays using dilutions of a DDA standard. The antibodies from the selected hybridomas had an IC₅₀ value ranging from 0.8 to 425 ng/ml. Three antibodies showed no cross-reactivity with structurally related compounds including histamine, cholesterol, ring B oxysterols and a regio-isomer of DDA. In this study, high-affinity and selective antibodies against DDA were produced for the first time, and a competitive indirect ELISA was developed.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Dendrogenin A (DDA) is the first endogenous steroidal alkaloid identified in mammals [1] (and de Medina et al., submitted). This

aminoalkyl-oxysterol was detected in various tissues from mice and humans at levels ranging from 40 to 300 ng/g of tissue and was also detected in human plasma at concentrations in the nanomolar range. Interestingly, we found that DDA was not detectable in cancer cells of various origins and its concentration in human breast tumor samples was 5-fold lower than in the adjacent normal tissues or primary cultures of human breast epithelial cells, suggesting a link between the absence of DDA and the occurrence of cancer [1]. We have also shown that DDA induces cancer cell differentiation and death of various tumor cell lines *in vitro* [2]. Moreover, DDA also exerts potent anti-tumor activities *in vivo* against breast cancer and melanoma grafted into immunocompetent mice [1]. Our data strongly suggest that this natural mammalian steroidal alkaloid may have clinical applications in the therapy and prevention of cancers

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CT, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; DDA, Dendrogenin A; C17, 5 α -hydroxy-6 β -[4-(2-aminoethyl)imidazol-1-yl]cholestan-3 β -ol; DMF, N,N'-dimethyl-formamide; 5,6 α -EC, 5,6 α -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol; 5,6 β -EC, 5,6 β -epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol; EDC, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; KLH, keyhole limpet hemocyanin; MS, mass spectrometry; OCDO, 6 oxo-cholestane-3 β ,5 α -diol; O.D, optical density; TFA, trifluoroacetic acid.

* Corresponding author. Affichem, 9, rue du Crucifix, 31400 Toulouse, France. Tel.: +33 561424648; fax: +33 561424631.

E-mail address: phildemedina@yahoo.fr (P. de Medina).

0300-9084/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.001>

Please cite this article in press as: P. de Medina, et al., Technical note: Hapten synthesis, antibody production and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the natural steroidal alkaloid Dendrogenin A, *Biochimie* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.001>

and also as a tumor biomarker for the diagnosis of cancer. The use of DDA as a tumor biomarker in the clinic implies the requirement of rapid and sensitive methods of assay. We have reported a quantitative method for the determination of DDA based on reversed-phase liquid chromatography (RP-HPLC) combined with mass spectrometric detection (tandem MS) using deuterium labeled DDA as an internal standard for quantification [1]. Traditionally, oxysterol analyses are mostly based on chromatographic separation methods with mass spectrometry detection [3]. Indeed, GC/MS analysis has been used extensively for the quantification of various oxysterols in human fluids and tissues in healthy and pathophysiological conditions [4–6]. These chromatographic-based methods are accurate, sensitive and specific, but require intensive sample treatments, expensive equipment and skilled personnel. Consequently, the cost of these analyses may be prohibitive for the assay of large numbers of samples. The considerable advances during the last decades in immunochemical methods have enabled the development of immunoassays for the detection and the quantification of small molecules. Immunoassay presents many advantages over chromatography/MS for the assay of a large number of samples in a clinical context. Indeed, sample preparation requirements are minimal in comparison to LC-MS-based methods, significantly reducing analysis time and expense. Several reports described the development of antibodies and immunoassays for the detection and quantification of small molecules [7] including steroids [8,9] cholesterol [10], 7-ketocholesterol [11] and squalamine, a steroidal alkaloid initially found in sharks [12]. Consequently, we aimed to develop an immunoassay suitable for the assay of DDA. In this study, we report the generation of antibodies that recognize DDA with high affinity and negligible cross-reactivity with structurally related compounds. Furthermore, we established a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of DDA based on the anti-DDA antibodies produced.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Fatty acid free bovine serum albumin, hemocyanin from keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH), succinic anhydride, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC), cholesterol and histamine were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). 5,6 α -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol (5,6 α -EC), 5,6 β -epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol (5,6 β -EC), cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) and 6 oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol (OCDO) were from Steraloids. 5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -ol (DDA), 5 α -Hydroxy-6 β -[4-(2-aminoethyl)imidazol-1-yl]cholestan-3 β -ol (C17) and [¹⁴C]-DDA were synthesized as previously described [1,2,13]. Chemical reactions were monitored by TLC using Merck silica gel 60 F254 (0.040–0.063 mm) with detection with 50% methanolic H₂SO₄ and 0.2% ethanolic ninhydrin. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer AC300. Solutions were prepared in deuterated methanol (CD₃OD) with TMS as internal standard. ESI-MS spectra were obtained with a quadrupolar NERMAG R10-10 spectrometer. SELDI-TOF analyses were performed at the Institut Claudius Regaud in Toulouse (France). High resolution mass spectrometry (HRMS) was done with a Waters LCT spectrometer, and the observed mass yields refer to purified products and are not optimized.

2.2. Chemical synthesis

2.2.1. 5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -O-hemisuccinate (**2**)

Succinic anhydride (1 mmol; 4 eq) was added to a solution of 5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -ol

(DDA; 0.25 mmol; 1 eq) in anhydrous pyridine (2 mL). The reaction mixture was stirred and refluxed under argon for 2 days and periodically monitored by TLC. The solvent was evaporated, and the residue was resuspended in water and extracted with butanol. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The residue was resuspended in methanol, passed through a SepPak cartridge (C18; Waters) and purified by reverse phase HPLC (Ultrasep ES 100 RP 18 6.0 μ m, 250 \times 8 mm column from Bischoff Chromatography) using an acetonitrile gradient (0% B for 10 min, then to 100% B in 60 min; A is 95:5 water/acetonitrile, 0.1% TFA; B is 95:5 acetonitrile/water, 0.1% TFA; flow rate 1 ml/min).

Analysis: Retention time (HPLC): 65 min; Rf (EtOAc 6/Acetic acid 3/BuOH 2/H₂O 2) = 0.69; NMR δ _H (300 MHz, MeOD) 8.727 (1H, s), 7.418 (1H, s), 5.237 (1H, m), 3.4–3.55 (2H, m), 3.25 (2H, m), 3.04 (1H, m), 2.81 (3H, m), 2.59 (4H, m), 2.27 (1H, m), 2.06 (1H, m), 1.17 (3H, s), 0.96 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.90 (3H, d, J = 0.95 Hz), 0.88 (3H, d, J = 0.95 Hz), 0.77 (3H, s) HRMS *m/z* 613,4527 (calculated for C₃₆H₅₉N₃O₅ 614,4533). MS (electrospray): *m/z* 614.6 (MH⁺) MS/MS (MS²) fragmentation with a 35% collision energy of the MH⁺ (*m/z* 614): *m/z* 596.6 (MH⁺ – H₂O); *m/z* 496.6 (MH⁺ – H₂O – HOOCCH₂CH₂CO); *m/z* 478.67 (MH⁺ – 2H₂O – HOOCCH₂CH₂CO).

2.2.2. [¹⁴C]-5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -O-hemisuccinate

Succinic anhydride (2.1 μ mol; 4 eq) was added to a solution of [¹⁴C]-5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -ol ([¹⁴C]-DDA; 30 μ Ci; 0.52 μ mol; 1 eq) in anhydrous pyridine (5 μ L) and the reaction mixture was refluxed with stirring under argon for 2 days. The solvent was evaporated, and the residue was resuspended in water and extracted with butanol. The organic layer was washed with brine and evaporated under vacuum. The residue was resuspended in methanol, passed through a sep-pak cartridge (C18; Waters) and purified by reverse phase HPLC (Ultrasep ES 100 RP 18 6.0 μ m, 250 \times 4 mm column from Bischoff Chromatography) using an acetonitrile gradient (0% B for 10 min, then to 100% B in 60 min; A is 95:5 water/acetonitrile, 0.1% TFA; B is 95:5 acetonitrile/water, 0.1% TFA; flow rate 0.7 ml/min) to produce [¹⁴C]-5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -O-hemisuccinate (9.2 μ Ci; 0.16 μ mol, 31%).

2.2.3. Preparation of BSA–DDA (**3a** and **3b**) and KLH–DDA (**4**) conjugates

Conjugates (**3a** and **3b**) were prepared at two different ratios of hapten to BSA (12:1 for **3a** and 50:1 for **3b**). **2** (1.4 mg, 2.25 μ mol for **3a** and 9.375 μ mol for **3b**, 1 eq) was dissolved in DMF/H₂O at a final concentration of 15 mM. To this solution, triethylamine (10 eq) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC) (10 eq) were added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The activated hapten solution was added dropwise to the protein solution (BSA: 12 mg, 0.185 μ mol) in 1 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 8. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The conjugate was purified by 10 kDa cut-off filtration using Vivaspin filters (Sartorius) by centrifugation at 9300 rpm for 10 min at 4 °C. The hapten–protein conjugate was assayed for protein content by the method of Bradford [14], aliquoted and stored at –20 °C until use. The synthesis of KLH–DDA (conjugate **4**) was carried out using the same method with a molar ratio of hapten to KLH of 75:1.

2.2.4. Preparation of [¹⁴C]-KLH–DDA

[¹⁴C]-5 α -Hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -O-hemisuccinate (0.16 μ mol, 9.2 μ Ci; 1 eq) was dissolved in a solution of DMF/H₂O (15 μ L) containing triethylamine (1.6 μ mol, 10 eq) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide

hydrochloride (EDC) (1.6 μmol , 10 eq) was added and the mixture stirred for 1 h at room temperature. The activated hapten solution was added to the protein solution (KLH: 0.7 mg) in 70 μL of 50 mM phosphate buffer, pH 8. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The conjugate was purified by 10 kDa cut-off filtration using Vivaspin filters (Sartorius) by centrifugation at 9300 rpm for 10 min at 4 °C. The hapten–protein conjugate was dissolved in 50 mM phosphate buffer, pH 8 and the radioactivity was counted using a Wallac 1409 liquid scintillation counter. Measurement of the non-specific binding of [^{14}C]-5 α -hydroxy-6 β -[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]cholestan-3 β -o-hemisuccinate was determined using the same procedure without the addition of EDC in the reaction mixture.

2.3. ELISA procedure

Coating antigen solution (BSA–DDA or KLH–DDA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL) in PBS (10 mM phosphate-buffered saline, pH 7.4, 0.15 M NaCl) was added to each well of 96-well microtiter plates and incubated 1 h at 37 °C and then at 4 °C overnight. Before use, the coating antigen solution was discarded, and the plates were washed with PBST (10 mM phosphate-buffered saline, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20). The excess binding sites were blocked with 200 μL /well of 1% BSA in PBS followed by incubation for 2 h at 37 °C. The plate was then washed with PBST. Dilutions of the competitors (DDA and analogs) were prepared in diluted hybridoma supernatants (1:1000) in PBS, preincubated for 1 h at room temperature and added to each coated well of the microtiter plates. After 2 h of incubation at 37 °C, the plates were washed with PBST and 100 μL of alkaline phosphatase conjugated secondary antibody (anti-mouse IgG, 1:1500) in PBS containing 1% BSA, 0.1% Tween 20 was added and incubated at 37 °C for 1.5 h. The plates were washed with PBST and 100 μL of alkaline phosphatase substrate (1 mg/ml) in diethanolamine buffer (0.3 mM diethanolamine MgCl_2 at pH 9.8) was added to each well. After incubation for 15 min at room temperature, the absorbance at 405 nm was measured.

2.4. SELDI-TOF

A volume of 5 μL of each sample was applied to a Normal Phase ProteinChip array (NP20) and air-dried. After 20 min, the arrays were washed twice with water. Then, 1 μL of a saturated solution of sinapinic acid in 50% acetonitrile and 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid was applied to the chip array surface twice on each spot as an energy absorbing matrix. The arrays were read on a PCS4000 ProteinChip SELDI reader system according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). Peak detection was performed automatically using Ciphergen Express Cluster Wizard. For the peak detection the signal-to-noise ratio was 5 (minimum peak threshold was 20%; for cluster completion, the cluster mass was 1% and the signal-to-noise ratio for the second pass was 2).

2.5. Immunizations

BALB/c female mice (8–10 weeks old) were immunized with BSA–DDA or KLH–DDA conjugates by subcutaneous injections. The doses consisted of 200 μL of a solution of 100 μg of protein conjugate, estimated as protein concentration, in PBS and emulsified with Freund's adjuvants. The first dose contained complete Freund's adjuvant, and subsequent doses were given at weeks 2, 4 and 6 using incomplete Freund's adjuvant. After a resting period of 2 weeks from the last injection with adjuvant, mice received a booster intraperitoneal injection of 100 μg of protein conjugate in 200 μL of PBS, 4 days before cell fusion. Of note, 7–10 days after the

fourth immunization, blood samples were obtained from the mice to measure serum antibodies. The binding of antibodies from the mouse sera to protein–DDA conjugates was determined by ELISA. The mouse with the best ELISA titer was chosen for the hybridoma fusions. Mouse with the best ELISA titer was chosen for hybridoma fusions.

2.6. Cell fusion and culture

Mouse spleen cells were fused with myeloma cells according to established protocols [15]. Just before spleen extraction, mouse blood was collected by retro-orbital bleeding and serum was collected and stored at –20 °C. Immunoglobulin non secreting mouse myeloma cell line P3-X63/Ag 8.653 was used for the cell fusion and cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with L-glutamine, antibiotics and 20% Myclone Super Plus fetal bovine serum (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). (Referred to as S-IMDM). P3-X63/Ag 8.653 cells are resistant to 8-azaguanine and do not grow in selective medium containing azaserine. After fusion, the cells were cultured in the selective HAS medium (S-IMDM medium with 100 μM hypoxanthine, 5.7 μM azaserine). The high viability and rapid growth of cells in the selective HAS medium are consistent with a high efficiency of fusion. Culture supernatants containing mAbs were used for affinity analysis by conjugate-coated competitive assays.

2.7. Hybridoma selection and cloning

A screening of fusion culture supernatants was carried out 10–12 days after cell fusion. The screening consisted of a conjugate-coated ELISA to test the presence of antibodies with the ability to bind to the BSA–DDA or KLH–DDA conjugates. Of note, if the animal was immunized with KLH conjugates, BSA conjugates were used for the ELISA and *vice versa*. Before the screening of each fusion was performed, the optimum concentration of coating protein carrier–DDA conjugate was selected by titration in a non-competitive assay using serial dilutions of the homologous coating species and of the fusion serum of that mouse. In this way, the lowest coating concentration that provided the highest signal for a given antibody concentration was chosen as the optimum one for that fusion screening. Those wells showing positive (clearly over the background) were searched for growing hybridomas and then the cells in the selected wells were cloned by limiting dilution until monoclonality was ensured.

2.8. Antibody isotyping

The antibodies produced by the selected hybridomas were isotyped using a mouse monoclonal antibody isotyping reagent kit (Isostrip, Roche Diagnosis) according to the manufacturer's instructions.

3. Results and discussion

3.1. Chemical synthesis

3.1.1. Hapten design and synthesis

In order to induce an immune response, small molecules have to be covalently linked to proteins leading to immunogenic hapten–carrier conjugates. A suitable hapten for antibody production must mimic the target and preserve functional groups, three dimensional structures and electronic configuration [16]. In this study, the succinic anhydride method was used to introduce a four carbon atom spacer arm and a terminal carboxylic group at the 3 β -hydroxyl function of DDA (DDA-hemisuccinate) for the

conjugation with the protein carrier (Fig. 1). Indeed, a spacer length of 3–5 C-atoms is considered to be suitable for hapten preparation for an optimum exposure of the conjugated hapten to the immune system [17,18]. Moreover, hapten preparation using succinylation of target compounds has been successfully used for the preparation of antibodies against small molecules including steroids [8].

The synthesis of DDA-hemisuccinate **2** was carried out by refluxing DDA **1** for 48 h with an excess of succinic anhydride in pyridine (Fig. 1). The reaction was monitored by TLC and electro-spray mass spectrometry. The reaction was total and produced **2** and a small amount of the di-succinylated derivative of DDA that was easily separated by RP-HPLC. The succinylation of the 3 β -hydroxyl group of DDA was confirmed by ¹H NMR. Indeed, ¹H NMR revealed a chemical shift for the H3 of hapten **2**, shifted to down-field with 1.24 ppm more than that of DDA. This established that DDA was esterified with a succinate on the 3 β -hydroxyl.

3.1.2. Synthesis and analysis of the conjugates

The immunogen and coating antigen used in this study were prepared by activation of the free carboxylic acid function of hapten **2** via the EDC method and reaction with the free amine groups of the carrier protein (NH₂–KLH and NH₂–BSA). Different molar ratios of **2**/BSA were used in order to determine optimal conditions to ensure the high substitution level of the lysine side chains of the carrier protein. The average number of haptens bound to BSA for synthetic conjugates **3a** and **3b** was determined by SELDI-TOF analysis. As shown in Fig. 2, the coupling rate is strongly dependent on the hapten/protein molar ratio. Indeed, a molar ratio (**2**/BSA) of 12 and 50 gives respectively an average of 1.8 and 9.6 haptens bound to BSA. Our results are consistent with previous reports that have shown that a large excess of hapten ensures high coupling with the free amine groups of the carrier protein [19].

After the coupling reactions, the protein conjugates were purified by 10 kDa cut-off filtration to remove unreacted hapten and coupling reactants. The mass of KLH is too high for mass spectrometry analysis of conjugate **4**. In order to determine the incorporation of hapten into KLH, we coupled the [¹⁴C]-radiolabelled hapten derivative with KLH using the same procedure as that described for the synthesis of conjugate **3** with a molar ratio of **2**/KLH of 75. After separation of the conjugate from unreacted radiolabelled hapten by filtration with a 10 kDa cut-off filter, the radioactivity associated with the synthetic KLH conjugate was measured and corresponded to 45 molecules of DDA per molecule of KLH. No significant radioactivity was detected when EDC was omitted from the reaction mixture showing that non-specific interaction of uncoupled ¹⁴C hapten with the carrier protein or the 10 kDa cut-off filter was negligible.

3.2. ELISA development

3.2.1. Evaluation of antisera

Immunizations of mice were carried out with BSA–DDA **3b** and KLH–DDA **4** conjugates. When **3b** was used as immunogen, microtiter plates were coated with **4** and conversely and the immunization was monitored by indirect competitive ELISA using hapten protein conjugates as the coating antigen. The antisera obtained from the mice immunized with **3b** and **4** were evaluated by measuring the binding of serial dilutions (1:10 to 1:5000) of antisera to microtiter plates coated with respectively **4** and **3b**. BSA and KLH were used to ensure the selectivity of binding of the antisera to conjugates hapten. Fig. 3 shows that antisera specifically recognized hapten protein conjugates relative to native carrier proteins indicating a good immune response against the hapten protein conjugate.

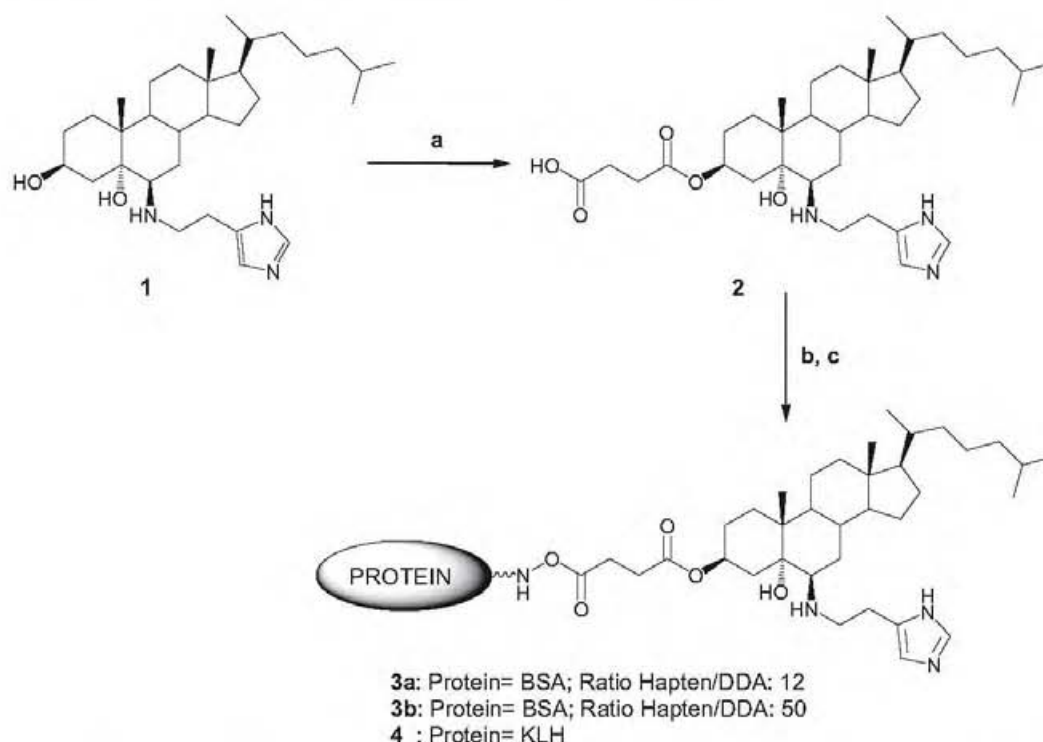


Fig. 1. Preparation of DDA–hemisuccinate **2** hapten and protein carrier–DDA conjugate (BSA–DDA conjugates **3a** and **3b** and KLH–DDA conjugate **4**). a) Succinic anhydride, dry pyridine, reflux, 48 h; b) EDC, DMF/H₂O, RT, 1 h; c) BSA or KLH, phosphate buffer 50 mM, room temperature, 24 h.

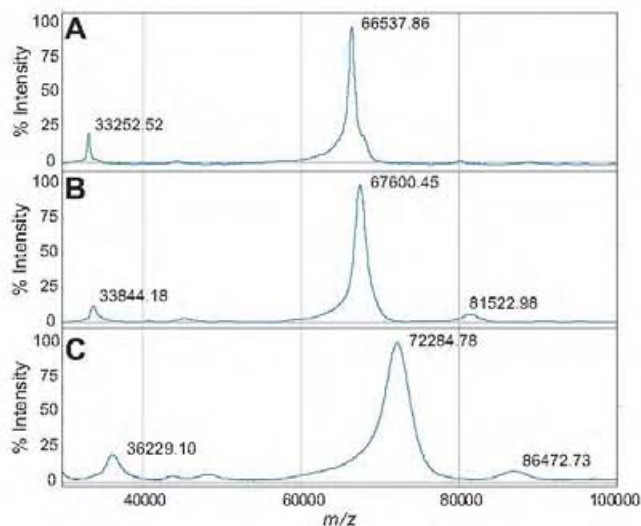


Fig. 2. Determination of hapten incorporation on BSA– DDA conjugates **3a** and **3b** by SELDI-TOF. Mass spectrum analysis of BSA (A), BSA– DDA **3a** (B) and **3b** (C) were carried out as described under the Materials and Methods.

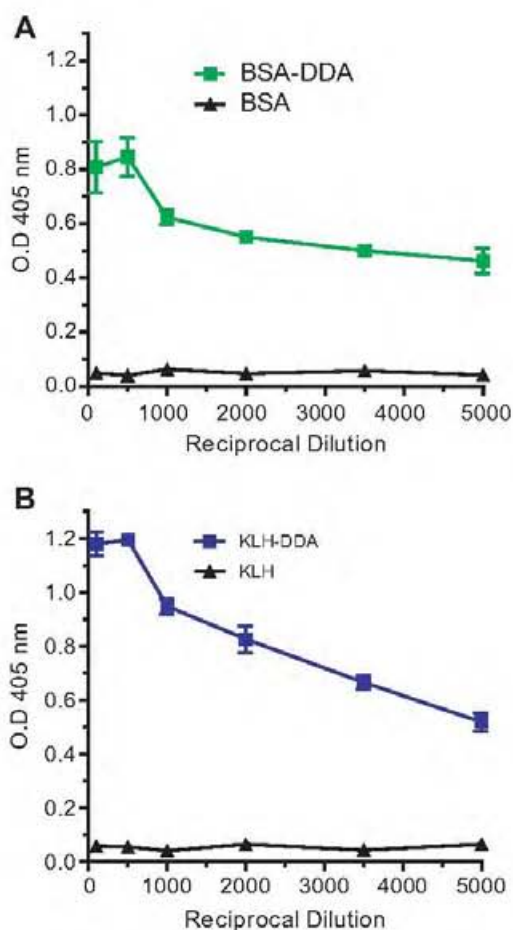


Fig. 3. Titer analysis of antisera from mice immunized with KLH– DDA **4** (A) or with BSA– DDA **3b** (B). Analyses were done by non-competitive indirect ELISA as described under the Materials and Methods. Microtiter plates were coated with conjugates **3b** (green square), **4** (blue square), BSA and KLH at 50 ng/well. Different dilution factors of antisera ranging from 5000 to 100 were tested, and the titer was evaluated from the OD at 405 nm.

Table 1
Characterization of the hybridoma supernatants with the indirect ELISA format.

Hybridoma	Immunogen	Coating antigen	A_{\max}	% inhibition (1 $\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} (ng/ml)
BD474	3b	4	1.20	100	3.2 ± 0.6
BD1075	3b	4	0.80	100	7.8 ± 1.1
BD274	3b	4	0.75	98	25.2 ± 2.9
BD723	3b	4	0.95	100	14.3 ± 2.2
BD377	3b	4	0.80	95	115 ± 8.7
BD570	3b	4	0.92	90	225 ± 10.9
BD762	3b	4	0.45	87	340 ± 17.3
KD538	4	3b	0.65	100	39.5 ± 3.7
KD611	4	3b	0.55	96	58.2 ± 4.7
KD328	4	3b	1.5	100	0.8 ± 0.12
KD1139	4	3b	0.7	84	310 ± 22
KD1496	4	3b	0.5	75	425 ± 27

Experiments were carried as described under Materials and Methods and legend of Fig. 3. A_{\max} were determined as follows: $A_{\max} = A_{\text{control}} - A_0$, where A_{control} is the optical density at 405 nm measured without DDA. A_0 is the optical density obtained without antibody. % of inhibition was calculated as follows: % inhibition = $100 \times (A_{\text{DDA}} - A_0) / (A_{\text{control}} - A_0)$ where A_{DDA} is the optical density at 405 nm measured in the presence of the indicated concentration of DDA. IC_{50} values were determined from sigmoidal curves from tested hybridomas using the iterative curve-fitting program GraphPad Prism (version 4.0). Values are the average of three experiments \pm S.E.M., each carried out in duplicate.

3.2.2. Evaluation of hybridomas

The culture supernatants from 1315 hybridoma-positive wells, prepared from splenocytes of mice immunized with either BSA– DDA **3b** and KLH– DDA **4** were evaluated by indirect non-competitive ELISA. We found that supernatants from 65 hybridomas contained antibodies that bound specifically to hapten protein conjugates relative to carrier protein. We then tested by indirect competitive ELISA, the capacity of DDA dissolved in solution at a single concentration (1 $\mu\text{g/ml}$) to inhibit the binding of antibodies to coated protein– DDA conjugates. We found that antibodies from 12 hybridomas bound free DDA in solution (Table 1). The sensitivity of the antibodies for DDA was measured by indirect competitive ELISA by adding increasing concentrations of DDA as competitor to measure the concentration of analytes that reduced the binding of antibodies to coated antigen by 50% (IC_{50}). The standard sigmoid curves obtained for the antibodies with the highest sensitivities for DDA are shown in Fig. 4 and IC_{50} calculated from the sigmoidal curves are given in Table 1 and range from 0.8 to 425 ng/ml. The highest sensitivity was found for hybridoma KD 328 with an IC_{50} of 0.8 ng/ml. Subsequent isotyping showed that all the DDA specific

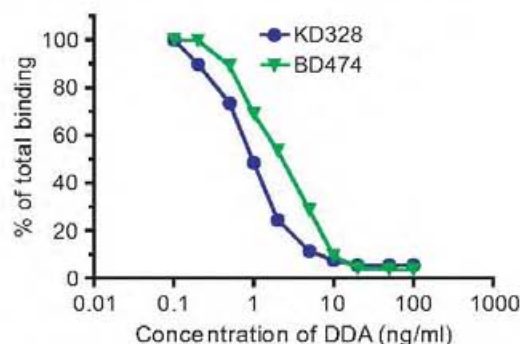


Fig. 4. Representative standard curves obtained from binding inhibition of hybridoma supernatants BD 474 diluted at 1/1000 to coated conjugate **4** and KD 328 diluted at 1/1000 to coated conjugate **3b** by increasing concentrations of DDA. Results are expressed as % of maximum binding calculated by the following equation: % of maximum binding = $(A_{\text{DDA}} - A_0) / (A_{\text{control}} - A_0) \times 100$, where A_{DDA} and A_{control} are respectively the optical density measured with and without DDA. A_0 is the optical density obtained without antibody.

Table 2
Cross-reactivity of some structurally related compounds to the selected hybridomas in the indirect competitive ELISA format.

Competitors	BD474	BD377	BD1075	BD274	KD611	KD538	KD328
	IC ₅₀ (ng/ml) (% Cross reactivity)						
Chol	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	N.M. (<0.015)	N.M. (<0.05)	1450 (4)	N.M. (<0.05)	N.M. (<0.0016)
His	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	65 (12)	N.M. (<0.05)	N.M. (<0.11)	895 (4.4)	N.M. (<0.0016)
C17	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	450 (1.7)	210 (11.9)	132 (4.4)	1815 (2.2)	N.M. (<0.0016)
5,6 α -EC	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	N.M. (<0.015)	N.M. (<0.05)	815 (7.1)	N.M. (<0.05)	N.M. (<0.0016)
5,6 β -EC	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	N.M. (<0.015)	N.M. (<0.05)	925 (6.3)	N.M. (<0.05)	N.M. (<0.0016)
CT	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	N.M. (<0.015)	580 (4.3)	518 (11.2)	N.M. (<0.05)	N.M. (<0.0016)
OCDO	N.M. (<0.006)	N.M. (<0.03)	N.M. (<0.015)	350 (7.1)	750 (7.7)	N.M. (<0.05)	N.M. (<0.0016)

Hybridoma supernatants BD 474, BD 377, BD 1075 and BD 274 were diluted at 1/1000 and incubated with coated conjugate 4 in the presence of increasing concentration ranging from 0.1 to 1000 ng/ml of the indicated compounds. Hybridoma supernatants KD 611, KD 328 and KD 538 were diluted at 1/1000 and incubated with to coated conjugate 3b in the presence of increasing concentration ranging from 0.1 to 1000 ng/ml of the indicated compounds. The percentage of cross-reactivity is defined as the ratio of the IC₅₀ value for DDA determined as described in the legend of Fig. 3 to that measured for structurally related compounds. N.M.: not measurable.

hybridomas secreted antibodies of the IgG1 subclass with κ light chains (Fig. S1).

3.2.3. Cross reactivity

The selectivity of the antibodies with an IC₅₀ below 100 ng/ml was evaluated (Table 2). For this purpose, we determined the selectivity of antibodies for DDA by measuring inhibition curves using DDA structurally related compounds as competitors, including cholesterol, ring B oxysterols substituted at carbon C6 (5,6 α -EC, 5,6 β -EC, CT and OCDO), histamine and C17, the regio-isomer of DDA in which histamine was grafted onto the carbon

C6 of 5,6 α -EC by its imidazole ring (Fig. 5). The cross-reactivity for each structural analog was calculated as the ratio of the IC₅₀ of the DDA with that of the analogs. The results obtained are given in Table 2. For hybridomas KD 328, BD 474 and BD 377 no significant inhibition were measured at the highest concentration (10 μ g/ml) of all the analogs tested. For hybridomas KD 538 and BD 1075, only histamine and C17 showed slight cross-reactivity (15%). In the case of the hybridomas BD 274 and KD 611, the cross-reactivity was measured with ring B oxysterols (Table 2).

4. Conclusion

Antibodies against DDA were successfully produced from mice immunized with synthetic protein carrier-hapten conjugates using DDA functionalized with a succinilic arm grafted at position 3 β of the sterol skeleton as hapten. An indirect competitive ELISA was developed and showed high sensitivity toward DDA with IC₅₀ ranging from 0.8 to 425 ng/ml. In addition, antibodies from three hybridomas were highly specific for DDA with no measurable cross-reactivity with structurally related compounds.

Using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), we recently identified DDA as the first endogenous steroidal alkaloid present in mouse and human tissues and in the circulation. Although accurate, this method presents some limitations: LC-MS/MS is time consuming and LC analysis cannot resolve DDA with C17, the regio-isomer of DDA. On the contrary, the immunomethod reported here, is rapid, easy to use and the high selectivity of the anti-DDA antibodies produced enables DDA and structural analogs including C17 to be discriminated. Consequently, our antibodies constitute a promising tool for high-throughput screening of DDA levels in samples from the clinic. Isotype determination of the anti-DDA antibodies allows the detection of DDA notably by immunohistochemistry using commercially available labeled anti-mouse IgG1 κ antibodies. This approach might constitute a new tool for cancer diagnosis since DDA production is down-regulated in cancer compared with healthy tissues. Interestingly, two reports described the detection of 7 ketocholesterol in tissues highlighting the feasibility of this method for sterol derivatives [11,20]. Moreover, depletion of DDA with the antibodies produced could be of interest to investigate the physiological functions of DDA. Additionally, this study established that our approach can be useful to obtain specific antibodies and immunological methods of assay of a new class of mammalian steroidal alkaloids and may be used to develop antibodies against other sterols of the same family. It would be of interest to develop specific antibodies against different oxysterols including, side chain-, ring B- and ring A-oxysterols in their esterified (fatty acid, sulfate) or free forms.

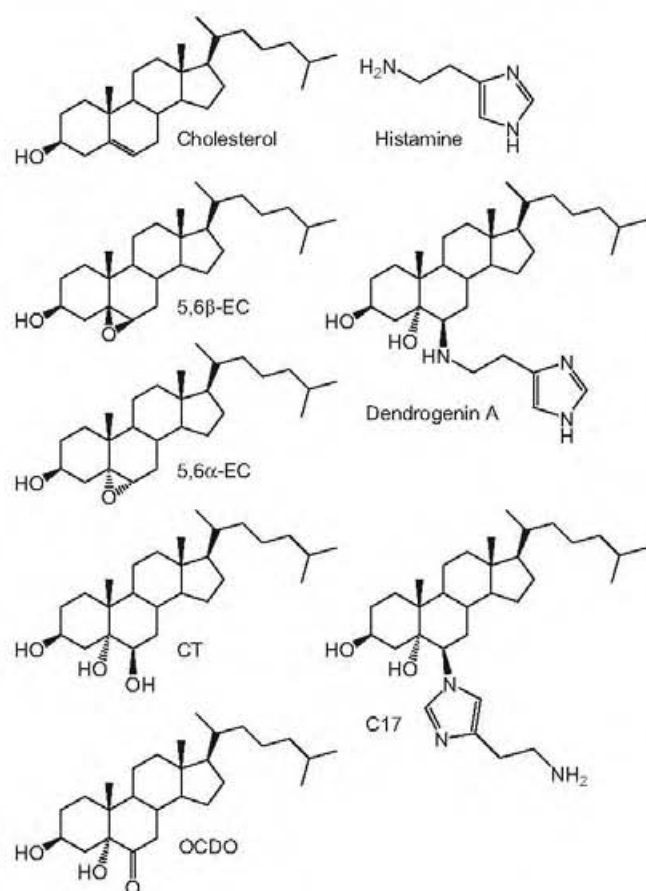


Fig. 5. Chemical structures of DDA and structure related compounds tested for selectivity assays.

Acknowledgments

This work was supported by an internal grant from INSERM, the Institut Claudius Regaud and Affichem. GS is funded by the "Ministere de la Recherche" and the "Association pour la Recherche sur le Cancer".

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.001>.

References

- [1] M. Poirot, P. de Medina, M. Paillasse, G. Segala, F. Pont, T. Al Saati, S. Silvente-Poirot, Abstract#938: discovery of dendrogenin A as the first endogenous alkylaminooxysterol present in mammals with potent cell differentiation and anticancer activity, in: AACR Meeting Abstracts, 2011, p. 938.
- [2] P. de Medina, M.R. Paillasse, B. Payre, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 7765–7777.
- [3] L. Juliano, Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 457–468.
- [4] M. Shafaati, A. Marutle, H. Pettersson, A. Lovgren-Sandblom, M. Olin, I. Pikuleva, B. Winblad, A. Nordberg, I. Bjorkhem, Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 1004–1010.
- [5] H. Shan, J. Pang, S. Li, T.B. Chiang, W.K. Wilson, G.J. Schroepfer Jr., Chromatographic behavior of oxygenated derivatives of cholesterol, *Steroids* 68 (2003) 221–233.
- [6] S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, U. Diczfalussy, Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 225 (1995) 73–80.
- [7] J.Y. Shim, Y.A. Kim, Y.T. Lee, B.D. Hammock, H.S. Lee, Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the organophosphorus insecticide O-ethyl O-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN), *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5241–5247.
- [8] Y. Zhang, F. He, Y. Wan, M. Meng, J. Xu, J. Yi, Y. Wang, C. Feng, S. Wang, R. Xi, Generation of anti-trenbolone monoclonal antibody and establishment of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of trenbolone in animal tissues, feed and urine, *Talanta* 83 (2011) 732–737.
- [9] A.L. Agasan, M.H. Briggs, D.R. Hewish, B. Stewart, Development of a monoclonal antibody for use in radioimmunoassay of ethynylestradiol, *Steroids* 47 (1986) 295–306.
- [10] A. Biro, L. Cervenak, A. Balogh, A. Lorincz, K. Uray, A. Horvath, L. Romics, J. Matko, G. Fust, G. Laszlo, Novel anti-cholesterol monoclonal immunoglobulin G antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 19–29.
- [11] E.F. Moreira, L.M. Larrayoz, J.W. Lee, I.R. Rodriguez, 7-Ketocholesterol is present in lipid deposits in the primate retina: potential implication in the induction of VEGF and CNV formation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 523–532.
- [12] S.S. Yun, W. Li, Identification of squalamine in the plasma membrane of white blood cells in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 2579–2586.
- [13] P. de Medina, M.R. Paillasse, G. Segala, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBs ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 13520–13525.
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [15] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988.
- [16] A.E. Karu, M.H. Goodrow, D.J. Schmidt, B.D. Hammock, M.W. Bigelow, Synthesis of haptens and derivation of monoclonal antibodies for immunoassay of the phenylurea herbicide diuron, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 301–309.
- [17] Y. Wang, D. Wei, H. Yang, Y. Yang, W. Xing, Y. Li, A. Deng, Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples, *Talanta* 77 (2009) 1783–1789.
- [18] J.V. Mercader, C. Suarez-Pantaleon, C. Agullo, A. Abad-Somovilla, A. Abad-Fuentes, Hapten synthesis and monoclonal antibody-based immunoassay development for detection of the fungicide trifloxystrobin, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 2581–2588.
- [19] J. Naar, P. Branaa, M. Chinain, S. Pauillac, An improved method for the microscale preparation and characterization of hapten–protein conjugates: the use of cholesterol as a model for nonchromophore hydroxylated haptens, *Bioconjug. Chem.* 10 (1999) 1143–1149.
- [20] M. Myoishi, H. Hao, T. Minamino, K. Watanabe, K. Nishihira, K. Hatakeyama, Y. Asada, K. Okada, H. Ishibashi-Ueda, G. Gabbiani, M.L. Bochaton-Piallat, N. Mochizuki, M. Kitakaze, Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome, *Circulation* 116 (2007) 1226–1233.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons réussi la production de trois anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la DDA. Ces anticorps ne reconnaissent pas des molécules de structure proche de la DDA comme le cholestérol, l'histamine, le régioisomère C17 de la DDA, le CE α , le CE β , le CT ou l'OCDO (6-oxocholestane-3,5-diol). Jusqu'ici, le dosage de la DDA ne pouvait être effectué que par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. Cette méthode fait intervenir une mise en œuvre lourde et un appareillage coûteux que ne possèdent pas des laboratoires médicaux réalisant des analyses de routine. Grâce à la production de ces anticorps, nous avons pu mettre au point un test ELISA qui permet de doser la DDA dans des échantillons biologiques. Ces nouveaux outils vont faciliter le dosage de la DDA et permettre son accessibilité à tout laboratoire souhaitant doser cette molécule. Vu que la concentration en DDA est fortement diminuée dans des tissus tumoraux, la DDA pourrait être évaluée en tant que nouveau biomarqueur discriminant un tissu sain d'un tissu tumoral en fonction de la concentration en DDA dosée par le test ELISA. Aussi, les test cliniques sur la DDA pourraient utiliser le dosage ELISA de la DDA pour effectuer des études de pharmacocinétiques afin de déterminer la demi-vie de la DDA dans le sérum de souris et a fortiori de patients traitées avec la DDA. Des études de pharmacodynamiques pourraient aussi utiliser le dosage ELISA de la DDA dans les tumeurs de souris ou de patients traitées avec cette molécule pour calculer le pourcentage de DDA qui atteint la tumeur en fonction de la dose administrée. Par conséquent, la mise au point de ce nouvel outil devrait permettre une avancée optimale des études fondamentales et appliquées sur la DDA.

DISCUSSION

GENERALE

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence que le site de liaison des anti-oestrogènes (AEBS, AntiEstrogen Binding Site) porte l'activité Cholestérol-5,6-Epoxyde Hydrolase (ChEH), responsable de l'hydrolyse des cholestérol-5,6-époxyde alpha et beta (CE α et CE β) en cholestane-3,5,6-triol (CT) ¹²¹. L'activité ChEH est inhibée par le tamoxifène et par l'ensemble des ligands d'AEBS, ce qui provoque une accumulation de CE α et de CE β . En tenant compte du mécanisme d'action anti-cancéreux des ligands d'AEBS dans les cellules cancéreuses mammaires qui passe par une accumulation d'oxystérols, nous avons pensé que l'accumulation de Cholestérol-5,6-époxydes (CEs), qui sont des oxystérols, pouvait être impliquée dans le mécanisme d'action des ligands d'AEBS. Nous avons mis en évidence une accumulation de CE dépendante d'un processus oxydatif dans des cellules traitées avec des ligands d'AEBS ainsi que la sulfatation du CE α en cholestérol-5,6-époxyde-3-sulfate (CES) par la sulfotransférase SULT2B1b (Article 2). Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231, qui sont résistantes au tamoxifène et qui n'expriment pas SULT2B1b, les ligands d'AEBS sont capables d'induire une accumulation de CE mais nous avons constaté une absence de production de CES à partir du CE accumulé. Nous avons montré que l'expression de SULT2B1b est déterminante dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux ligands d'AEBS (Article 2). Nos résultats suggèrent que SULT2B1b pourrait devenir un marqueur de sensibilité des tumeurs mammaires au tamoxifène. Il serait intéressant que nos données soient reprises par des études cliniques visant à identifier de nouveaux marqueurs prédictifs de réponse au tamoxifène qui intègrent l'analyse de l'expression de SULT2B1b dans des tumeurs mammaires.

Le groupe de Vincenzo Russo a montré que des tumeurs produisent des oxystérols qui agissent sur les LXRs présents dans les cellules dendritiques infiltrées dans la tumeur ²⁶⁴. L'activation des LXRs provoque une répression de CCR7 (CC Chemokine Receptor-7) qui est nécessaire pour le retour des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques pour la présentation des antigènes tumoraux et l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale. La réexpression de SULT2B1b dans ces tumeurs, utilisée dans leur étude pour inactiver les oxystérols produits par les tumeurs, rétablit une immunosurveillance tumorale par le système immunitaire.

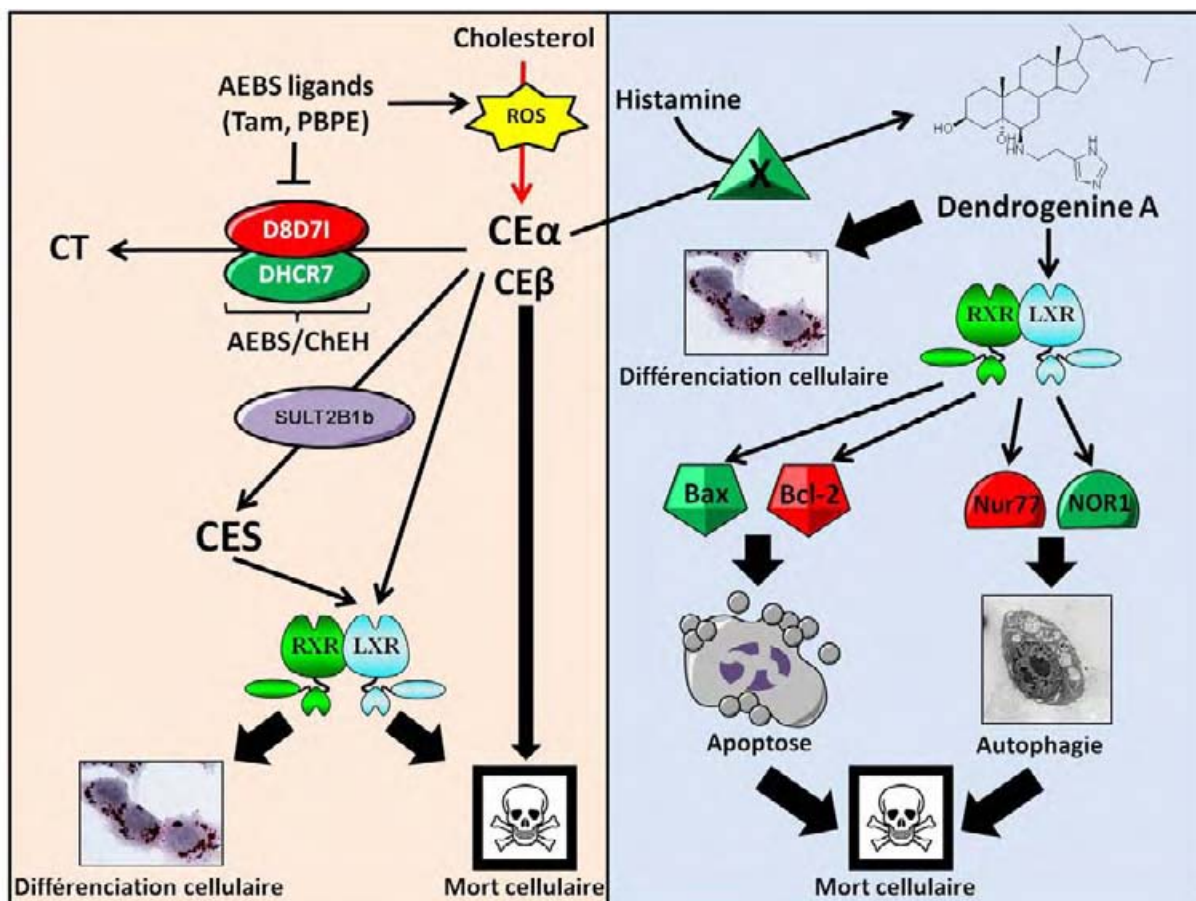


Figure 54 : Schéma général des mécanismes d'action anti-cancéreux induits par les ligands d'AEBS et la Dendrogénine A (DDA). Partie gauche (rouge ; Article 2): Dans des cellules cancéreuses mammaires, les ligands d'AEBS (AntiEstrogen Binding Site) inhibent l'activité ChEH (Cholesterol-5,6-epoxide Hydrolase) portée par le complexe AEBS ce qui provoque une inhibition de l'hydrolyse des CE (CEα et CEβ : cholestérol-5,6-époxyde alpha et beta) en CT (Cholestane Triol) et une accumulation de CEα et de CEβ. En parallèle, les ligands d'AEBS stimulent la production de ROS (Reactive Oxygen Species) qui sont impliqués dans la production de CEα à partir de cholestérol. Le CEβ est impliqué dans l'induction de la mort des cellules cancéreuses. Une part du CEα accumulé est sulfatée par SULT2B1b (Steroid Sulfotransferase 2B1) en CES (Cholestérol-5,6-époxyde sulfate). Le CES et le CEα agissent sur le récepteur nucléaire LXRβ (Liver X Receptor beta) en hétérodimère avec son partenaire obligatoire RXR (Retinoid X Receptor), ce qui participe à la différenciation et à la mort des cellules cancéreuses mammaires. Partie droite (bleue ; Articles 1 et 5): Le CEα peut réagir avec l'histamine grâce à l'intervention d'une enzyme putative X pour former la Dendrogénine A (DDA). La DDA se lie directement aux LXRs. Dans des cellules de mélanome, en se liant à LXRβ la DDA stimule l'expression de Bax, Nur77 et NOR1 (Neuron-derived Orphan Receptor 1) et elle inhibe l'expression de Bcl-2. La modification de l'expression de Bax et de Bcl-2 induit une apoptose alors que l'augmentation de l'expression de Nur77 et de NOR1 provoque une autophagie cytotoxique. L'apoptose et l'autophagie cytotoxique induites par la DDA sont responsables de la mort des cellules de mélanome.

Dans notre étude, nous avons montré que LXRβ est activé par les oxystérols qui s'accumulent dans les cellules traitées avec les ligands d'AEBS, parmi lesquels nous avons identifié le CEα et le CES (Article 2). Le CEα et le CES sont capables de moduler l'expression de gènes cibles des LXRs impliqués dans la production de triglycérides, qui est une caractéristique de redifférenciation induite par les ligands d'AEBS. Nous avons aussi montré que LXRβ est requis pour le déclenchement d'une mort cellulaire optimale par les ligands d'AEBS. A la

différence du groupe de Vincenzo Russo, nous montrons qu'un produit de sulfatation d'un oxystérol formé par SULT2B1b, le CES, est actif sur LXR β . En effet dans l'étude de Vincenzo Russo, les auteurs utilisent la surexpression de SULT2B1b pour inactiver les oxystérols produits par les tumeurs en considérant sans l'avoir vérifié que les produits de sulfatation de ces ligands sont inactifs vis-à-vis des LXRs. Notre étude suggère que SULT2B1b n'aurait pas qu'un rôle d'inactivation des ligands des LXRs puisque le CES produit par SULT2B1b stimule par le biais de LXR β la production de triglycérides. Des études fondamentales seraient nécessaires pour clarifier le comportement des sulfates d'oxystérols vis-à-vis des LXRs. En effet, il est désormais fréquent que SULT2B1b soit considéré dans la littérature comme une enzyme d'inactivation des ligands naturels des LXRs^{263, 264, 421}, alors qu'elle pourrait être une enzyme de modification des ligands des LXRs, provoquant la génération d'une classe de ligands induisant un programme transcriptionnel différent de celui induit par leurs analogues non sulfatés. Quelques études ont montré que des oxystérols sulfatés ont une activité antagoniste sur les LXRs^{260, 261} mais malheureusement ces données sont très peu reprises par les études sur les LXRs, probablement à cause de l'actuel manque de précision sur le rôle de ces oxystérols sulfatés qu'il devient nécessaire de clarifier.

Dans l'étude discutée précédemment, nous avons montré que le CE α est à l'origine de la production d'un métabolite sulfaté, le CES, sur lequel semble reposer une part de la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires au tamoxifène et plus généralement aux ligands d'AEBS (Article 2). Le CE α est aussi à l'origine d'un deuxième sujet de recherche développé par l'équipe de Marc Poirot. En effet, l'accumulation de CE α au niveau d'AEBS ainsi que la présence d'un récepteur de l'histamine sur AEBS a conduit l'équipe de Marc Poirot à synthétiser le produit de conjugaison entre le CE α et l'histamine, qu'ils ont nommé Dendrogénine A (DDA)¹²⁴. La dendrogénine A a un fort potentiel différenciant et cytotoxique sur de nombreux types cellulaires cancéreux. Nous avons montré que la DDA est naturellement présente dans des tissus sains murins et humains, ce qui en fait le premier stéroïde alcaloïde découvert chez les mammifères (Article 5). La DDA n'est pas présente dans les lignées cellulaires cancéreuses et sa concentration dans des tumeurs de patients est cinq fois inférieure à sa concentration dans les tissus adjacents des tumeurs. La croissance de tumeurs implantées chez la souris est fortement ralentie par la DDA et par conséquent la survie des souris est significativement augmentée. La forte réduction de la production de la DDA dans les tumeurs et son activité anti-tumorale puissante suggère que la DDA puisse être un métabolite suppresseur de tumeur. Etant donné que la production de DDA ne s'effectue

qu'en condition catalytique et qu'une incubation de CE α avec des extraits de cerveaux de souris permet la production de DDA, cela suggère qu'une enzyme est responsable de la biosynthèse de la DDA. L'identification de cette enzyme permettrait d'étudier plus efficacement le rôle de la DDA dans les tissus de mammifères. L'absence de production de DDA dans les cellules cancéreuses suggère que l'enzyme putative qui produit la DDA soit réprimée ou possède des mutations inactivatrices dans les cellules cancéreuses. Dans ce cas, le gène codant cette enzyme pourrait être un nouveau gène suppresseur de tumeur. Nous avons mis en évidence que le mécanisme d'action cytotoxique de la DDA est dépendant de LXR β et que la DDA se comporte comme un ligand antagoniste des LXRs (Article 1). Les concentrations actives en DDA sur les LXRs sont en accord avec les concentrations physiologiques en DDA, ce qui nous laisse envisager que la DDA puisse être un ligand endogène actif des LXRs. Le dosage de la DDA dans les tissus de souris LXR $\alpha\beta^{-/-}$ confirme en partie ce postulat puisque la concentration en DDA dans ces tissus est nettement supérieure à la concentration en DDA des tissus de souris sauvages (Article 1). L'explication du lien fonctionnel entre la présence des LXRs et le taux de production endogène de DDA pourrait résider dans le contrôle de l'activité de l'enzyme putative de biosynthèse de la DDA par les LXRs. Une fois son identification effectuée, il serait intéressant d'étudier sa régulation transcriptionnelle ainsi que le potentiel des LXRs à contrôler l'expression de cette enzyme putative.

L'étude du métabolisme du CE α nous a donc amené à identifier deux métabolites actifs du CE α : le CES et la DDA. Le CES résulte d'une sulfatation du CE α par SULT2B1b alors que la DDA est produite par une amination du CE α par une enzyme qui reste à identifier. Le CES et la DDA ont tous les deux une activité anti-tumorale cytotoxique (Articles 1 et 2). La classe pharmacologique à laquelle le CES et la DDA appartiennent vis-à-vis de LXR β est encore ambiguë puisque nous n'avons pas effectué d'étude extensive permettant de la définir précisément pour chacune de ces molécules. Des études récentes montrent l'importance d'établir le profil de recrutement des corégulateurs transcriptionnels par un récepteur nucléaire lié à un ligand pour définir la classe pharmacologique du ligand^{126, 482}. Par exemple, une étude des corégulateurs recrutés par RAR lié à un antagoniste ou lié à un agoniste inverse a permis de définir un profil de recrutement de corégulateur différent entre ces deux classes pharmacologiques⁴⁸². Les données que nous avons sur la modulation de LXR β par le CES et la DDA écartent la possibilité que ces ligands soient des agonistes ou des agonistes inverses. En effet, la première classe pharmacologique citée provoque une activation générale des

gènes cibles alors que la deuxième classe citée effectue exactement l'inverse. Cela est dû à la position franche que l'hélice 12 adopte avec ces deux classes de ligands : avec un agoniste, l'hélice 12 est en position fermée pour recruter des coactivateurs alors qu'avec un agoniste inverse, l'hélice 12 est ouverte pour recruter des corépresseurs¹⁷³. Nos données suggèrent que le profil pharmacologique du CES et la DDA se rapprocherait plutôt du CE α dont ils dérivent, qui est un agoniste partiel et par conséquent qui appartient à la classe des modulateurs¹²⁶. Le CE α peut être activateur de certains gènes et répresseur d'autres gènes de façon dépendante du type cellulaire, ce que nous avons observé avec la DDA ainsi qu'avec le CES (Articles 1 et 2). La classe des modulateurs induit une conformation intermédiaire de l'hélice 12 qui permet le recrutement de coactivateur ou de corépresseur selon le promoteur et selon le type cellulaire¹⁷³. Parmi les modulateurs, on compte des agonistes partiels et des antagonistes partiels suivant l'affinité qu'ils peuvent avoir pour des coactivateurs ou des corépresseurs²⁷¹. Les résultats que nous avons obtenus sur un système de gène rapporteur luciférase suggère que la DDA soit un antagoniste partiel puisqu'elle inhibe l'activation des LXRs par le 22(R)-hydroxycholestérol (Article 1). Les données de la littérature sont en faveur du fait que le CES soit un antagoniste des LXRs²⁶⁰. Même si l'étude du recrutement des corégulateurs sur les LXRs n'a pas encore été effectuée avec le CES et la DDA, les résultats actuels suggèrent fortement que ce sont des antagonistes des LXRs. Cela voudrait dire que la métabolisation enzymatique du CE α en CES ou en DDA pourrait être responsable d'un changement de la classe pharmacologique du CE α en produisant des antagonistes des LXRs. L'intérêt biologique de la métabolisation du CE α en antagoniste des LXRs semble être fort au regard des activités anti-cancéreuses qui leur sont associées et que nous avons caractérisé. Jusqu'ici, il n'avait jamais été envisagé que des antagonistes des LXRs puissent avoir un intérêt thérapeutique quelconque puisque l'effort d'étude sur les LXRs est particulièrement centré sur leur position de cible pour lutter contre l'athérosclérose. L'activation des LXRs par des agonistes permet de réduire les risques d'athérosclérose chez des modèles murins, ce sont donc les agonistes des LXRs qui ont fait l'objet d'études intenses et approfondies. Depuis plusieurs années, les agonistes des LXRs sont testés contre les cancers et des résultats significatifs ont été obtenus sur des lignées cellulaires cancéreuses^{281, 297, 422, 427, 428, 437, 444}. Le mécanisme d'action des agonistes des LXRs semble faire intervenir une perturbation de l'homéostasie du cholestérol dans les cellules cancéreuses^{297, 437}, qui sont fortement dépendante d'un taux de cholestérol adéquat pour pouvoir proliférer activement. Le mécanisme d'action cytotoxique du CES sur les cellules cancéreuses reste à caractériser mais nous avons mis en évidence que la DDA induit via LXR β un mécanisme d'induction de la

mort cellulaire original (Article 1). La DDA régule de manière dépendante de LXR β l'expression de NOR1, de Nur77, de Bax et de Bcl-2 qui sont responsables de l'induction d'une autophagie cytotoxique et d'une apoptose dans des cellules de mélanome. Comme le CES semble appartenir à la même classe pharmacologique que la DDA vis-à-vis des LXRs, il est possible que son mécanisme d'action cytotoxique possède des similitudes avec le mécanisme de mort cellulaire induit par la DDA qui est dépendant de LXR β . Cela serait intéressant à étudier afin d'avoir une compréhension approfondie des mécanismes d'action anti-cancéreux des ligands d'AEBS qui entrent en jeu après la production de CES par SULT2B1b. La concentration en DDA nécessaire pour provoquer la mort des cellules cancéreuses est inférieure aux concentrations en agonistes synthétiques des LXRs requises pour induire une cytotoxicité. Cela suggère que la DDA a un potentiel anti-cancéreux plus fort que ces agonistes. Il est possible qu'une activité antagoniste des LXRs soit une meilleure stratégie thérapeutique anti-cancéreuse qu'une activité agoniste. Dans ce cas, les LXRs pourraient être au cœur de deux ciblage thérapeutiques avec des agents pharmacologiques de classe opposée : les agonistes des LXRs pour cibler l'athérosclérose et les antagonistes des LXRs pour lutter contre le cancer. L'établissement de cette dichotomie est actuellement très précaire puisque le panel d'antagonistes des LXRs que nous avons testé est très limité avec uniquement le CES et la DDA. L'étude des effets antagonistes sur les LXRs pourrait être stimulée par la synthèse d'antagonistes possédant une affinité forte pour les LXRs. La synthèse d'antagonistes des LXRs a déjà été réalisée avec la synthèse d'un dérivé tertiaire de sulfonamide, le GSK2033²⁵⁵. La caractérisation de son potentiel anti-cancéreux serait intéressante pour savoir si l'antagonisme des LXRs constitue une stratégie thérapeutique intéressante contre les cancers qui puisse motiver la production et le développement de nouveaux antagonistes des LXRs avec un potentiel thérapeutique exploitable.

Nous avons caractérisé que le CES et la DDA sont impliqués dans l'induction de la différenciation cellulaire (Articles 2 et 5). Concernant le CES, nous avons mis en évidence son implication dans la différenciation cellulaire de cellules cancéreuses induite par les ligands d'AEBS en montrant sa capacité à stimuler la production de triglycérides en activant des gènes cibles lipogéniques de LXR β (Article 2). La production de triglycérides par les cellules mammaires lumineales fait partie de leur fonction principale lors de la lactation pour produire le lait⁶. Juste avant la lactation et pendant la lactation, il a été établi que l'expression de LXR α diminue alors que l'expression de LXR β reste constante⁶. La stimulation de la lipogenèse par le CES dans des cellules cancéreuses mammaires lumineales

et le maintien de l'expression de LXR β durant la lactation suggère que le CES puisse avoir un rôle dans un processus naturel de lactation dépendant de LXR β , ce qui pourrait être étudié sur des cellules mammaires lumineales. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une absence d'expression de SULT2B1b dans les cellules cancéreuses basales MDA-MB231 (Article 2). D'après l'histoire naturelle de ce type de cancer, ces cellules cancéreuses dérivent des cellules mammaires myoépithéliales qui ont des propriétés contractiles pour faciliter l'évacuation du lait par la glande mammaire, mais qui ne sont pas des cellules mammaires lactantes¹¹. Si le CES est impliqué dans la production et la sécrétion de triglycérides par les cellules mammaires, il est possible que l'expression de SULT2B1b ne soit pas retrouvée dans les cellules mammaires myoépithéliales puisque leur rôle biologique ne réside pas dans la production de lait. Dans ce cas, l'expression de SULT2B1b pourrait devenir un marqueur de discrimination entre les cellules mammaires myoépithéliales et les cellules mammaires lumineales. Notre étude suggère déjà que SULT2B1b pourrait devenir un marqueur de discrimination entre les cancers luminaux (MCF-7) et les cancers basals (MDA-MB231) (Article 2). Une étude de l'expression de SULT2B1b sur un plus vaste panel de lignées cellulaires cancéreuses lumineales et basales augmenterait la significativité de cette donnée et pourrait permettre de valider *in vitro* SULT2B1b comme biomarqueur des lignées cellulaires cancéreuses lumineales. En ce qui concerne la DDA, nous avons aussi mis en évidence qu'elle induit la différenciation de cellules cancéreuses mammaires en provoquant la sécrétion de triglycérides¹²⁴ (Article 5). Comme le CES, la DDA agit sur les gènes cibles de LXR β impliqués dans la lipogenèse ce qui suggère une similitude supplémentaire entre le CES et la DDA et leur ciblage commun de LXR β (Articles 1 et 2). Par conséquent, l'étude du CES et de la DDA dans la différenciation de l'épithélium mammaire avant la lactation pourrait mettre en lumière un rôle physiologique des LXRs dans ce processus. Nous avons déjà établi une implication de LXR β dans l'induction de la différenciation des cellules cancéreuses mammaires par les ligands d'AEBS (Article 2), ce qui peut motiver l'étude de LXR β dans la différenciation des cellules mammaires lumineales.

Le contexte biologique dans lequel se placent les LXRs ouvre la perspective de futures études sur les effets du CES et de la DDA sur le métabolisme des stérols et le métabolisme lipidique au niveau physiologique. Nous avons déjà montré que la régulation des gènes cibles des LXRs par le CES et la DDA sont en faveur d'une augmentation du taux intracellulaire de cholestérol avec une stimulation de l'expression du LDLR et une répression d'ABCA1, et d'une stimulation de la production de triglycérides avec une augmentation de l'expression de SCD1

(Articles 1 et 2). Ce profil transcriptionnel est néfaste dans le cadre de l'athérosclérose s'il est retrouvé dans les macrophages qui sont des acteurs clés de la formation de la plaque athéromateuse³²¹. En effet, l'augmentation du taux intracellulaire de cholestérol dans les macrophages conduit à un stockage accru d'esters de cholestérol après l'estérification du cholestérol par l'ACAT ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses qui entrent dans la composition de la plaque athéromateuse³⁶⁷. L'augmentation de la production de triglycérides peut conduire à une hypertriglycémie qui est aussi responsable de la formation de la plaque athéromateuse. Toutefois, nos résultats sont à relativiser puisqu'ils ont été obtenus sur des cellules cancéreuses. La lipogenèse et la cholestérogenèse sont suractivées dans les cancers et les cellules cancéreuses ne peuvent donc pas être représentatives des effets biologiques que l'on peut retrouver dans des cellules saines. Il sera donc intéressant et important de caractériser les effets de la DDA, et secondairement du CES, sur des macrophages en culture ainsi que sur des souris afin d'évaluer les effets secondaires de ces molécules sur le profil lipidique sérique. Ce type d'étude pourrait permettre d'anticiper les effets secondaires indésirables que pourrait avoir la DDA, qui est en phase pré-clinique pour une utilisation en thérapie anti-cancéreuse, sur les patients au cours des essais cliniques. Une augmentation éventuelle du taux sérique de triglycérides et/ou de cholestérol causée par la DDA pourrait être prévenue par un régime pauvre en cholestérol et en triglycérides, ce qui permettrait d'optimiser les traitements des patients avec la DDA et de la rendre plus efficace. Le problème du CES à ce sujet est différent puisqu'il est produit de façon endogène dans les cellules cancéreuses suite à un traitement avec les ligands d'AEBS dont le tamoxifène. Il a été montré par l'équipe de Marc Poirot que le tamoxifène est un inhibiteur de l'Acyl CoA Cholestérol Acyltransférase (ACAT) dans les macrophages, ce qui inhibe la formation de cellules spumeuses³⁶⁷. Si lors de futures études il est montré que le CES favorise la formation de cellules spumeuses, puisque dans notre cas sa production est provoquée par le tamoxifène, le tamoxifène inhiberait les effets du CES en inhibant l'ACAT. Toutefois, il a été montré que le tamoxifène induit une hypertriglycémie chez certaines patientes. En considérant les effets du CES que nous avons caractérisé, il est possible qu'il soit en partie responsable de l'hypertriglycémie provoquée par le tamoxifène.

Nous avons caractérisé que des ligands naturels d'AEBS sont capables d'inhiber l'activité ChEH et qu'ils induisent une accumulation de CE¹²¹. Par conséquent, ces ligands naturels peuvent potentiellement reproduire une partie des effets anti-cancéreux du tamoxifène et du PBPE que nous avons caractérisés (Article 2). Les acides gras insaturés inhibent l'activité

ChEH avec un K_i de l'ordre du micromolaire ¹²¹. L'acide docosahexaénoïque (DHA), qui est un acide gras polyinsaturé de type oméga-3, est le meilleur inhibiteur de l'activité ChEH parmi les acides gras insaturés que nous avons testés avec un K_i de 12 μM ¹²¹. Cette concentration correspond aux concentrations auxquelles le DHA induit la différenciation des cellules cancéreuses mammaires ⁴⁸³. Comme le tamoxifène, le DHA induit une production de triglycérides et un contrôle de la prolifération cellulaire dans des cellules cancéreuses mammaires ⁴⁸³. Il pourrait être intéressant de tester si les effets de différenciation cellulaire du DHA sur les cellules cancéreuses mammaires dépendent d'une accumulation de CE en inhibant l'activité ChEH. Toutefois, il est possible que le DHA reproduise une partie des effets des ligands d'AEBS en agissant directement sur le LXR β puisqu'il a été montré que des acides gras polyinsaturés dont le DHA sont des antagonistes des LXRs ^{268, 269}. Vu que nous avons caractérisé qu'un ligand antagoniste des LXRs, le CES, est responsable de la différenciation cellulaire induite par le tamoxifène, la possibilité d'une modulation de l'activité de LXR β par le DHA est aussi à envisager. En tenant compte des effets anti-cancéreux et chimiopréventifs du DHA ⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶, une implication de la voie ChEH-LXR β dans son activité anti-cancéreuse pourrait accroître l'intérêt du ciblage de cette voie pour le traitement et la chimioprévention des cancers et permettre une optimisation de traitements existants.

Les ligands d'AEBS induisent une accumulation d'oxystérols qui activent LXR β , ce qui constitue une part importante du mécanisme d'action anti-cancéreux des ligands d'AEBS (Article 2). Nous avons montré que les CE α s'accumulent et qu'une part de CE α est transformée en CES mais nous ne pouvons pas prétendre avoir identifié tous les oxystérols qui s'accumulent sous l'effet des ligands d'AEBS. Il est possible que d'autres formes sulfatées d'oxystérols s'accumulent. L'équipe de Marc Poirot avait établi que les ligands d'AEBS induisent une accumulation de zymostérol, de 7-déshydrocholestérol et de desmostérol ⁹³. La capacité de SULT2B1b à sulfater ces stérols n'a jamais été mise en évidence. Des études ultérieures pourraient caractériser si SULT2B1b est capable de sulfater ces stérols et si les formes sulfatées de ces stérols sont produites dans des cellules traitées avec les ligands d'AEBS. Ces oxystérols sulfates pourraient être impliqués dans les effets anti-cancéreux des ligands d'AEBS et éventuellement réguler l'activité transcriptionnelle des LXRs, ce qui étendrait plus largement le champ de connaissance sur la biologie des LXRs. Nous avons mis en évidence que le CE β s'accumule sous l'effet des ligands d'AEBS mais son mécanisme d'action est indépendant de LXR β (Article 2). Le CE β est impliqué dans la

cytotoxicité induite par les ligands d'AEBS, ce qui montre que le mode d'action de certains oxystérols qui sont responsables des effets des ligands d'AEBS ne dépend pas de LXR β . Le mécanisme de cytotoxicité du CE β a été caractérisé dans la littérature. La mort cellulaire induite par le CE β fait intervenir une apoptose qui ne dépend pas d'un processus oxydatif ni de la libération de cytochrome C de la mitochondrie mais qui est dépendant de l'activité de la caspase-2⁴⁸⁷⁻⁴⁸⁹. Un blocage des canaux calciques ou des calpaïnes inhibe l'apoptose induite par le CE β , ce qui montre que son mécanisme d'action cytotoxique passe par une perturbation de l'homéostasie du calcium. Des données de la littérature montrent que le tamoxifène induit une perturbation de la concentration intracellulaire en calcium qui est impliquée dans la cytotoxicité du tamoxifène⁴⁹⁰⁻⁴⁹². Il est donc possible que la mort cellulaire induite par le tamoxifène qui passe par un changement de la concentration calcique soit dépendante de l'accumulation de CE β . Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer les changements de la concentration intracellulaire en calcium sous l'effet des ligands d'AEBS afin de déterminer si AEBS est impliqué dans ce mécanisme. Cela constituerait une donnée préliminaire essentielle avant d'envisager que le CE β soit responsable de la cytotoxicité du tamoxifène calcium-dépendante. L'identification d'autres oxystérols qui s'accumulent ainsi que leur forme sulfatée permettrait d'établir un mécanisme d'action approfondie du tamoxifène en aval de sa liaison à AEBS. Les ligands d'AEBS pourraient aussi favoriser la production de DDA puisque l'hypothèse initiale de la biosynthèse de la DDA reposait sur l'accumulation de CE α induite par les ligands d'AEBS¹²⁴. Dans ce cas, la DDA pourrait faire partie des dérivés d'oxystérols qui pourraient s'accumuler dans les cellules traitées avec les ligands d'AEBS et participer à l'induction de leurs effets différenciants et cytotoxiques. En faveur de cette hypothèse, nous avons caractérisé que la DDA provoque des effets de différenciation cellulaire similaires à ceux induits par les ligands d'AEBS, avec une stimulation de la production de triglycérides par des cellules cancéreuses mammaires (Article 5). Nous avons montré que la différenciation cellulaire induite par les ligands d'AEBS est dépendante de LXR β , et la DDA est un ligand de LXR β (Article 1). En revanche, à la différence des ligands d'AEBS qui induisent une autophagie de survie, la DDA stimule une autophagie cytotoxique à des concentrations cytotoxiques (Article 1). A des concentrations inférieures où la DDA induit la différenciation cellulaire, il est possible qu'elle induise une autophagie qui n'est pas cytotoxique.

Désormais, nous avons mis au point un anticorps spécifique dirigé contre la DDA (Article 6). Nous pourrions l'utiliser dans cette possibilité d'étude visant à déterminer la production de

DDA dans des cellules traitées avec les ligands d'AEBS. Par ailleurs, l'anticorps anti-DDA pourra aussi aider à l'identification et à la caractérisation de l'enzyme putative responsable de la production de DDA.

L'étude du métabolisme du CE α nous a permis de découvrir l'existence de nouveaux métabolites possédant des propriétés anti-cancéreuses : le CES et la DDA. La découverte de leur mécanisme d'action qui implique communément le récepteur nucléaire LXR β ouvre un champ d'investigation très large qui peut inspirer une vaste diversité d'études. Les deux principales études que j'ai effectuées pendant ma thèse sont la continuité directe des travaux de l'équipe de Marc Poirot qui est la seule équipe au sein de la communauté scientifique à avoir continué au cours de ces dernières années l'étude fondamentale et approfondie de la biologie d'AEBS et de ses ligands. Au cours de ma thèse nous avons pu établir un trait d'union entre la biologie d'AEBS et la biologie des LXRs qui est intensément étudiée et fortement caractérisée. Premièrement, cela concrétise l'importance du ciblage d'AEBS par le tamoxifène puisque la caractérisation du mécanisme d'action dépendant de LXR β dévoile une voie plus claire entre AEBS et l'induction de la différenciation et de la mort cellulaire. Cette étude pourrait contribuer à la découverte de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse au tamoxifène. Deuxièmement, nous avons mis en évidence un nouveau métabolisme centré sur le CE α qui génère des antagonistes des LXRs, le CES et la DDA qui ont de fortes propriétés anti-cancéreuses. Cela pourrait ouvrir un champ d'investigation sur l'antagonisme des LXRs au vu des effets biologiques importants et d'intérêt thérapeutique du CES et de la DDA. De façon plus générale, l'étude exhaustive des métabolites issus du CE α ou de ses produits de transformation pourrait conduire à une compréhension complète et exploitable de cette voie métabolique. Troisièmement, l'étude d'AEBS a permis de découvrir une nouvelle molécule naturelle, la DDA, dont le fort potentiel en thérapie anti-cancéreuse a motivé son développement industriel. Le mécanisme d'action cytotoxique de la DDA que nous avons caractérisé pendant ma thèse et l'identification de la cible de la DDA que sont les LXRs pourront permettre de conduire plus efficacement des essais pré-cliniques et cliniques de la DDA, notamment pour la constitution des cohortes de patients pouvant répondre favorablement à un traitement par la DDA.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Peaker, M. The mammary gland in mammalian evolution: A brief commentary on some of the concepts. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **7**, 347-353 (2002).
2. Watson, C.J. & Khaled, W.T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* **135**, 995-1003 (2008).
3. Gjorevski, N. & Nelson, C.M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 581-593 (2011).
4. Hennighausen, L. & Robinson, G.W. Information networks in the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 715-725 (2005).
5. Smalley, M. & Ashworth, A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nature Reviews Cancer* **3**, 832-844 (2003).
6. Rudolph, M.C., Neville, M.C. & Anderson, S.M. Lipid synthesis in lactation: Diet and the fatty acid switch. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **12**, 269-281 (2007).
7. Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A. & Friis, R.R. Apoptotic cell-death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* **115**, 49-58 (1992).
8. Wiseman, B.S. & Werb, Z. Development - Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* **296**, 1046-1049 (2002).
9. Shackleton, M. *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**, 84-88 (2006).
10. Stingl, J. *et al.* Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**, 993-997 (2006).
11. LaMarca, H.L. & Rosen, J.M. Minireview: Hormones and mammary cell fate - What will I become when I grow up? *Endocrinology* **149**, 4317-4321 (2008).
12. Li, N. *et al.* Reciprocal intraepithelial interactions between TP63 and hedgehog signaling regulate quiescence and activation of progenitor elaboration by mammary stem cells. *Stem Cells* **26**, 1253-1264 (2008).
13. Ali, S. & Coombes, R.C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer* **2**, 101-+ (2002).
14. Stingl, J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Hormones & cancer* **2**, 85-90 (2011).
15. Asselin-Labat, M.L. *et al.* Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* **465**, 798-802 (2010).
16. Mallepell, S., Krust, A., Chambon, P. & Briskin, C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2196-2201 (2006).
17. Ciarloni, L., Mallepell, S. & Briskin, C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5455-5460 (2007).
18. Booth, B.W. *et al.* Amphiregulin mediates self-renewal in an immortal mammary epithelial cell line with stem cell characteristics. *Experimental Cell Research* **316**, 422-432 (2010).
19. Obr, A.E. & Edwards, D.P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **357**, 4-17 (2012).

20. Briskin, C. *et al.* A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5076-5081 (1998).
21. Briskin, C. *et al.* Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev.* **14**, 650-654 (2000).
22. Weigelt, B. & Reis, J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology* **6**, 718-730 (2009).
23. Perou, C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752 (2000).
24. Guedj, M. *et al.* A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* **31**, 1196-1206 (2012).
25. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869-10874 (2001).
26. Prat, A. & Perou, C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* **5**, 5-23 (2011).
27. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418-8423 (2003).
28. van't Veer, L.J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-536 (2002).
29. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
30. Stingl, J. & Caldas, C. Opinion - Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature Reviews Cancer* **7**, 791-799 (2007).
31. Asselin-Labat, M.L. *et al.* Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* **9**, 201-U103 (2007).
32. Mani, S.A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715 (2008).
33. Parton, M. & Smith, I.E. Controversies in the management of patients with breast cancer: Adjuvant endocrine therapy in premenopausal women. *J. Clin. Oncol.* **26**, 745-752 (2008).
34. Jordan, V.C. & O'Malley, B.W. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5815-5824 (2007).
35. Jordan, V.C. Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 205-213 (2003).
36. Fox, E.M., Andrade, J. & Shupnik, M.A. Novel actions of estrogen to promote proliferation: Integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* **74**, 622-627 (2009).
37. Ryan, W.G., Wolter, J. & Bagdade, J.D. Apparent beneficial effects of tamoxifen on bone mineral content in patient with breast cancer - preliminary study. *Osteoporosis International* **2**, 39-41 (1991).
38. Veronesi, U. *et al.* Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomised trial among hysterectomised women. *Lancet* **352**, 93-97 (1998).
39. Scott, S.M., Brown, M. & Come, S.E. Emerging data on the efficacy and safety of fulvestrant, a unique antiestrogen therapy for advanced breast cancer. *Expert Opinion on Drug Safety* **10**, 819-826 (2011).
40. Johnston, S.R.D. New Strategies in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **16**, 1979-1987 (2010).

41. Brunner, N. *et al.* MCF7/LCC9: An antiestrogen-resistant MCF-7 variant in which acquired resistance to the steroidal antiestrogen ICI 182,780 confers an early cross-resistance to the nonsteroidal antiestrogen tamoxifen. *Cancer Research* **57**, 3486-3493 (1997).
42. Santen, R.J., Brodie, H., Simpson, E.R., Siiteri, P.K. & Brodie, A. History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. *Endocr. Rev.* **30**, 343-375 (2009).
43. Lin, N.U. & Winer, E.P. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. *J. Clin. Oncol.* **26**, 798-805 (2008).
44. Thurlimann, B. *et al.* A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *New England Journal of Medicine* **353**, 2747-2757 (2005).
45. Harper, M.J. & Walpole, A.L. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature* **212**, 87 (1966).
46. Harper, M.J. & Walpole, A.L. Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. *The Journal of endocrinology* **37**, 83-92 (1967).
47. Williamson, J.G. & Ellis, J.D. The induction of ovulation by tamoxifen. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth* **80**, 844-847 (1973).
48. Cole, M.P., Jones, C.T. & Todd, I.D. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *British journal of cancer* **25**, 270-275 (1971).
49. Jordan, V.C. Effect of Tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinoma. *European Journal of Cancer* **12**, 419-424 (1976).
50. Jordan, V.C., Collins, M.M., Rowsby, L. & Prestwich, G. Monohydroxylated metabolite of Tamoxifen with potent anti-estrogenic activity. *J. Endocrinol.* **75**, 305-316 (1977).
51. Jordan, V.C. & Allen, K.E. Evaluation of the anti-tumor activity of the non-steroidal antioestrogen monohydroxytamoxifen in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *European Journal of Cancer* **16**, 239-251 (1980).
52. Baum, M. *et al.* Improved survival amongst patients treated with adjuvant Tamoxifen after mastectomy for early breast cancer. *Lancet* **2**, 450-450 (1983).
53. Poirot, M. Four decades of discovery in breast cancer research and treatment - an interview with V. Craig Jordan. *International Journal of Developmental Biology* **55**, 703-712 (2011).
54. McDonnell, D.P. & Wardell, S.E. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 620-628 (2010).
55. O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K. & Hansen, U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1859-1875 (2004).
56. Musgrove, E.A. & Sutherland, R.L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer* **9**, 631-643 (2009).
57. Brzozowski, A.M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758 (1997).
58. Shang, Y.F. & Brown, M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* **295**, 2465-2468 (2002).
59. Fornander, T. *et al.* Adjuvant Tamoxifen in early breast cancer - occurrence of new primary cancers. *Lancet* **1**, 117-120 (1989).

60. Fisher, B. *et al.* Endometrial cancer in Tamoxifen-treated breast cancer patients - findings from the national surgery adjuvant breast and Bowel project (NSABP) B-14. *Journal of the National Cancer Institute* **86**, 527-537 (1994).
61. Fisher, B. *et al.* Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1371-1388 (1998).
62. Vogel, V.G. *et al.* Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes - The NSABP study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* **295**, 2727-2741 (2006).
63. Jordan, V.C. Opinion - Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nature Reviews Cancer* **7**, 46-53 (2007).
64. Hammes, S.R. & Levin, E.R. Extranuclear steroid receptors: Nature and actions. *Endocr. Rev.* **28**, 726-741 (2007).
65. Simoncini, T. *et al.* Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**, 538-541 (2000).
66. Zheng, A.P., Kallio, A. & Harkonen, P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* **148**, 2764-2777 (2007).
67. Lam, L., Hu, X.Y., Aktary, Z., Andrews, D.W. & Pasdar, M. Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ER alpha. *Breast Cancer Research and Treatment* **118**, 605-621 (2009).
68. Prossnitz, E.R. *et al.* Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GrPR30, in *Annual Review of Physiology*, Vol. 70 165-190 (2008).
69. Vivacqua, A. *et al.* The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **20**, 631-646 (2006).
70. Shevde, N.K., Bendixen, A.C., Dienger, K.M. & Pike, J.W. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7829-7834 (2000).
71. Nakamura, T. *et al.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* **130**, 811-823 (2007).
72. Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. & Kato, S. Minireview: Osteoprotective Action of Estrogens Is Mediated by Osteoclastic Estrogen Receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **24**, 877-885 (2010).
73. Delmas, P.D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* **359**, 2018-2026 (2002).
74. Love, R.R. *et al.* Effects of Tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *New England Journal of Medicine* **326**, 852-856 (1992).
75. Delmas, P.D. *et al.* Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine* **337**, 1641-1647 (1997).
76. Walsh, B.W. *et al.* Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *Jama-Journal of the American Medical Association* **279**, 1445-1451 (1998).

77. Reckless, J., Metcalfe, J.C. & Grainger, D.J. Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* **95**, 1542-1548 (1997).
78. Hozumi, Y., Kawano, M., Saito, T. & Miyata, M. Effect of tamoxifen on serum lipid metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83**, 1633-1635 (1998).
79. Hozumi, Y., Kawano, M. & Jordan, V.C. In vitro study of the effect of raloxifene on lipid metabolism compared with tamoxifen. *European Journal of Endocrinology* **143**, 427-430 (2000).
80. Liu, C.L. & Yang, T.L. Sequential changes in serum triglyceride levels during adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients and the effect of dose reduction. *Breast Cancer Research and Treatment* **79**, 11-16 (2003).
81. Babu, J.R. *et al.* Salubrious effect of vitamin C and vitamin E on tamoxifen-treated women in breast cancer with reference to plasma lipid and lipoprotein levels. *Cancer Letters* **151**, 1-5 (2000).
82. Sutherland, R.L., Murphy, L.C., Foo, M.S., Green, M.D. & Whybourne, A.M. High affinity anti-estrogen binding site distinct from the estrogen receptor. *Nature* **288**, 273-275 (1980).
83. Faye, J.C., Lasserre, B. & Bayard, F. Anti-estrogen specific, high affinity saturable binding sites in rat uterine cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 1225-1231 (1980).
84. Parisot, J.P. *et al.* The pure antiestrogen ICI-182,780 binds to a high affinity site distinct from the estrogen receptor. *International Journal of Cancer* **62**, 480-484 (1995).
85. Murphy, L.C. & Sutherland, R.L. Modifications in the aminoether side-chain of clomiphene influence affinity for a specific anti-estrogen binding site in MCF-7 cell cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1353-1360 (1981).
86. Faye, J.C., Jozan, S., Redeuilh, G., Baulieu, E.E. & Bayard, F. Physicochemical and genetic evidence for specific anti-estrogen binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**, 3158-3162 (1983).
87. Chouvet, C. & Saez, S. High affinity cytosol binding site(s) for antiestrogens in 2 human breast cancer cell lines and in biopsy specimens devoid of estrogen receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **21**, 755-761 (1984).
88. Brandes, L.J. & Hermonat, M.W. A diphenylmethane derivative specific for the antiestrogen binding site found in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 724-728 (1984).
89. Brandes, L.J. A diphenylmethane derivative selective for the antiestrogen binding site may help define its biological role. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**, 244-249 (1984).
90. Watts, C.K.W. & Sutherland, R.L. High affinity specific antiestrogen binding sites are concentrated in rough microsomal membranes of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 109-115 (1984).
91. Watts, C.K.W., Murphy, L.C. & Sutherland, R.L. Microsomal binding sites for non steroidal antiestrogens in MCF-7 human mammary carcinoma cells - demonstration of high affinity and narrow specificity for basic ether derivatives of triphenylethylene. *J. Biol. Chem.* **259**, 4223-4229 (1984).
92. Sheen, Y.Y., Simpson, D.M. & Katzenellenbogen, B.S. An evaluation of the role of antiestrogen binding sites in mediating the growth modulatory effects of antiestrogens - studies using tert-butylphenoxyethyl diethylamine, a compound lacking affinity for the estrogen receptor. *Endocrinology* **117**, 561-564 (1985).

93. Kedjouar, B. *et al.* Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J. Biol. Chem.* **279**, 34048-34061 (2004).
94. Fargin, A. *et al.* Further evidence for a biological role of antiestrogen binding sites in mediating the growth inhibitory action of diphenylmethane derivatives. *Chemico-Biological Interactions* **66**, 101-109 (1988).
95. Poirot, M. *et al.* The antiproliferative properties of 4-benzylphenoxy ethanamine derivatives are mediated by the antiestrogen binding site (ABS) whereas the antiestrogenic effects of trifluopromazine are not. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 425-429 (1990).
96. McClay, E.F., Mastrangelo, M.J., Sprandio, J.D., Bellet, R.E. & Berd, D. The importance of Tamoxifen to a cisplatin-containing regimen in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer* **63**, 1292-1295 (1989).
97. McClay, E.F., Albright, K.D., Jones, J.A., Christen, R.D. & Howell, S.B. Tamoxifen modulation of cisplatin sensitivity in human malignant melanoma cells. *Cancer Research* **53**, 1571-1576 (1993).
98. Jones, J.A., Albright, K.D., Christen, R.D., Howell, S.B. & McClay, E.F. Synergy between tamoxifen and cisplatin in human melanoma cells is dependent on the presence of antiestrogen-binding sites. *Cancer Research* **57**, 2657-2660 (1997).
99. Tang, B.L., Teo, C.C., Sim, K.Y., Ng, M.L. & Kon, O.L. Cytostatic effect of antiestrogens in lymphoid cells - relationship to high affinity antiestrogen binding sites and cholesterol. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1014**, 162-172 (1989).
100. Teo, C.C., Kon, O.L., Sim, K.Y. & Ng, S.C. Synthesis of 2-(para-chlorobenzyl)-3-aryl-6-methoxybenzofurans as selective ligands for antiestrogen binding sites - effects on cell proliferation and cholesterol synthesis. *J. Med. Chem.* **35**, 1330-1339 (1992).
101. Hwang, P.L.H. & Matin, A. Interactions of sterols with antiestrogen binding sites - structural requirements for high affinity binding. *J. Lipid Res.* **30**, 239-245 (1989).
102. Hwang, P.L.H. High affinity binding sites for oxygenated sterols in rat liver microsomes - possible identity with antiestrogen binding sites. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1033**, 154-161 (1990).
103. Li, L. & Hwang, P.L. Antiproliferative effects of oxygenated sterols - positive correlation with binding affinities for the antiestrogen binding sites. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1082**, 177-184 (1991).
104. Paul, R. *et al.* Both the immunosuppressant SR31747 and the antiestrogen tamoxifen bind to an emopamil-insensitive site of mammalian Delta 8-Delta 7 sterol isomerase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**, 1296-1302 (1998).
105. Hwang, P.L.H. Interaction of unsaturated fatty acids with antiestrogen binding sites. *Biochem. J.* **243**, 359-364 (1987).
106. Hwang, P.L.H. Unsaturated fatty acids as endogenous inhibitors of tamoxifen binding to antiestrogen binding sites. *Biochem. J.* **237**, 749-755 (1986).
107. Poirot, M., Chailleux, C., Fargin, A., Bayard, F. & Faye, J.C. A potent and selective photoaffinity probe for the antiestrogen binding site of rat liver. *J. Biol. Chem.* **265**, 17039-17043 (1990).
108. Poirot, M., Chailleux, C., Mesange, F., Bayard, F. & Faye, J.C. Characterization of the membranous antiestrogen binding protein.2. Purification to homogeneity. *Journal of Receptor Research* **14**, 37-46 (1994).

109. Mesange, F. *et al.* Microsomal epoxide hydrolase of rat liver is a subunit of the anti-oestrogen-binding site. *Biochem. J.* **334**, 107-112 (1998).
110. Fritz, P. *et al.* Microsomal epoxide hydrolase expression as a predictor of tamoxifen response in primary breast cancer: A retrospective exploratory study with long-term follow-up. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3-9 (2001).
111. Mesange, F. *et al.* Identification of two tamoxifen target proteins by photolabeling with 4-(2-morpholinoethoxy)benzophenone. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 766-772 (2002).
112. Watts, C.K.W. & Sutherland, R.L. Studies on the ligand specificity and potential identity of microsomal antiestrogen binding sites. *Mol. Pharmacol.* **31**, 541-551 (1987).
113. Delarue, F. *et al.* Modifications of benzylphenoxy ethanamine antiestrogen molecules: Influence affinity for antiestrogen binding site (AEBS) and cell cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 657-661 (1999).
114. Moebius, F.F. *et al.* Pharmacological analysis of sterol Delta 8-Delta 7 isomerase proteins with [H-3]ifenprodil. *Mol. Pharmacol.* **54**, 591-598 (1998).
115. de Medina, P. *et al.* Importance of cholesterol and oxysterols metabolism in the pharmacology of tamoxifen and other AEBS ligands. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 432-437 (2011).
116. Payre, B. *et al.* Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3707-3718 (2008).
117. de Medina, P. *et al.* Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ.* **16**, 1372-1384 (2009).
118. Gill, S., Chow, R. & Brown, A.J. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lipid Res.* **47**, 391-404 (2008).
119. Kalaany, N.Y. & Mangelsdorf, D.J. LXRs AND FXR: The Yin and Yang of cholesterol and fat metabolism, in *Annual Review of Physiology*, Vol. 68 159-191 (2006).
120. Valledor, A.F. *et al.* Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17813-17818 (2004).
121. de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13520-13525 (2010).
122. Nashed, N.T., Michaud, D.P., Levin, W. & Jerina, D.M. Properties of liver microsomal cholesterol 5,6-oxide hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 149-162 (1985).
123. Sevanian, A. & McLeod, L.L. Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **261**, 54-59 (1986).
124. de Medina, P., Paillasse, M.R., Payre, B., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Synthesis of New Alkylaminooxysterols with Potent Cell Differentiating Activities: Identification of Leads for the Treatment of Cancer and Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **52**, 7765-7777 (2009).
125. Brandes, L.J. & Macdonald, L.M. Evidence that the antiestrogen binding site is a histamine or histamine-like receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 905-910 (1985).
126. Berrodin, T.J. *et al.* Identification of 5 alpha,6 alpha-Epoxycholesterol as a Novel Modulator of Liver X Receptor Activity. *Mol. Pharmacol.* **78**, 1046-1058 (2010).
127. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 685-704 (2006).

128. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950-964 (2004).
129. Metivier, R. *et al.* Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751-763 (2003).
130. Lonard, D.M. & O'Malley, B.W. Nuclear receptor coregulators: Judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell* **27**, 691-700 (2007).
131. Phelps, C. *et al.* Fungi and animals may share a common ancestor to nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7077-7081 (2006).
132. Auwerx, J. *et al.* A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163 (1999).
133. Kumar, R. & Thompson, E.B. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: Protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1-10 (2003).
134. Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P.H. & Gustafsson, J.A. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: Molecular strategies for transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1901-1909 (2003).
135. Hilser, V.J. & Thompson, E.B. Structural Dynamics, Intrinsic Disorder, and Allostery in Nuclear Receptors as Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* **286**, 39675-39682 (2011).
136. Khan, S.H., Ling, J. & Kumar, R. TBP Binding-Induced Folding of the Glucocorticoid Receptor AF1 Domain Facilitates Its Interaction with Steroid Receptor Coactivator-1. *PLoS One* **6**, 10 (2011).
137. Kumar, R., Betney, R., Li, J.Q., Thompson, E.B. & McEwan, I.J. Induced alpha-helix structure in AF1 of the androgen receptor upon binding transcription factor TFIIIF. *Biochemistry* **43**, 3008-3013 (2004).
138. Garza, A.M.S., Khan, S.H. & Kumar, R. Site-Specific Phosphorylation Induces Functionally Active Conformation in the Intrinsically Disordered N-Terminal Activation Function (AF1) Domain of the Glucocorticoid Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 220-230 (2010).
139. Garza, A.S., Khan, S.H., Moure, C.M., Edwards, D.P. & Kumar, R. Binding-Folding Induced Regulation of AF1 Transactivation Domain of the Glucocorticoid Receptor by a Cofactor That Binds to Its DNA Binding Domain. *PLoS One* **6**, 9 (2011).
140. Rochette-Egly, C. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell. Signal.* **15**, 355-366 (2003).
141. Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P. & Gronemeyer, H. The contribution of the N-terminal and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2581-2595 (1989).
142. Miesfeld, R., Godowski, P.J., Maler, B.A. & Yamamoto, K.R. Glucocorticoid receptors mutants that define a small region sufficient for enhancer activation. *Science* **236**, 423-427 (1987).
143. Chen, M.Y., Beaven, S. & Tontonoz, P. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J. Lipid Res.* **46**, 2570-2579 (2005).
144. Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850 (1995).
145. Giguere, V. Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocr. Rev.* **20**, 689-725 (1999).

146. Luisi, B.F. *et al.* Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**, 497-505 (1991).
147. Bain, D.L., Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D. & Miura, M.T. Nuclear receptor structure: Implications for function, in *Annual Review of Physiology*, Vol. 69 201-220 (Annual Reviews, Palo Alto; 2007).
148. Shaffer, P.L. & Gewirth, D.T. Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements. *Embo J.* **21**, 2242-2252 (2002).
149. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **81**, 1269-1304 (2001).
150. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* **375**, 377-382 (1995).
151. Li, Y., Lambert, M.H. & Xu, H.E. Activation of nuclear receptors: A perspective from structural genomics. *Structure* **11**, 741-746 (2003).
152. Farnegardh, M. *et al.* The three-dimensional structure of the liver X receptor beta reveals a flexible ligand-binding pocket that can accommodate fundamentally different ligands. *J. Biol. Chem.* **278**, 38821-38828 (2003).
153. Hoerer, S., Schmid, A., Heckel, A., Budzinski, R.M. & Nar, H. Crystal structure of the human liver X receptor beta ligand-binding domain in complex with a synthetic agonist. *J. Mol. Biol.* **334**, 853-861 (2003).
154. Svensson, S. *et al.* Crystal structure of the heterodimeric complex of LXR alpha and RXR beta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *Embo J.* **22**, 4625-4633 (2003).
155. Williams, S. *et al.* X-ray crystal structure of the liver X receptor beta ligand binding domain - Regulation by a histidine-tryptophan switch. *J. Biol. Chem.* **278**, 27138-27143 (2003).
156. Urban, F. *et al.* The important role of residue F268 in ligand binding by LXR beta. *FEBS Lett.* **484**, 159-163 (2000).
157. Endo-Umeda, K. *et al.* Differential Expression and Function of Alternative Splicing Variants of Human Liver X Receptor alpha. *Mol. Pharmacol.* **81**, 800-810 (2012).
158. Perissi, V. & Rosenfeld, M.G. Controlling nuclear receptors: The circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 542-554 (2005).
159. Black, B.E. & Paschal, B.M. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**, 411-417 (2004).
160. Zelcer, N. & Tontonoz, P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 607-614 (2006).
161. Benoit, G. *et al.* International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 798-836 (2006).
162. Lu, N.Z. *et al.* International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: Glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 782-797 (2006).
163. Rochel, N. *et al.* Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 564-U207 (2011).
164. Willy, P.J. & Mangelsdorf, D.J. Unique requirements for retinoid dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev.* **11**, 289-298 (1997).

165. Pan, Y.P., Tsai, C.J., Ma, B.Y. & Nussinov, R. How do transcription factors select specific binding sites in the genome? *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1118-1120 (2009).
166. Lefterova, M.I. *et al.* Cell-Specific Determinants of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Function in Adipocytes and Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2078-2089 (2010).
167. Kurokawa, R. *et al.* Regulation of retinoid signaling by receptor polarity and allosteric control of ligand-binding. *Nature* **371**, 528-531 (1994).
168. Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. & Desvergne, B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) retinoid X receptor heterodimer binding to DNA - A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J. Biol. Chem.* **272**, 20108-20117 (1997).
169. Chandra, V. *et al.* Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350-U333 (2008).
170. Zhao, Q. *et al.* Structural basis of RXR-DNA interactions. *J. Mol. Biol.* **296**, 509-520 (2000).
171. Shulman, A.I., Larson, C., Mangelsdorf, D.J. & Ranganathan, R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **116**, 417-429 (2004).
172. Fradera, X. *et al.* X-Ray Structures of the LXR alpha LBD in Its Homodimeric Form and Implications for Heterodimer Signaling. *J. Mol. Biol.* **399**, 120-132 (2010).
173. de Lera, A.R., Bourguet, W., Altucci, L. & Gronemeyer, H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 811-820 (2007).
174. Nettles, K.W. & Greene, G.L. Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors, in *Annual Review of Physiology*, Vol. 67 309-333 (Annual Reviews, Palo Alto; 2005).
175. Savkur, R.S., Bramlett, K.S., Clawson, D. & Burris, T.P. Pharmacology of nuclear receptor-coregulator recognition. *Nuclear Receptor Coregulators* **68**, 145-183 (2004).
176. Reid, G. *et al.* Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER alpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol. Cell* **11**, 695-707 (2003).
177. Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L. & O'Malley, B.W. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol. Cell* **5**, 939-948 (2000).
178. Kopf, E. *et al.* Dimerization with retinoid x receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 33280-33288 (2000).
179. Alarid, E.T. Lives and times of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1972-1981 (2006).
180. Verma, S. *et al.* The ubiquitin-conjugating enzyme UBCH7 acts as a coactivator for steroid hormone receptors. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8716-8726 (2004).
181. Li, X. *et al.* SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* **28**, 91-106 (2007).
182. Kim, K.H. *et al.* Liver X Receptor Ligands Suppress Ubiquitination and Degradation of LXR alpha by Displacing BARD1/BRCA1. *Mol. Endocrinol.* **23**, 466-474 (2009).
183. Putcha, B.D.K. & Fernandez, E.J. Direct Interdomain Interactions Can Mediate Allosterism in the Thyroid Receptor. *J. Biol. Chem.* **284**, 22517-22524 (2009).

184. Kumar, R., Lee, J.C., Bolen, D.W. & Thompson, E.B. The conformation of the glucocorticoid receptor AF1/tau1 domain induced by osmolyte binds co-regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 18146-18152 (2001).
185. Kumar, R. *et al.* Interdomain signaling in a two-domain fragment of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 24737-24741 (1999).
186. Meijssing, S.H. *et al.* DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science* **324**, 407-410 (2009).
187. Gronemeyer, H. & Bourguet, W. Allosteric Effects Govern Nuclear Receptor Action: DNA Appears as a Player. *Sci. Signal.* **2**, 3 (2009).
188. Zhang, J. *et al.* DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR-RXR complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 556-U172 (2011).
189. Surjit, M. *et al.* Widespread Negative Response Elements Mediate Direct Repression by Agonist-Liganded Glucocorticoid Receptor. *Cell* **145**, 224-241 (2011).
190. Wang, Y. *et al.* Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXR alpha. *J. Biol. Chem.* **283**, 26332-26339 (2008).
191. Son, Y.L., Park, O.G., Kim, G.S., Lee, J.W. & Lee, Y.C. RXR heterodimerization allosterically activates LXR binding to the second NR box of activating signal co-integrator-2. *Biochem. J.* **410**, 319-330 (2008).
192. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappa B. *Oncogene* **25**, 6868-6886 (2006).
193. Santos, G.M., Fairall, L. & Schwabe, J.W.R. Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 87-93 (2011).
194. Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213-219 (2003).
195. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPAR gamma. *Mol. Cell* **25**, 57-70 (2007).
196. Lee, J.H. *et al.* Differential SUMOylation of LXR alpha and LXR beta Mediates Transrepression of STAT1 Inflammatory Signaling in IFN-gamma-Stimulated Brain Astrocytes. *Mol. Cell* **35**, 806-817 (2009).
197. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXR beta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381-395 (2010).
198. Chao, E.Y. *et al.* Structure-guided design of N-phenyl tertiary Amines as transrepression-selective liver X receptor modulators with anti-inflammatory activity. *J. Med. Chem.* **51**, 5758-5765 (2008).
199. Bensinger, S.J. & Tontonoz, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* **454**, 470-477 (2008).
200. Ogawa, D. *et al.* Liver X receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ.Res.* **96**, 59-67 (2005).
201. Castrillo, A. *et al.* Crosstalk between LXR and Toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol. Cell* **12**, 805-816 (2003).

202. Hao, X.R. *et al.* IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR alpha in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis* **203**, 417-428 (2009).
203. Krycer, J.R. & Brown, A.J. Cross-talk between the Androgen Receptor and the Liver X Receptor : implications for cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **286**, 20637-20647 (2011).
204. Kawai, K. *et al.* Unliganded thyroid hormone receptor-beta 1 represses liver X receptor alpha/oxysterol-dependent transactivation. *Endocrinology* **145**, 5515-5524 (2004).
205. Hashimoto, K. *et al.* Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *J. Biol. Chem.* **281**, 295-302 (2006).
206. Hashimoto, K. & Mori, M. Crosstalk of thyroid hormone receptor and liver X receptor in lipid metabolism and beyond. *Endocr. J.* **58**, 921-930 (2011).
207. Hashimoto, K., Matsumoto, S., Yamada, M., Satoh, T. & Mori, M. Liver X receptor-alpha gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* **148**, 4667-4675 (2007).
208. Laffitte, B.A. *et al.* Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7558-7568 (2001).
209. Gong, H.B. *et al.* Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1781-1790 (2007).
210. Patel, R. *et al.* LXR beta is required for glucocorticoid-induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 431-441 (2011).
211. Stulnig, T.M., Oppermann, U., Steffensen, K.R., Schuster, G.U. & Gustafsson, J.A. Liver X receptors downregulate 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Diabetes* **51**, 2426-2433 (2002).
212. Steffensen, K.R., Holter, E., Alikhani, N., Eskild, W. & Gustafsson, J.A. Glucocorticoid response and promoter occupancy of the mouse LXR alpha gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 716-724 (2003).
213. Li, T.G., Chen, W.L. & Chiang, J.Y.L. PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine. *J. Lipid Res.* **48**, 373-384 (2007).
214. Lehmann, J.M. *et al.* The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102**, 1016-1023 (1998).
215. Honda, A. *et al.* Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A. *J. Lipid Res.* **52**, 1509-1516 (2011).
216. Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R. & Mangelsdorf, D.J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728-731 (1996).
217. Janowski, B.A. *et al.* Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR alpha and LXR beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 266-271 (1999).
218. Handschin, C. & Meyer, U.A. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 387-396 (2005).
219. Yoshikawa, T. *et al.* Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1240-1254 (2003).

220. Ide, T. *et al.* Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1255-1267 (2003).
221. Matsusue, K., Miyoshi, A., Yamano, S. & Gonzalez, F.J. Ligand-activated PPAR beta efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR. *Mol. Cell. Endocrinol.* **256**, 23-33 (2006).
222. Colin, S. *et al.* Intestine-specific regulation of PPAR alpha gene transcription by liver X receptors. *Endocrinology* **149**, 5128-5135 (2008).
223. Boergesen, M. *et al.* Genome-Wide Profiling of Liver X Receptor, Retinoid X Receptor, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Mouse Liver Reveals Extensive Sharing of Binding Sites. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 852-867 (2012).
224. Yue, L.D. *et al.* Ligand-binding regulation of LXR/RXR and LXR/PPAR heterodimerizations: SPR technology-based kinetic analysis correlated with molecular dynamics simulation. *Protein Sci.* **14**, 812-822 (2005).
225. Zhai, Y.G. *et al.* A Functional Cross-Talk between Liver X Receptor-alpha and Constitutive Androstane Receptor Links Lipogenesis and Xenobiotic Responses. *Mol. Pharmacol.* **78**, 666-674 (2010).
226. Wada, T., Kang, H.S., Jetten, A.M. & Xie, W. The emerging role of nuclear receptor ROR alpha and its crosstalk with LXR in xeno- and endobiotic gene regulation. *Exp. Biol. Med.* **233**, 1191-1201 (2008).
227. Wada, T. *et al.* Identification of oxysterol 7 alpha-hydroxylase (Cyp7b1) as a novel retinoid-related orphan receptor alpha (ROR alpha) (NR1F1) target gene and a functional cross-talk between ROR alpha and liver X receptor (NR1H3). *Mol. Pharmacol.* **73**, 891-899 (2008).
228. Xiao, L., Xie, X.N. & Zhai, Y.G. Functional crosstalk of CAR-LXR and ROR-LXR in drug metabolism and lipid metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 1316-1321 (2010).
229. Jiang, W. *et al.* Inhibition of LXR alpha signaling by vitamin D receptor: Possible role of VDR in bile acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 176-184 (2006).
230. Fontaine, C. *et al.* The nuclear receptor Rev-erb alpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1797-1811 (2008).
231. Kim, W.K. *et al.* Negative Regulation of Hedgehog Signaling by Liver X Receptors. *Mol. Endocrinol.* **23**, 1532-1543 (2009).
232. Kim, W.K. *et al.* Osteogenic Oxysterol, 20(S)-Hydroxycholesterol, Induces Notch Target Gene Expression in Bone Marrow Stromal Cells. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 782-795 (2010).
233. Na, T.Y. *et al.* Positive Cross-Talk Between Hypoxia Inducible Factor-1 alpha and Liver X Receptor alpha Induces Formation of Triglyceride-Loaded Foam Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949-U2481 (2011).
234. Uno, S. *et al.* Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 186-195 (2009).
235. Makoukji, J. *et al.* Interplay between LXR and Wnt/beta-Catenin Signaling in the Negative Regulation of Peripheral Myelin Genes by Oxysterols. *J. Neurosci.* **31**, 9620-9629 (2011).
236. Iwano, S., Shibahara, N., Saito, T. & Kamataki, T. Activation of p53 as a causal step for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEBS Lett.* **580**, 890-893 (2006).

237. Berrabah, W., Aumercier, P., Lefebvre, P. & Staels, B. Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. *FEBS Lett.* **585**, 1640-1650 (2011).
238. Chen, M.Y., Bradley, M.N., Beaven, S.W. & Tontonoz, P. Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Lett.* **580**, 4835-4841 (2006).
239. Yamamoto, T. *et al.* Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J. Biol. Chem.* **282**, 11687-11695 (2007).
240. Wu, H.M., Yang, Y.M. & Kim, S.G. Rimonabant, a Cannabinoid Receptor Type 1 Inverse Agonist, Inhibits Hepatocyte Lipogenesis by Activating Liver Kinase B1 and AMP-Activated Protein Kinase Axis Downstream of G alpha(i/o) Inhibition. *Mol. Pharmacol.* **80**, 859-869 (2011).
241. Delvecchio, C.J. & Capone, J.P. Protein kinase C alpha modulates liver X receptor alpha transactivation. *J. Endocrinol.* **197**, 121-130 (2008).
242. Torra, I.P. *et al.* Phosphorylation of liver x receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2626-2636 (2008).
243. Kim, Y.M. *et al.* Inhibition of liver X receptor-alpha-dependent hepatic steatosis by isoliquiritigenin, a licorice antioxidant flavonoid, as mediated by JNK1 inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1722-1734 (2010).
244. Hwahng, S.H., Ki, S.H., Bae, E.J., Kim, H.E. & Kim, S.G. Role of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase-p70 Ribosomal S6 Kinase-1 Pathway in Repression of Liver X Receptor-Alpha-Dependent Lipogenic Gene Induction and Hepatic Steatosis by a Novel Class of Dithiolethiones. *Hepatology* **49**, 1913-1925 (2009).
245. Tamura, K. *et al.* LXR alpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8513-8518 (2000).
246. Mo, J.Y., Fang, S.J.J., Chen, W. & Blobel, G.C. Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXR beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 50788-50794 (2002).
247. Huwait, E.A., Greenow, K.R., Singh, N.N. & Ramji, D.P. A novel role for c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver X receptor-mediated induction of macrophage gene expression. *Cell. Signal.* **23**, 542-549 (2011).
248. Wang, C.G., Tian, L.F., Popov, V.M. & Pestell, R.G. Acetylation and nuclear receptor action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **123**, 91-100 (2011).
249. Treuter, E. & Venteclef, N. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **1812**, 909-918 (2011).
250. Treuter, E. & Gustafsson, J.A. Wrestling rules in transrepression: As easy as SUMO-1,-2,-3? *Mol. Cell* **25**, 178-180 (2007).
251. Anthonisen, E.H. *et al.* Nuclear Receptor Liver X Receptor Is O-GlcNAc-modified in Response to Glucose. *J. Biol. Chem.* **285**, 1607-1615 (2010).
252. Yang, C.D. *et al.* Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **281**, 27816-27826 (2006).
253. Schultz, J.R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831-2838 (2000).
254. Spencer, T.A. *et al.* Pharmacophore analysis of the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *J. Med. Chem.* **44**, 886-897 (2001).

255. Zuercher, W.J. *et al.* Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **53**, 3412-3416 (2010).
256. Davies, J.D. *et al.* Adipocytic differentiation and liver X receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 3911-3919 (2005).
257. Fu, X. *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 38378-38387 (2001).
258. Marwarha, G., Rhen, T., Schommer, T. & Ghribi, O. The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates alpha-synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors-relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **119**, 1119-1136 (2011).
259. Ma, Y.J. *et al.* 25-Hydroxycholesterol-3-sulfate regulates macrophage lipid metabolism via the LXR/SREBP-1 signaling pathway. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **295**, E1369-E1379 (2008).
260. Song, C., Hiipakka, R.A. & Liao, S.S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* **66**, 473-479 (2001).
261. Cook, I.T., Duniec-Dmuchowski, Z., Kocarek, T.A., Runge-Morris, M. & Falany, C.N. 24-Hydroxycholesterol Sulfation by Human Cytosolic Sulfotransferases: Formation of Monosulfates and Disulfates, Molecular Modeling, Sulfatase Sensitivity, and Inhibition of Liver X Receptor Activation. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 2069-2078 (2009).
262. Fuda, H., Lee, Y.C., Shimizu, C., Javitt, N.B. & Strott, C.A. Mutational analysis of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 isoforms reveals that exon 1B of the SULT2B1 gene produces cholesterol sulfotransferase, whereas exon 1A yields pregnenolone sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 36161-36166 (2002).
263. Chen, W.L., Chen, G.X., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J. & Russell, D.W. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* **5**, 73-79 (2007).
264. Villablanca, E.J. *et al.* Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat. Med.* **16**, 98-U137 (2010).
265. Gan, X.D. *et al.* Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **276**, 48702-48708 (2001).
266. Yang, C.M., Lu, I.H., Chen, H.Y. & Hu, M.L. Lycopene inhibits the proliferation of androgen-dependent human prostate tumor cells through activation of PPAR gamma-LXR alpha-ABCA1 pathway. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 8-17 (2012).
267. Aye, I., Waddell, B.J., Mark, P.J. & Keelan, J.A. Oxysterols inhibit differentiation and fusion of term primary trophoblasts by activating liver X receptors. *Placenta* **32**, 183-191 (2011).
268. Ou, J.F. *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6027-6032 (2001).
269. Yoshikawa, T. *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 1705-1711 (2002).

270. Chen, G.X., Liang, G.S., Ou, J.F., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11245-11250 (2004).
271. Smith, C.L. & O'Malley, B.W. Coregulator function: A key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.* **25**, 45-71 (2004).
272. Jordan, V.C. Selective estrogen receptor modulation: Concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* **5**, 207-213 (2004).
273. Li, X.L., Yeh, V. & Molteni, V. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007-2009). *Expert Opin. Ther. Patents* **20**, 535-562 (2010).
274. Collins, J.L. *et al.* Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J. Med. Chem.* **45**, 1963-1966 (2002).
275. Hu, B.H. *et al.* Identification of Phenylsulfone-Substituted Quinoxaline (WYE-672) as a Tissue Selective Liver X-receptor (LXR) Agonist. *J. Med. Chem.* **53**, 3296-3304 (2010).
276. Wrobel, J. *et al.* Indazole-Based Liver X Receptor (LXR) Modulators with Maintained Atherosclerotic Lesion Reduction Activity but Diminished Stimulation of Hepatic Triglyceride Synthesis. *J. Med. Chem.* **51**, 7161-7168 (2008).
277. Albers, M. *et al.* A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands - Competitive recruitment of activators and repressors. *J. Biol. Chem.* **281**, 4920-4930 (2006).
278. Phelan, C.A. *et al.* Selective partial agonism of liver X receptor alpha is related to differential corepressor recruitment. *Mol. Endocrinol.* **22**, 2241-2249 (2008).
279. Schmidt, R.J. *et al.* A 15-ketosterol is a liver X receptor ligand that suppresses sterol-responsive element binding protein-2 activity. *J. Lipid Res.* **47**, 1037-1044 (2006).
280. Thomas, J. *et al.* A chemical switch regulates fibrates specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) versus liver X receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 2403-2410 (2003).
281. Viennois, E. *et al.* Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 219-232 (2011).
282. Wang, Y.J., Kumar, N., Crumbley, C., Griffin, P.R. & Burris, T.P. A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of ROR alpha and ROR gamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 917-923 (2010).
283. Jin, L.H. *et al.* Structural Basis for Hydroxycholesterols as Natural Ligands of Orphan Nuclear Receptor ROR gamma. *Mol. Endocrinol.* **24**, 923-929 (2010).
284. Houck, K.A. *et al.* T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* **83**, 184-187 (2004).
285. Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A. & Saez, E. T0901317 is a potent PXR ligand: Implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* **581**, 1721-1726 (2007).
286. Chuu, C.P. *et al.* The liver X receptor agonist T0901317 acts as androgen receptor antagonist in human prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 341-346 (2007).
287. Kumar, N. *et al.* The Benzenesulfoamide T0901317 [N-(2,2,2-Trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] Is a Novel Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor-alpha/gamma Inverse Agonist. *Mol. Pharmacol.* **77**, 228-236 (2010).

288. O'Malley, B.W. Coregulators: From whence came these "master genes". *Mol. Endocrinol.* **21**, 1009-1013 (2007).
289. Aoyagi, S. & Archer, T.K. Dynamics of coactivator recruitment and chromatin modifications during nuclear receptor mediated transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* **280**, 1-5 (2008).
290. Malik, S. & Roeder, R.G. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 761-772 (2010).
291. Huuskonen, J., Fielding, P.E. & Fielding, C.J. Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 703-708 (2004).
292. Herzog, B. *et al.* The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2687-2697 (2007).
293. Wang, H. *et al.* Liver X receptor alpha is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2187-2200 (2008).
294. Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F. & Patsch, W. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem. J.* **371**, 89-96 (2003).
295. Calkin, A.C. & Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 213-224 (2012).
296. Yokoyama, A. *et al.* Induction of SREBP-1c mRNA by Differentiation and LXR Ligand in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1395-1401 (2009).
297. Pommier, A.J.C. *et al.* Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* **29**, 2712-2723 (2010).
298. Feng, B. *et al.* The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* **5**, 781-792 (2003).
299. Mesmin, B. & Maxfield, F.R. Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 636-645 (2009).
300. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 125-138 (2008).
301. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. & Tontonoz, P. LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Science* **325**, 100-104 (2009).
302. Zhou, J. *et al.* Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPAR gamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* **134**, 556-567 (2008).
303. Levitan, I., Volkov, S. & Subbaiah, P.V. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 39-75 (2010).
304. Rigamonti, E. *et al.* Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ.Res.* **97**, 682-689 (2005).
305. Lloyd-Evans, E. & Platt, F.M. Lipids on Trial: The Search for the Offending Metabolite in Niemann-Pick type C Disease. *Traffic* **11**, 419-428 (2010).
306. Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A. & Brown, M.S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35-46 (2006).
307. Venkateswaran, A. *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12097-12102 (2000).

308. Venkateswaran, A. *et al.* Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages - A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.* **275**, 14700-14707 (2000).
309. Rust, S. *et al.* Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genet.* **22**, 352-355 (1999).
310. Hong, C. *et al.* Constitutive activation of LXR in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: identification of ARL7 as a direct target. *J. Lipid Res.* **52**, 531-539 (2011).
311. Schwartz, K., Lawn, R.M. & Wade, D.P. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 794-802 (2000).
312. Laffitte, B.A. *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 507-512 (2001).
313. Lu, T.T., Repa, J.J. & Mangelsdorf, D.J. Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 37735-37738 (2001).
314. Ouimet, M. & Marcel, Y.L. Regulation of Lipid Droplet Cholesterol Efflux From Macrophage Foam Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 575-581 (2012).
315. Chen, H.C. Molecular mechanisms of sterol absorption. *J. Nutr.* **131**, 2603-2605 (2001).
316. Sun, Y. *et al.* Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J. Biol. Chem.* **278**, 5813-5820 (2003).
317. Miyazaki, M., Kim, Y.C., Gray-Keller, M.P., Attie, A.D. & Ntambi, J.M. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearyl-CoA desaturase 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 30132-30138 (2000).
318. Oram, J.F. & Vaughan, A.M. ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ.Res.* **99**, 1031-1043 (2006).
319. Ouimet, M. *et al.* Autophagy Regulates Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells via Lysosomal Acid Lipase. *Cell Metab.* **13**, 655-667 (2011).
320. Simons, K. & Ikonen, E. Cell biology - How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721-1726 (2000).
321. Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317-325 (2011).
322. Horvat, S., McWhir, J. & Rozman, D. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metabolism Reviews* **43**, 69-90 (2011).
323. Demierre, M.F., Higgins, P.D.R., Gruber, S.B., Hawk, E. & Lippman, S.M. Statins and cancer prevention. *Nature Reviews Cancer* **5**, 930-942 (2005).
324. Forman, B.M., Ruan, B.F., Chen, J., Schroepfer, G.J. & Evans, R.M. The orphan nuclear receptor LXR alpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10588-10593 (1997).
325. Zhu, J. *et al.* Effects of FoxO4 overexpression on cholesterol biosynthesis, triacylglycerol accumulation, and glucose uptake. *J. Lipid Res.* **51**, 1312-1324 (2010).
326. Wang, Y.J. *et al.* The Selective Alzheimer's Disease Indicator-1 Gene (Seladin-1/DHCR24) Is a Liver X Receptor Target Gene. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1716-1721 (2008).

327. Rodriguez-Acebes, S. *et al.* Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta(24)-reductase-deficient cell line. *Biochem. J.* **420**, 305-315 (2009).
328. Fakheri, R.J. & Javitt, N.B. Autoregulation of cholesterol synthesis: Physiologic and pathophysiologic consequences. *Steroids* **76**, 211-215 (2011).
329. Rowe, A.H. *et al.* Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene: Lanosterol cyclase - A novel mechanism for the attenuation of foam cell formation. *Circ.Res.* **93**, 717-725 (2003).
330. Dang, H.X. *et al.* Suppression of 2,3-Oxidosqualene Cyclase by High Fat Diet Contributes to Liver X Receptor-alpha-mediated Improvement of Hepatic Lipid Profile. *J. Biol. Chem.* **284**, 6218-6226 (2009).
331. Brown, A.J. 24(S),25-Epoxycholesterol: A messenger for cholesterol homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 744-747 (2009).
332. Beyea, M.M. *et al.* Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. *J. Biol. Chem.* **282**, 5207-5216 (2007).
333. Wong, J., Quinn, C.M. & Brown, A.J. Synthesis of the oxysterol, 24(S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol. *Lipids Health Dis.* **6**, 12 (2007).
334. Wong, J., Quinn, C.M., Gelissen, I.C. & Brown, A.J. Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **283**, 700-707 (2008).
335. Rozman, D. & Monostory, K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol. Ther.* **127**, 19-40 (2010).
336. Laden, B.P. & Porter, T.D. Resveratrol inhibits human squalene monooxygenase. *Nutr. Res.* **21**, 747-753 (2001).
337. Cho, I.J., Ahn, J.Y., Kim, S., Choi, M.S. & Ha, T.Y. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 190-194 (2008).
338. Wong, D.H. *et al.* Resveratrol inhibits the mevalonate pathway and potentiates the antiproliferative effects of simvastatin in rat theca-interstitial cells. *Fertility and Sterility* **96**, 1252-1258 (2011).
339. Silve, S. *et al.* Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits Delta 8-Delta 7 sterol isomerase activity in yeast. *J. Biol. Chem.* **271**, 22434-22440 (1996).
340. de Medina, P., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* **5**, 1066-1067 (2009).
341. Berge, K.E. *et al.* Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**, 1771-1775 (2000).
342. Repa, J.J. *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**, 1524-1529 (2000).
343. Oram, J.F. & Lawn, R.M. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid Res.* **42**, 1173-1179 (2001).

344. Repa, J.J. *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793-18800 (2002).
345. Altmann, S.W. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201-1204 (2004).
346. Duval, C. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1259-1263 (2006).
347. Basciano, H., Miller, A., Baker, C., Naples, M. & Adeli, K. LXR alpha activation perturbs hepatic insulin signaling and stimulates production of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.* **297**, G323-G332 (2009).
348. Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K. & Mangelsdorf, D.J. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta. *J. Biol. Chem.* **276**, 43018-43024 (2001).
349. Genest, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 267-287 (2003).
350. Hong, C. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase IDOL Induces the Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor Family Members VLDLR and ApoER2. *J. Biol. Chem.* **285**, 19720-19726 (2010).
351. Peet, D.J. *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693-704 (1998).
352. Alberti, S. *et al.* Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXR beta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **107**, 565-573 (2001).
353. Laffitte, B.A. *et al.* The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2182-2191 (2003).
354. Luo, Y. & Tall, A.R. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest.* **105**, 513-520 (2000).
355. Malerod, L., Juvet, L.K., Hanssen-Bauer, A., Eskild, W. & Berg, T. Oxysterol-activated LXR alpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 916-923 (2002).
356. Nijstad, N., Gautier, T., Briand, F., Rader, D.J. & Tietge, U.J.F. Biliary Sterol Secretion Is Required for Functional In Vivo Reverse Cholesterol Transport in Mice. *Gastroenterology* **140**, 1043-1051 (2011).
357. Yu, L.Q. *et al.* Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* **110**, 671-680 (2002).
358. Plosch, T. *et al.* Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J. Biol. Chem.* **277**, 33870-33877 (2002).
359. Repa, J.J. & Mangelsdorf, D.J. The liver X receptor gene team: Potential new players in atherosclerosis. *Nat. Med.* **8**, 1243-1248 (2002).
360. Goodwin, B. *et al.* Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **17**, 386-394 (2003).
361. Chen, J.Y., Levy-Wilson, B., Goodart, S. & Cooper, A.D. Mice expressing the human CYP7A1 gene in the mouse CYP7A1 knock-out background lack induction of CYP7A1 expression by cholesterol feeding and have increased hypercholesterolemia when fed a high fat diet. *J. Biol. Chem.* **277**, 42588-42595 (2002).
362. Russell, D.W. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1529**, 126-135 (2000).

363. Brown, A.J. & Jessup, W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* **30**, 111-122 (2009).
364. Bjorkhem, I. Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? *J. Lipid Res.* **50**, S213-S218 (2009).
365. Gilardi, F. *et al.* Expression of sterol 27-hydroxylase in glial cells and its regulation by liver X receptor signaling. *Neuroscience* **164**, 530-540 (2009).
366. Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C.Y. & Urano, Y. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **297**, E1-E9 (2009).
367. de Medina, P. *et al.* Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 1165-1173 (2004).
368. de Medina, P. *et al.* The prototypical inhibitor of cholesterol esterification, Sah 58-035 [3-[decyldimethylsilyl]-N-[2-(4-methylphenyl)-1-phenylethyl] propanamide], is an agonist of estrogen receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 139-149 (2006).
369. Ghosh, S. Early steps in reverse cholesterol transport: cholesteryl ester hydrolase and other hydrolases. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **19**, 136-141 (2012).
370. Fuda, H., Lee, Y.C., Shimizu, C., Javitt, N.B. & Strott, C.A. Cholesterol/oxysterol sulfotransferase (SULT2B1): Functional and structural characterization. *Faseb J.* **16**, A535-A535 (2002).
371. Jiang, Y.J., Kim, P., Elias, P.M. & Feingold, K.R. LXR and PPAR activators stimulate cholesterol sulfotransferase type 2 isoform 1b in human keratinocytes. *J. Lipid Res.* **46**, 2657-2666 (2005).
372. Falany, J.L. & Falany, C.N. Interactions of the human cytosolic sulfotransferases and steroid sulfatase in the metabolism of tibolone and raloxifene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **107**, 202-210 (2007).
373. Purohit, A. & Foster, P.A. Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. *J. Endocrinol.* **212**, 99-110 (2012).
374. Hu, J., Zhang, Z.H., Shen, W.J. & Azhar, S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* **7** (2010).
375. Dahlman-Wright, K. *et al.* International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 773-781 (2006).
376. Suzuki, T., Miki, Y., Nakamura, Y., Ito, K. & Sasano, H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas. *Mol. Cell. Endocrinol.* **340**, 148-153 (2011).
377. Nowell, S. & Falany, C.N. Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene* **25**, 1673-1678 (2006).
378. Manna, P.R., Wang, X.J. & Stocco, D.M. Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Steroids* **68**, 1125-1134 (2003).
379. He, J.H., Cheng, Q.Q. & Xie, W. Minireview: Nuclear Receptor-Controlled Steroid Hormone Synthesis and Metabolism. *Mol. Endocrinol.* **24**, 11-21 (2010).
380. Cummins, C.L. *et al.* Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J. Clin. Invest.* **116**, 1902-1912 (2006).

381. Nilsson, M. *et al.* Liver X receptors regulate adrenal steroidogenesis and hypothalamic-pituitary-adrenal feedback. *Mol. Endocrinol.* **21**, 126-137 (2007).
382. Matsumoto, S. *et al.* Liver X Receptor-alpha Regulates Proopiomelanocortin (POMC) Gene Transcription in the Pituitary. *Mol. Endocrinol.* **23**, 47-60 (2009).
383. Wang, J.H. & Tuohimaa, P. Regulation of 17 beta-hydroxy steroid dehydrogenase type 2, type 4 and type 5 by calcitriol, LXR agonist and 5 alpha-dihydrotestosterone in human prostate cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **107**, 100-105 (2007).
384. Stayrook, K.R. *et al.* Regulation of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C4) expression by the liver x receptor alpha. *Mol. Pharmacol.* **73**, 607-612 (2008).
385. Uppal, H. *et al.* Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice. *Hepatology* **45**, 422-432 (2007).
386. Lee, J.H. *et al.* Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* **149**, 3778-3788 (2008).
387. Yoshikawa, T. *et al.* Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2991-3000 (2001).
388. Repa, J.J. *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta. *Genes Dev.* **14**, 2819-2830 (2000).
389. DeBose-Boyd, R.A., Ou, J.F., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1477-1482 (2001).
390. Lopez-Velazquez, J.A., Carrillo-Cordova, L.D., Chavez-Tapia, N.C., Uribe, M. & Mendez-Sanchez, N. Nuclear receptors in nonalcoholic Fatty liver disease. *J Lipids* **2012**, 8 (2012).
391. Wagner, B.L. *et al.* Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5780-5789 (2003).
392. Ou, Z.M. *et al.* MicroRNA hsa-miR-613 Targets the Human LXR alpha Gene and Mediates a Feedback Loop of LXR alpha Autoregulation. *Mol. Endocrinol.* **25**, 584-596 (2011).
393. Talukdar, S. & Hillgartner, F.B. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J. Lipid Res.* **47**, 2451-2461 (2006).
394. Joseph, S.B. *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 11019-11025 (2002).
395. Inoue, J. *et al.* Identification of MIG12 as a Mediator for Stimulation of Lipogenesis by LXR Activation. *Mol. Endocrinol.* **25**, 995-1005 (2011).
396. Grefhorst, A. *et al.* Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* **277**, 34182-34190 (2002).
397. Koishi, R. *et al.* Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature Genet.* **30**, 151-157 (2002).
398. Kaplan, R. *et al.* Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *J. Lipid Res.* **44**, 136-143 (2003).
399. Inaba, T. *et al.* Angiopoietin-like protein 3 mediates hypertriglyceridemia induced by the liver X receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 21344-21351 (2003).

400. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C. & Ntambi, J.M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6786-6798 (2006).
401. Green, C.D. & Olson, L.K. Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic beta-cells by stearyl-CoA desaturase and Elovl6. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **300**, E640-E649 (2011).
402. Peter, A. *et al.* Induction of stearyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **295**, E339-E349 (2008).
403. Volle, D.H. *et al.* Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: Putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol. Endocrinol.* **18**, 888-898 (2004).
404. Major, C.A. *et al.* Inhibition of stearyl CoA desaturase activity induces hypercholesterolemia in the cholesterol-fed hamster. *J. Lipid Res.* **49**, 1456-1465 (2008).
405. Kalaany, N.Y. *et al.* LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* **1**, 231-244 (2005).
406. Laffitte, B.A. *et al.* Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5419-5424 (2003).
407. Grempler, R. *et al.* Evidence for an indirect transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by liver X receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 981-986 (2005).
408. Dalen, K.T., Ulven, S.M., Bamberg, K., Gustafsson, J.A. & Nebb, H.I. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **278**, 48283-48291 (2003).
409. Cao, G.Q. *et al.* Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 1131-1136 (2003).
410. Kase, E.T. *et al.* Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* **54**, 1108-1115 (2005).
411. Efanov, A.M., Sewing, S., Bokvist, K. & Gromada, J. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **53**, S75-S78 (2004).
412. Nilsson, M., Dahlman-Wright, K., Karelmo, C., Gustafsson, J.A. & Steffensen, K.R. Elk1 and SRF transcription factors convey basal transcription and mediate glucose response via their binding sites in the human LXRB gene promoter. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4858-4868 (2007).
413. Cha, J.Y. & Repa, J.J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis - The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* **282**, 743-751 (2007).
414. Denechaud, P.D. *et al.* ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* **118**, 956-964 (2008).
415. Denechaud, P.D., Dentin, R., Girard, J. & Postic, C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* **582**, 68-73 (2008).
416. Mitro, N. *et al.* The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* **445**, 219-223 (2007).
417. Steffensen, K.R. & Gustafsson, J.A. Liver X receptors: new drug targets to treat Type 2 diabetes? *Future Lipidology* **1**, 181-189 (2006).

418. Joseph, S.B. *et al.* LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* **119**, 299-309 (2004).
419. Pascual-Garcia, M. *et al.* Liver X Receptors Inhibit Macrophage Proliferation through Downregulation of Cyclins D1 and B1 and Cyclin-Dependent Kinases 2 and 4. *J. Immunol.* **186**, 4656-4667 (2011).
420. A-Gonzalez, N. *et al.* Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of the Nuclear Receptor LXR. *Immunity* **31**, 245-258 (2009).
421. Bensinger, S.J. *et al.* LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* **134**, 97-111 (2008).
422. Geyeregger, R. *et al.* Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **86**, 1039-1048 (2009).
423. Geyeregger, R. *et al.* Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* **109**, 4288-4295 (2007).
424. Wentz, W., Brenner, M.B., Zitzer, H., Gromada, J. & Efanov, A.M. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* **148**, 1843-1849 (2007).
425. Meng, Z.X. *et al.* Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest. *Diabetologia* **52**, 125-135 (2009).
426. Blaschke, F. *et al.* Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ.Res.* **95**, E110-E123 (2004).
427. Vedin, L.L., Lewandowski, S.A., Parini, P., Gustafsson, J.A. & Steffensen, K.R. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 575-579 (2009).
428. Rough, J., Monroy, M.A., Yerrum, S. & Daly, J.M. Liver X Receptor (LXR) Agonist, T0901317, Suppresses Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cell Lines. *Annals of Surgical Oncology* **16**, 33-33 (2009).
429. Rough, J.J., Monroy, M.A., Yerrum, S. & Daly, J.M. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *Journal of Ovarian Research* **3** (2010).
430. Scoles, D.R. *et al.* Liver X receptor agonist inhibits proliferation of ovarian carcinoma cells stimulated by oxidized low density lipoprotein. *Gynecologic Oncology* **116**, 109-116 (2010).
431. Kim, K.H. *et al.* Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J. Lipid Res.* **51**, 3425-3433 (2010).
432. Kim, H.J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M. & Gustafsson, J.A. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 558-563 (2009).
433. Lo Sasso, G. *et al.* Down-Regulation of the LXR Transcriptome Provides the Requisite Cholesterol Levels to Proliferating Hepatocytes. *Hepatology* **51**, 1334-1344 (2010).
434. Walczak, R. *et al.* Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 9905-9911 (2004).
435. Bergers, G. & Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* **3**, 401-410 (2003).

436. Nathke, I. Cytoskeleton out of the cupboard: colon cancer and cytoskeletal changes induced by loss of APC. *Nature Reviews Cancer* **6**, 967-974 (2006).
437. Guo, D.L. *et al.* An LXR Agonist Promotes Glioblastoma Cell Death through Inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-Dependent Pathway. *Cancer Discovery* **1**, 442-456 (2011).
438. Gabbi, C. *et al.* Estrogen-dependent gallbladder carcinogenesis in LXR beta(-/-) female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14763-14768 (2010).
439. Henry-Berger, J. *et al.* Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol. Reprod.* **78**, 968-975 (2008).
440. Antonson, P. *et al.* RAP250 is a coactivator in the transforming growth factor beta signaling pathway that interacts with smad2 and smad3. *J. Biol. Chem.* **283**, 8995-9001 (2008).
441. Ikushima, H. & Miyazono, K. TGF beta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* **10**, 415-424 (2010).
442. Zou, W.P. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer* **5**, 263-274 (2005).
443. Russo, V. Metabolism, LXR/LXR ligands, and tumor immune escape. *Journal of Leukocyte Biology* **90**, 673-679 (2011).
444. Chuu, C.P. *et al.* Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Research* **66**, 6482-6486 (2006).
445. Hanley, K. *et al.* Oxysterols induce differentiation in human keratinocytes and increase Ap-1-dependent involucrin transcription. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 545-553 (2000).
446. Komuves, L.G. *et al.* Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 25-34 (2002).
447. Schmuth, M. *et al.* The effect of LXR activators on AP-1 proteins in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 41-48 (2004).
448. Shen, Q. *et al.* Liver X Receptor-Retinoid X Receptor (LXR-RXR) Heterodimer Cistrome Reveals Coordination of LXR and AP1 Signaling in Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **286**, 14554-14563 (2011).
449. Kashiwagi, M., Ohba, M., Chida, K. & Kuroki, T. Protein kinase C eta (PKC eta): Its involvement in keratinocyte differentiation. *J. Biochem.* **132**, 853-857 (2002).
450. Fowler, A.J. *et al.* Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: Liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 246-255 (2003).
451. Hatano, Y. *et al.* Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 160-169 (2010).
452. Gupta, D.S., Kaul, D., Kanwar, A.J. & Parsad, D. Psoriasis: crucial role of LXR-alpha RNomics. *Genes and Immunity* **11**, 37-44 (2010).
453. Chang, K.C.N. *et al.* Liver X Receptor Is a Therapeutic Target for Photoaging and Chronological Skin Aging. *Mol. Endocrinol.* **22**, 2407-2419 (2008).
454. Lane, A.A. & Chabner, B.A. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5459-5468 (2009).

455. Kumar, R., Parsad, D., Kaul, D. & Kanwar, A. Liver X receptor expression in human melanocytes, does it have a role in the pathogenesis of vitiligo? *Experimental Dermatology* **19**, 63-64 (2010).
456. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107-120 (2012).
457. Lin, B.Z. *et al.* Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* **116**, 527-540 (2004).
458. Liu, J.J. *et al.* A Unique Pharmacophore for Activation of the Nuclear Orphan Receptor Nur77 In vivo and In vitro. *Cancer Research* **70**, 3628-3637 (2010).
459. Hangen, E., Blomgren, K., Benit, P., Kroemer, G. & Modjtahedi, N. Life with or without AIF. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 278-287 (2010).
460. Mullican, S.E. *et al.* Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **13**, 730-735 (2007).
461. Klionsky, D.J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151-175 (2008).
462. Xu, Y., Kim, S.O., Li, Y.L. & Han, J.H. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J. Biol. Chem.* **281**, 19179-19187 (2006).
463. Kumar, N., Wang, H., Liu, D. & Collins, S. Liver X receptor is a regulator of orphan nuclear receptor NOR-1 gene transcription in adipocytes. *International Journal of Obesity* **33**, 519-524 (2009).
464. Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. & Lowe, S.W. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164 (2002).
465. Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C. & Dargemont, C. Protein export from the nucleus. *Traffic* **2**, 684-689 (2001).
466. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939 (2005).
467. Moll, U.M., Marchenko, N. & Zhang, X.K. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* **25**, 4725-4743 (2006).
468. Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. & Codogno, P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research* **20**, 748-762 (2010).
469. Brigelius-Flohe, R. & Traber, M.G. Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J.* **13**, 1145-1155 (1999).
470. He, D.N., Meloche, C.A., Dumas, N.A., Frost, A.R. & Falany, C.N. Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate. *Biochem. J.* **379**, 533-540 (2004).
471. Aneja, R., Zhou, J., Zhou, B.F., Chandra, R. & Joshi, H.C. Treatment of hormone-refractory breast cancer: apoptosis and regression of human tumors implanted in mice. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2366-2377 (2006).
472. Pitroda, S.P., Khodarev, N.N., Beckett, M.A., Kufe, D.W. & Weichselbaum, R.R. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5837-5841 (2009).
473. Blomen, V.A. & Boonstra, J. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 3084-3104 (2007).

474. Miao, B. *et al.* Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J. Lipid Res.* **45**, 1410-1417 (2004).
475. Nguyen, M.C., Stewart, R.B., Banerji, M.A., Gordon, D.H. & Kral, J.G. Relationships between tamoxifen use, liver fat and body fat distribution in women with breast cancer. *International Journal of Obesity* **25**, 296-298 (2001).
476. Remen, K.M.R., Henning, P., Lerner, U.H., Gustafsson, J.A. & Andersson, G. Activation of Liver X Receptor (LXR) Inhibits Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL)-induced Osteoclast Differentiation in an LXR beta-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 33084-33094 (2011).
477. Clarke, R. *et al.* Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* **22**, 7316-7339 (2003).
478. Moore, K.S. *et al.* Squalamine - an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1354-1358 (1993).
479. Sorensen, P.W. *et al.* Mixture of new sulfated steroids functions as a migratory pheromone in the sea lamprey. *Nature Chemical Biology* **1**, 324-328 (2005).
480. Sacchetti, P. *et al.* Liver X Receptors and Oxysterols Promote Ventral Midbrain Neurogenesis In Vivo and in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **5**, 409-419 (2009).
481. Wollam, J. *et al.* A Novel 3-Hydroxysteroid Dehydrogenase That Regulates Reproductive Development and Longevity. *Plos Biology* **10** (2012).
482. Germain, P. *et al.* Differential Action on Coregulator Interaction Defines Inverse Retinoid Agonists and Neutral Antagonists. *Chemistry & Biology* **16**, 479-489 (2009).
483. Chamras, H., Ardashian, A., Heber, D. & Glaspy, J.A. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 711-716 (2002).
484. Bougnoux, P. *et al.* Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *British journal of cancer* **101**, 1978-1985 (2009).
485. Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C. & Chevalier, S. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog. Lipid Res.* **49**, 76-86 (2010).
486. Fasano, E., Serini, S., Piccioni, E. & Calviello, G. Chemoprevention of Lung Pathologies by Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Current Medicinal Chemistry* **17**, 3358-3376 (2010).
487. O'Callaghan, Y.C., Woods, J.A. & O'Brien, N.M. Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biology and Toxicology* **17**, 127-137 (2001).
488. Ryan, L., O'Callaghan, Y.C. & O'Brien, N.M. Comparison of the apoptotic processes induced by the oxysterols 7 beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5 beta,6 beta-epoxide. *Cell Biology and Toxicology* **20**, 313-323 (2004).
489. Lordan, S., O'Callaghan, Y.C. & O'Brien, N.M. Death-signaling pathways in human myeloid cells by oxLDL and its cytotoxic components 7 beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5 beta,6 beta-epoxide. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **21**, 362-372 (2007).
490. Jain, P.T. & Trump, B.F. Tamoxifen induces deregulation of [Ca²⁺(+)] in human breast cancer cells. *Anticancer Research* **17**, 1167-1174 (1997).

491. Kim, J.A., King, Y.S., Jung, M.W., Lee, S.H. & Lee, Y.S. Involvement of Ca²⁺ influx in the mechanism of tamoxifen-induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cancer Letters* **147**, 115-123 (1999).
492. Chang, H.T. *et al.* Tamoxifen-induced increases in cytoplasmic free Ca²⁺ levels in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **71**, 125-131 (2002).