

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

INSERM UMR 1069, « Nutrition, Croissance et Cancer »

THÈSE

présentée par :

Céline BEN HASSEN

soutenue le : **18 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Cibler l'homéostasie du cholestérol cellulaire pour traiter le cancer du sein

THÈSE dirigée par :

M. FRANK Philippe

Ingénieur de Recherche HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. COLLET Xavier

M. POIROT Marc

Directeur de Recherche, Université de Toulouse

Directeur de Recherche, Université de Toulouse III

JURY :

M. COLLET Xavier

Mme DUPONT Joëlle

M. FRANK Philippe

Mme GUERAUD Françoise

M. POIROT Marc

M. VANDIER Christophe

Directeur de Recherche, Université de Toulouse

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire

Ingénieur de Recherche HDR, Université de Tours

Directeur de Recherche, INRA de Toulouse

Directeur de Recherche, Université de Toulouse III

Professeur des Universités, Université de Tours

« Nous résoudrons ce problème quand il se présentera, d'accord ? [...] L'autre jour je lisais une lettre que Thomas Jefferson a écrite à John Adams quand il était vieux, et où il disait que la plupart des choses qu'il avait redoutées dans sa vie ne s'étaient jamais produites. "Combien nous avons souffert pour des maux qui ne se sont jamais concrétisés". Ou une formule dans ce genre. »

(Donna Tartt, *Le Petit Copain*)

Remerciements

Tout d'abord, il me faut remercier les membres du jury d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture et l'examen de ce manuscrit, et pour l'intérêt porté à mon travail. Dr Xavier Collet et Dr Marc Poirot, merci de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Dr Joëlle Dupont, Dr Françoise Guéraud et Pr Christophe Vandier, merci d'avoir accepté d'être examinateurs. Christophe, merci aussi de m'avoir permis de continuer ma thèse au sein du laboratoire dans les meilleures conditions, et pour vos encouragements positifs (« tant que ça ne recule pas, ça avance »).

Philippe, merci de m'avoir montré que l'optimisme est un choix et non un trait de caractère. On gagnerait sans doute tous à être un peu plus comme vous. Merci de m'avoir fait confiance en m'acceptant en stage, puis en thèse, et pour votre bienveillance au quotidien. Moi qui panique d'habitude pour un rien, n'ai (*pour l'instant*) presque pas tremblé (*presque*) pendant la phase de rédaction, et c'est en partie grâce à votre regard rassurant et vos encouragements. Enfin et surtout, merci d'avoir été si compréhensif lorsque j'ai évoqué mes souhaits de reconversion, si patient lorsque je vous ai laissé de côté pour m'en aller poser les fondations de mon nouveau futur. Je n'aurais pas pu espérer, je crois, autant de soutien de la part de mon directeur de thèse, et je vous souhaite le meilleur pour tous vos projets futurs.

Ceux qui m'ont fréquentée au quotidien pendant ces quatre dernières années le savent : je pensais ne jamais rédiger cette thèse. Je pensais ne jamais la terminer. Je pensais qu'à choisir, il aurait mieux valu que je consacre tout mon temps à travailler sur la construction d'une machine à remonter le temps pour enfin pouvoir sauter dedans à pieds joints, clore les paupières, fermer cette satanée porte, remonter l'horloge, et prendre un chemin complètement différent sans jamais, jamais, *jamais* regarder en arrière. Ne pas commettre toutes ces erreurs. Ne pas hésiter autant. Ne pas avoir peur tout le temps, de tout, de rien. J'avais tort. Je me suis royalement, complètement, indubitablement plantée. Il y a eu tellement d'humain dans cette thèse. Tellement d'amitiés, tellement de sentiments, tellement de choses apprises, sur moi, sur le monde, sur ce truc éphémère et mystique qui n'existe peut-être pas et qu'on appelle le bonheur. Certains d'entre vous m'ont rendu heureuse comme jamais je ne l'ai été auparavant, et pour ça, jamais je ne vous remercierai assez, mais je vais essayer quand même.

Chahrazed, mon Soleil, je vais commencer par toi. T'es un cadeau du ciel. Je pourrais m'arrêter là. Un véritable cadeau du ciel. Ça va te sembler exagéré, formulé de la sorte, mais tu n'imagines pas le nombre de fois où je l'ai pensé. Le nombre de fois où tu m'as fait rire alors que les larmes étaient prêtes à sortir. Je ne vais pas te mentir, moi et mon aversion pour les petits changements, on était un peu tristes et inquiets à l'idée que tu prennes la place de Jorge dans le Bureau 5. Qu'est-ce qu'on était bêtes. Merci, du fond du cœur, d'avoir décidé de t'y installer. Sans cela on ne serait jamais devenues amies (*pire* encore, sans cela on n'aurait jamais organisé de compétitions de blind test). Plus sérieusement, merci de m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin (et pardon de t'avoir fait radoter parce qu'en bonne tête de mule je n'écoute jamais rien alors que tu as si souvent raison), merci de m'avoir redonné le

sourire alors même quand je m'en croyais incapable, merci pour ta sagesse infailible, merci pour tous ces messages vocaux envoyés par une journée bordelaise plus sombre que les autres, merci pour le bonhomme de neige porte-bonheur (bon, je ne pense pas qu'il fonctionne, mais le secouer, ça défoule). Je sais qu'on restera amies, mais tu me manqueras malgré tout. Ces versions de nous, assises dans le Bureau 5, à discuter de nos vies, à partager nos peines, à rire pour pas grand chose. *Meuf*, cette fois, cette ère est vraiment terminée. C'est bon, on l'a fait. #AVOSB. Vers tous nos prochains days of sun 🎵 🎵

Maxime, merci d'avoir été tellement plus que ce que j'imaginai de toi lorsque je t'ai vu pour la première fois. Tu le sais, je n'aurais pas misé un centime sur toi en janvier 2015. C'est drôle, hein ? Les rebondissements, dans une vie. La vérité, presque cinq ans plus tard, c'est que je n'aurais pas autant poussé la porte d'entrée de ce labo si tu n'y avais pas travaillé. Et là encore, je n'exagère en rien. Merci d'avoir bravé un regard noir en salle de Western (et beaucoup d'autres par la suite, mais ceux-là étaient souvent mérités) pour entrer dans ma vie. Merci pour tous nos bons moments. Merci d'avoir rendu presque belle cette fin de thèse que j'anticipais cauchemardesque. Sans toi tout aurait été bien différent, et très peu en aurait valu la peine. Merci pour tout, malgré tout.

Jorge, I don't even know where to begin. *Jeez*. Working with you has been a pleasure (well, most of the time), but becoming your friend has truly been a wonderful surprise. Thank you for teaching me all your tricks of cell culture and Western-Blotting, thank you for your knowledge, your curiosity, your kindness, your availability, thank you for showing me what a great scientist must look like, and thank you for your help solving science-related issues. But above all, thank you for all the wise life-related advice (wisdom *does* come with age) you've given me over the years, thank you for showing us Disney or Pixar movie trailers on your computer to enlighten our days, thank you for being there for me, although miles apart, especially on that day back in July (I swear on *my baby* Louis's head that I will apologize for the rest of my life for this awful 26 minutes-long vocal message and I promise that it won't happen ever again). "Suits" might be over but superheroes movies will live on, so I know we will stay in touch.

Céline Junior, ce fut un plaisir et un honneur de partager mon prénom avec toi (si, bien sûr, on met de côté la fois où Chahrazed a suggéré de m'appeler « Céline Sénior »). Merci de m'avoir demandé si j'allais bien plusieurs fois par jour pour en être bien certaine, merci pour ces fous rires ridicules (oui, oui, j'utilise le mot en « r », désolée) mais magistraux, merci pour les « salut Céline ! » quotidiens, merci pour ta loyauté quasi sans faille.

Merci aux filles du Bureau 5 que je n'ai pas encore citées. Sana, « on peut toujours compter sur toi ». Merci pour cette bonne humeur si contagieuse que tu propages partout où tu passes, merci de m'avoir fait rire un nombre incalculable de fois, merci pour le « no emotions » et le « attends, ne t'inquiète pas, je regarde ailleurs », et merci pour tous ces « laissez-la tranquille » proférés pour me défendre. La vraie « Patrona » du Bureau 5, pour moi, ce sera toujours toi. Adeline, ma première année de thèse n'aurait pas été la même sans toi. Merci pour toutes ces conversations qui aujourd'hui me paraissent loin, merci pour ta folie et cette fougue qui est une véritable inspiration. Nastaran, merci pour ta sagesse, ton sens de l'humour, merci pour les « LOL » (je ne peux plus lire cet acronyme sans entendre ta voix et me sentir mal), les « oups », les « par contre », et toutes ces choses qui nous auront tant fait rire.

Il y a dans le labo beaucoup d'autres personnes à remercier. Merci à toute l'équipe de Biochimie pour avoir réalisé toutes les expériences de GC et d'HTPLC : Michelle (merci pour ta bienveillance), Cyrille (que je venais toujours embêter en priorité pour obtenir des résultats ou donner des échantillons parce que tellement rassurée par ton calme et ta gentillesse) et Violetta (merci pour votre caractère si pétillant et pour vos compliments sincères). Merci à ceux qui, comme moi, sont matinaux : Isabelle, merci pour ton expertise, ton organisation et ta sagesse ; Catherine, merci pour ta bienveillance, et merci d'avoir réalisé toutes les commandes ; Günther, merci pour les conversations amusantes du matin ou du weekend (je vais essayer de ne pas m'évanouir le jour de ma soutenance mais honnêtement, je ne peux rien promettre). Merci aux autres thésards que je n'ai pas encore mentionnés, notamment Fred et Yann, avec qui j'ai partagé de bons moments en début de thèse (merci, Yann, de continuer à prendre régulièrement de mes nouvelles). Osbaldo, thank you for being so positive all the time, talking to you is always inspiring and motivating. Romain, merci pour les « ça va Céline ? », ton sens de l'humour et tes talents de bricoleur (désolée de m'être rendue compte que tu étais gentil il y a à peine quelques semaines). Domitille, merci pour votre bonne humeur, votre rire, vos ondes positives. Désolée d'être arrivée si tôt, si souvent, d'avoir marché sur le sol mouillé fraîchement lavé sans attendre (je peux l'avouer aujourd'hui : plusieurs fois je me suis faufilée dans votre dos comme un enfant se cache de sa mère avant de commettre une bêtise), et, globalement, de vous avoir empêché de travailler sereinement (« mais si j'enfile des surchausses et que je fais comme ça *esquisse un pas de twist*, ça va sécher le sol plus vite, non ? »). Merci aux membres du labo que je n'ai pas encore évoqués et dont les remarques scientifiques sont souvent utiles (Régis, Pierre, Jean-François, Stéphane, Karine, Marie, Caro, Lucie, Aurélie). Merci à Gaëlle Fromont-Hankard et à Roseline Guibon d'avoir réalisé les expériences d'immunohistochimie. Enfin, merci au personnel de l'animalerie (Valérie Schubnel, Chrystophe Aubert, Jérôme Montharu, Benjamin Plante, Georges Roseau, Elodie Theyssandier) pour leur aide dans le cadre des expériences *in vivo*.

Je tiens aussi à adresser un mot de remerciement aux autres encadrants grâce à qui j'ai beaucoup appris et grandi ces dernières années. Dear Pietro, all my friends, family members and colleagues (and let's be honest, every single person I've randomly ran into in the streets since 2014) know about you because I have never stopped gushing about the great time I had in Oxford. You have been one of the best supervisors I have ever had, and as you were the first person to show me the good side of the research world (the one filled with heart, passion and hard work), had I not met you, I would not have wanted to get a Phd. Thank you for your kindness, your humanity, thank you for being both a scientist *and* a poet. Thank you for believing in me, it has always meant a lot. Thank you for still checking up on me after all these years and never failing at giving me good advice. Hélène, merci de m'avoir fait confiance (et de me faire confiance à nouveau), et d'avoir pris le temps de me conseiller si sagement.

Il me faut aussi remercier mes amis en dehors du labo, ceux qui m'ont entendue me plaindre si souvent de cette thèse et m'ont conseillée à chaque étape sans se fatiguer (ou du moins, sans le montrer). JA (BFF), merci d'être cette personne extraordinaire que j'ai la

chance de côtoyer depuis dix ans. Bon, je ne vais pas te mentir, à chaque fois que je te vois, tu m'agaces tellement que j'oublie pourquoi je t'apprécie et que j'envisage mille et une façons de te tuer, mais pour une raison que j'ignore, nous sommes toujours amis. Non. Plus sérieusement. Avec le temps tu es presque devenu un frère pour moi. Merci d'être tout le temps là quand j'en ai besoin, merci de trouver les mots, en permanence, ceux qui me font rire comme ceux qui m'apaisent, merci de suivre cette telenovela qui me sert de vie (bien que je ne sois pas ton personnage préféré car tu n'es qu'un sale traître), merci d'être le seul à qui j'ai l'impression de pouvoir parler de tout, sans tricher, sans avoir peur, merci pour cette amitié si pure qu'est la nôtre, merci de me soutenir autant que tu ne te moques de moi (et quand est-ce qu'on part à La Nouvelle Orléans ? Bro. You know que je vais te le demander souvent). Benjamin, je te l'ai déjà dit plusieurs fois, mais merci de t'être assis à côté de moi un matin de septembre, merci de m'avoir embêtée toute l'année qui a suivi et merci de ne pas avoir arrêté depuis. Merci d'être toujours à l'écoute et très souvent de bon conseil. Je ne pourrais rêver de meilleur plus vieil ami. Sarah et Andrea, mes deux petites pépites (et les deux seules personnes sur cette Terre que je dépasse en taille), merci d'être toujours là, quatre ans après la fin de notre aventure Toulousaine. Sarah, ton soutien a toujours été infaillible, tes encouragements précieux, et je sais que je peux toujours compter sur toi (pardon de tarder autant à répondre à tes messages, promis, je tâcherai de m'améliorer ou, au moins, de faire appel à des pigeons voyageurs, à des hiboux apprivoisés, bref, à n'importe quoi qui justifierait autant de retard). Andrea, ma belle, il n'y a pas une personne sur cette planète qui me fasse rire plus que toi. Merci pour toutes tes histoires (lorsque recueil il y aura, envoie-moi un exemplaire dédié).

Enfin, merci à ceux qui sont presque obligés de me soutenir et me supporter depuis toujours. A mes parents, qui ont sacrifié tellement pour nous : merci pour tout. Alexandre, on n'est pas tout le temps d'accord, et comme tous frères et sœurs qui se respectent, on se chamaille parfois, mais merci de me faire autant rire, merci d'être là, et merci d'être toi. Je ne te le dis pas assez, mais tu n'imagines comme il m'arrive de t'admirer (quand tu ne m'exaspères pas, bien entendu). Ta confiance en toi, ta folie, ton humour, cette nonchalance qui cache tellement de génie font de toi une vraie inspiration au quotidien. Pour moi, tu seras toujours un enfant, mais quand je serai grande, j'espère être un peu plus comme toi (maintenant, que quelqu'un m'apporte le stylo des « Men In Black » pour que tu puisses oublier que j'ai écrit tout ça).

Pour conclure, la machine à remonter le temps, on oublie. L'avenir ne me paraît plus si effrayant. Et que pourrais-je regretter quand je regarde ceux qui m'entourent ?

Résumé

Une femme sur huit sera touchée dans sa vie par le cancer du sein. Les facteurs de risque de la maladie se divisent en deux grandes classes: héréditaires (mutations génétiques de certains gènes cibles) et non héréditaires (liés à l'environnement et aux habitudes de vie). Dans cette dernière catégorie, on retrouve l'alimentation, et notamment une alimentation riche en graisses et en sucres. Des études antérieures ont montré que les taux de cholestérol cellulaire peuvent jouer un rôle important dans la régulation des différentes étapes nécessaires au développement tumoral telles que la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. Les explications possibles à ce phénomène sont principalement de deux types. D'une part, le cholestérol étant un composant essentiel des membranes plasmiques, et les cellules tumorales étant en constante prolifération, il est légitime d'envisager que les cellules cancéreuses aient besoin de davantage de cholestérol pour synthétiser de nouvelles membranes. D'autre part, le cholestérol intervient dans de nombreuses voies de signalisation pro-prolifératives, pro-migratoires, pro-invasives, ou anti-apoptotiques, qui sont toutes autant de voies qui sont dérégulées dans le cancer.

Notre hypothèse est que le cholestérol cellulaire intervient dans la régulation de la progression du cancer du sein. Pour confirmer cette idée, nous avons souhaité impacter le métabolisme du cholestérol dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (lignée de type luminal A) et MDA-MB-231 (lignée Triple-Négative) en jouant sur l'entrée ou la sortie de cholestérol. Nous avons pour cela utilisé des approches génétiques : augmentation de l'élimination du cholestérol cellulaire par l'expression de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I, impliquée *in vivo* dans le transport inverse du cholestérol) ou modulation du métabolisme du cholestérol par l'expression de l'apolipoprotéine E (apoE, impliquée *in vivo* dans la régulation de l'entrée ou de la sortie du cholestérol en fonction du type cellulaire considéré). Nos expériences ont été menées *in vitro* et *in vivo* (xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires humaines chez la souris immuno-déficiente athymique).

Nos résultats ont montré que l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE ne provoquait pas de changements majeurs au niveau du contenu en cholestérol cellulaire dans les cellules MCF-7, si ce n'est, tout de même, une tendance à l'augmentation. La répartition du cholestérol semblait néanmoins être altérée, et la fluidité membranaire augmentait dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I. Par ailleurs, l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE a

conduit *in vitro* à stimuler la prolifération, la migration et l'invasion des cellules MCF-7. Les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK étaient toutes deux suractivées par l'expression de l'apoA-I et de l'apoE, et sont donc potentiellement impliquées dans les effets pro-prolifératifs de ces deux apolipoprotéines. Inhiber ces deux voies a également permis d'activer les effets pro-migratoires de l'apoA-I mais pas ceux de l'apoE. Une induction de l'expression de la cavéoline-1 a été constatée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, et plus encore dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE. Etant donné son rôle précédemment décrit dans le cancer du sein, cela suggère d'une part une implication primordiale de cette protéine dans les effets médiés par l'apoA-I et l'apoE, et d'autre part une modification du métabolisme du cholestérol dans ces cellules puisque la cavéoline-1 est le constituant principal des cavéoles, qui sont des invaginations de la membrane plasmique riches en cholestérol et impliquées dans la signalisation cellulaire. *In vivo*, l'apoE, et surtout l'apoA-I ont été à l'origine de tumeurs plus grosses, qui se développaient plus vite, mais sans induire la formation de métastases.

Dans les cellules MDA-MB-231, les effets de l'apoA-I et de l'apoE ont été tout autres. Le contenu en esters de cholestérol tendait à augmenter dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I, tout comme le contenu en certains stérols. L'expression de l'apoA-I et de l'apoE a entraîné une diminution de la prolifération et de la migration des cellules MDA-MB-231. En revanche, l'invasion des cellules MDA-MB-231 a été stimulée par l'apoA-I, tandis que l'apoE ne l'a pas impactée. Les mécanismes par lesquels agissent l'apoA-I et l'apoE sur les cellules MDA-MB-231 ne sont pas encore clairement établis, mais il se pourrait qu'à l'inverse de ce qu'il se produit dans les cellules MCF-7, les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK soient inhibées dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I. La principale différence entre les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 étant la présence du récepteur aux œstrogènes, il est possible d'imaginer que les effets de l'apoA-I et de l'apoE pourraient impliquer ce dernier.

Dans de futures études, il conviendrait d'élucider le rôle exact de la cavéoline-1 dans les effets de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7, notamment en utilisant des siARN dirigés spécifiquement contre elle. L'impact de l'extinction de l'expression de la cavéoline-1 sur la suractivation des voies PI3K/Akt et MAPK/ERK serait notamment à vérifier. Il serait également intéressant de travailler avec un inhibiteur spécifique (ou un siARN spécifique) du récepteur à œstrogène afin de constater si cela inhibe ou non les effets de l'apoA-I et/ou de l'apoE sur les cellules MCF-7, et si ce dernier est donc, par extension, à l'origine des

divergences de résultats entre les deux lignées cellulaires. Nos études suggèrent aussi que cibler l'expression de l'apoA-I et de l'apoE pourrait permettre d'améliorer le traitement de patients ayant des tumeurs de type triple négatives.

Résumé en anglais

One woman in eight will have to face breast cancer at some point in her life. Risk factors of the disease can be hereditary (genetic mutations of target genes) or non-hereditary (due to the environment and lifestyles). One major non-hereditary risk factor is the diet, and more specifically, a diet high in lipids and sugars. Previous studies have shown that cellular cholesterol levels can also play an important role in the regulation of the different steps of tumor development such as cell proliferation, migration and invasion. Such phenomenon has several potential explanations. On one hand, cholesterol is an essential component of plasma membranes and, as such, it is necessary for cancer cells that are undergoing a high rate of proliferation and therefore need more cholesterol to synthesize new membranes. On the other hand, cholesterol plays a role in several signaling pathways that stimulate proliferation, migration, invasion, and inhibit apoptosis and that are deregulated in cancer.

Our hypothesis is that cellular cholesterol is involved in breast cancer progression. To test this idea, we decided to impact cholesterol metabolism in the breast cancer cell lines MCF-7 (luminal A) and MDA-MB-231 (Triple Negative) by stimulating either influx or efflux of cholesterol. We used a genetic approach to increase cholesterol elimination by expressing apolipoprotein A-I (apoA-I, involved *in vivo* in Reverse Cholesterol Transport) or modulate cholesterol metabolism by expressing apolipoprotein E (apoE, involved *in vivo* in the regulation of both cholesterol entry or exit depending on the cell type). Our experiments have been performed both *in vitro* and *in vivo* (xenografts of breast cancer cells in athymic immune-deficient mice).

Our results show that expressing apoA-I or apoE did not induce any major changes in terms of total cholesterol content in MCF-7 cells apart from a small not statistically significant increase in MCF-7 cells expressing apoA-I. Cholesterol distribution within the cells was however modified, and membrane fluidity was increased in MCF-7 cells expressing apoA-I. Moreover, apoA-I and apoE stimulated proliferation, migration, and invasion of MCF-7 cells *in vitro*. Signaling pathways PI3K/Akt and MAPK/ERK were overactivated in MCF-7 cells expressing apoA-I or apoE, and inhibiting these pathways activated the pro-migratory effects of apoA-I, but not of apoE, in MCF-7 cells. These data suggest that both pathways are involved in the underlying mechanisms. We also observed an induction of caveolin-1 expression in MCF-7 cells expressing apoA-I or apoE. Given the established role of

caveolin-1 in breast cancer, this observation suggests that caveolin-1 could play a significant role in mediating the effects of apoA-I and apoE in MCF-7 cells. It also reflects a modification of cholesterol metabolism since caveolin-1 is the main component of caveolae, which are plasma membrane invaginations enriched in cholesterol and involved in the regulation of various signaling pathways. In vivo, apoA-I and apoE expression in MCF-7 cells led to the development of larger tumors, but did not induce metastasis formation in xenografted athymic mice.

The effects of apoA-I and apoE were entirely different in MDA-MB-231 cells. The content of cholesteryl-esters was increased in MDA-MB-231 cells expressing apoA-I, and so was the content of several sterols. Expressing apoA-I or apoE slowed down proliferation and migration of MDA-MB-231 cells, but expressing apoA-I increased invasion, while apoE had no effect on invasion. Mechanisms underlying these effects are not yet clearly established, but signaling pathways PI3K/Akt and MAPK/ERK may be downregulated in MDA-MB-231 cells expressing apoA-I. The main difference between the two cell lines being the presence of the Estrogen Receptor, it is possible to imagine that the effects of apoA-I and apoE on MCF-7 cells may involve this receptor.

In the future, it would be interesting to study the exact role of caveolin-1 by using a siRNA against caveolin-1. The extinction of the expression of caveolin-1 should reduce or completely inhibits the effects of apoA-I and apoE on proliferation, migration, and invasion of MCF-7 cells, possibly by suppressing the overactivation of signaling pathways PI3K/Akt and MAPK/ERK. It would also be interesting to work with a specific inhibitor (or siRNA) of the Estrogen Receptor, to determine if we can suppress the effects of apoA-I and apoE on MCF-7 cells. Our studies also suggest that targeting the expression of apoA-I and apoE could improve the treatment of patients carrying triple negative tumors.

Sommaire

Remerciements	4
Résumé	8
Résumé en anglais	11
Sommaire	13
Liste des figures.....	17
Abréviations	21
Chapitre I : Introduction	28
1) Cancer du sein : généralités.....	28
a. Historique	28
b. Un point sur les chiffres : état des lieux dans le monde	30
c. Un point sur les chiffres : état des lieux en France.....	30
d. Les traitements	35
2) Cancer du sein : mécanismes.....	37
a. Les différents types de cancers du sein	37
b. Mécanismes : les théories établies.....	40
i. Signalisation via ER.....	40
ii. Voie HER2	41
iii. Voie canonique Wnt/beta catenin	42
iv. CDK	42
v. PI3K/Akt/mTOR	42
vi. Notch	43
vii. BRK.....	43
viii. Sonic Hedgehog	44
ix. Voie JAK/STAT.....	44
x. p53	45
xi. BRCA1 et BRCA2	45
c. Les théories originales ou émergentes.....	46
3) Cancer du sein : les facteurs de risque.....	46
a. Les facteurs de risque héréditaires.....	47
b. Les facteurs de risque non héréditaires.....	50
i. Le sexe.....	50
ii. L'âge	50
iii. Les facteurs de risque liés à la reproduction	50
iv. Les œstrogènes	52

v. L'alimentation	56
vi. La consommation d'alcool	59
vii. La consommation de tabac	61
viii. Le surpoids et l'obésité	62
ix. L'insuline	63
x. L'adiponectine	63
xi. L'activité physique	64
xii. L'allaitement	65
xiii. Fausses idées reçues : les non-facteurs de risque du cancer du sein	66
4) Le cholestérol est-il un facteur de risque du cancer du sein ?	67
a. Les réponses des études épidémiologiques	68
b. Les réponses des études <i>in vivo</i>	82
c. Les réponses des études <i>in vitro</i>	85
d. Les mécanismes d'action du cholestérol	89
5) La cavéoline-1	97
a. Fonctions <i>in vivo</i>	97
b. Un gène suppresseur de tumeur ?	99
c. Quelles implications dans le cancer du sein ?	100
6) Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)	102
a. Principes généraux	102
b. La TEM dans le cancer	106
7) Les apolipoprotéines A-I et E	107
a. Généralités sur le métabolisme du cholestérol	107
b. L'apolipoprotéine A-I	110
i. Rôles <i>in vivo</i>	110
ii. ApoA-I et cancer	113
c. L'apolipoprotéine E	114
Chapitre II : Objectifs	116
Chapitre III : Partie Expérimentale	119
I. Méthodes	119
1) Lignées cellulaires	119
2) Transfection	119
3) Dosage des protéines	121
4) Dosage du cholestérol	121
a. Par HPTLC (« High-Performance Thin-Layer Chromatography »)	121
b. Quantification des stérols par chromatographie en phase gazeuse (GC)	122
c. Coloration à la filipine	123

5) Mesure de la fluidité membranaire.....	123
6) Mesure de la prolifération cellulaire.....	124
a. Etude de la prolifération par coloration au cristal violet	124
b. Etude de la prolifération par comptage.....	124
c. Etude de la prolifération par mesure de l'impédance (système xCELLigence)	125
7) Mesure de la migration cellulaire.....	126
a. Etude de la migration cellulaire en inserts de migration (« transwell »)	126
b. Etude de la migration cellulaire par mesure de l'impédance (système xCELLigence)...	127
c. Etude de la migration cellulaire en cicatrisation (« wound healing »)	128
8) Stimulation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse.....	130
9) Mesure de l'invasion cellulaire en inserts d'invasion	130
10) Mesure de la résistance à la doxorubicine	130
11) Western-Blot	131
12) Microscopie d'immunofluorescence.....	132
13) RT-qPCR (« Reverse Transcription-quantitative PCR »)	133
14) Extinction de l'expression de la cavéoline-1	135
15) Evaluation de l'impact de la transfection de l'apoA-I ou de l'apoE sur les voies de signalisation PI3K et MAPK.....	135
16) Suivi de la croissance tumorale <i>in vivo</i>	136
17) Analyses statistiques.....	137
II. Résultats	138
1) L'apoA-I et l'apoE sont correctement exprimées dans nos lignées MCF-7 et MDA-MB-231 138	
2) L'apoA-I et l'apoE modifient le métabolisme du cholestérol des cellules MCF-7 et MDA- MB-231	147
3) L'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération des cellules MCF-7 mais diminuent celle des cellules MDA-MB-231	151
4) L'apoA-I et l'apoE stimulent la migration des cellules MCF-7 mais diminuent celle des cellules MDA-MB-231	155
5) L'apoA-I et l'apoE stimulent l'invasion des cellules MCF-7 et MDA-MB-231	156
6) L'apoA-I et l'apoE stimulent la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules MCF-7 160	
7) L'apoA-I et l'apoE inhibent la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules MDA- MB-231	161
8) L'apoA-I et l'apoE semblent modifier la réponse au traitement à la doxorubicine des cellules MDA-MB-231	164
9) Les effets de l'apoA-I et de l'apoE impliquent différentes protéines régulant le métabolisme du cholestérol	167
10) L'apoA-I et l'apoE stimulent la croissance tumorale <i>in vivo</i>	171
Chapitre IV : Discussion	173

1) Résumé des résultats	173
2) Une expression instable.....	173
3) L'apoA-I et l'apoE modulent la distribution du cholestérol dans les cellules cancéreuses mammaires, mais pas exactement comme nous l'attendions	174
4) Quid des hypothèses de départ ?	176
5) L'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules MCF-7 177	
6) ABCG1 pourrait être impliqué dans l'effet médié par l'apoA-I sur les cellules MCF-7 et ABCA1 dans celui médié par l'apoE sur les cellules MCF-7	185
7) Un rôle potentiel pour la cavéoline-1	187
8) Quelles explications pour les différences observées entre la lignée MCF-7 et la lignée MDA- MB-231 ?.....	192
9) L'apoA-I et l'apoE diminuent la prolifération des cellules MDA-MB-231 : les voies de signalisation.....	194
10) L'apoA-I et l'apoE diminuent la migration des cellules MDA-MB-231, mais stimulent l'invasion.....	196
11) L'apoE inhibe la migration individuelle, mais stimule la migration collective des cellules MDA-MB-231	196
12) L'apoA-I et l'apoE modifient-elles la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux agents chimiothérapeutiques ?.....	197
13) Effets de l'apoA-I et de l'apoE <i>in vivo</i>	198
14) Perspectives thérapeutiques.....	199
Chapitre V : Conclusion	201
Références	203
Publications	236

Liste des figures

Figure 1 : Etat des lieux des chiffres du cancer du sein. 1A : Incidence des cancers du sein dans le monde en 2018, standardisée sur l'âge (femmes uniquement). Plus la couleur bleue est foncée et plus l'incidence du cancer du sein est grande dans la région considérée [14]. **1B :** De haut en bas : incidence des cancers chez la femme dans le monde en 2018, tous âges confondus, prévalence des cancers chez la femme (à cinq ans) dans le monde en 2018, tous âges confondus, mortalité par cancer chez la femme dans le monde en 2018, tous âges confondus [14]. **1C :** De haut en bas : incidence projetée en 2017 des principaux cancers chez la femme en France, mortalité par cancer projetée en 2017 chez la femme en France [15]. 34

Figure 2 : Principales voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein. Les voies PI3K/Akt/mTOR et RAS/RAF/MAPK, impliquées dans les phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires, peuvent être activées par les récepteurs HER2 ou EGFR. Ce dernier peut être activé par des protéines d'échafaudage comme NHERF1 ou EBP50, sous l'impulsion d'une liaison avec du cholestérol. Liées au cholestérol, NHERF1 ou EBP50 peuvent aussi stimuler la voie Wnt/ β -caténine, qui active la transcription du gène Myc, et ainsi stimule la prolifération. Le cholestérol présent dans les radeaux lipidiques peut contribuer à l'activation des voies PI3K et MAPK. En se liant au récepteur Smoothed, le cholestérol peut activer la voie Hedgehog, qui participe à la différenciation et à la polarisation des cellules mammaires, et stimule la prolifération et l'invasion. Le 27-hydroxycholestérol, qui est un métabolite intermédiaire du cholestérol, peut servir de ligand au récepteur ER α et ainsi contribuer à l'augmentation de la prolifération, de la migration, de l'invasion et à la stimulation de la Transition Epithélio-Mésencymateuse 94

Figure 3 : Principales voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein. Les voies PI3K/Akt/mTOR et RAS/RAF/MAPK, impliquées dans les phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires, peuvent être activées par les récepteurs HER2 ou EGFR. Ce dernier peut être activé par des protéines d'échafaudage comme NHERF1 ou EBP50, sous l'impulsion d'une liaison avec du cholestérol. Liées au cholestérol, NHERF1 ou EBP50 peuvent aussi stimuler la voie Wnt/ β -caténine, qui active la transcription du gène Myc, et ainsi stimule la prolifération. Le cholestérol présent dans les radeaux lipidiques peut contribuer à l'activation des voies PI3K et MAPK. En se liant au récepteur Smoothed, le cholestérol peut activer la voie Hedgehog, qui participe à la différenciation et à la polarisation des cellules mammaires, et stimule la prolifération et l'invasion. Le 27-hydroxycholestérol, qui est un métabolite intermédiaire du cholestérol, peut servir de ligand au récepteur ER α et ainsi contribuer à l'augmentation de la prolifération, de la migration, de l'invasion et à la stimulation de la Transition Epithélio-Mésencymateuse 96

Figure 4 : Plasmides utilisés pour la transfection des ADN codants pour les protéines apoA-I, apoE et GFP. Les plasmides (GeneCopoeia, Tetu-bio) contiennent un gène de résistance à l'ampicilline (utilisée pour l'étape de sélection bactérienne lors de l'amplification des plasmides) ainsi qu'un gène de résistance à la puromycine (utilisée pour l'étape de sélection des cellules transfectées, de façon à obtenir des lignées cellulaires transfectées stables). 120

Figure 5 : Principe du système xCELLigence pour la quantification de la prolifération cellulaire en temps réel et sans marquage. 5A : Schéma d'un puits de prolifération. Les puits sont recouverts d'électrodes en or. Le courant circule entre deux électrodes grâce au milieu de culture qui fait état d'électrolyte. Lorsque les cellules adhèrent aux électrodes, cela crée une résistance au passage du courant alternatif (impédance électrique). Plus les cellules prolifèrent, plus la résistance est importante, plus l'impédance augmente. **5B :** Exemple d'une expérience de prolifération/apoptose. La première partie de la courbe correspond toujours à une phase d'adhésion. Elle est ensuite suivie d'une phase de prolifération linéaire (l'impédance électrique augmente proportionnellement au temps), qui s'achève par une phase plateau lorsque la confluence maximale est atteinte (toutes les électrodes sont alors tapissées de cellules, l'impédance stagne). Dans cet exemple, un stimulant de l'apoptose est ajouté, et

lorsque les cellules meurent, elles se détachent des électrodes, ce qui provoque une diminution de l'impédance [414]. 126

Figure 6 : Techniques de quantification de la migration et de l'invasion cellulaires. 6A : Migration individuelle en insert de migration. L'insert de migration est rempli de milieu DMEM 1% SVF 1% P/S contenant la suspension cellulaire, et déposé dans un puits contenant du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S (chimioattractant). Il possède une membrane poreuse que les cellules traversent, attirées par le sérum du milieu servant de chimioattractant. Les cellules se rapprochent de la membrane, se déforment, traversent la membrane, avant de se retrouver de l'autre côté. Lorsque la migration est arrêtée, les cellules se situant sur l'insert, côté milieu chimioattractant, sont fixées et colorées au cristal violet. **6B :** Migration individuelle en insert de migration xCELLigence. La membrane poreuse est recouverte d'électrodes en or. Au passage des cellules, la résistance au passage du courant est mesurée par le système. Plus les cellules traversent la membrane et plus l'impédance électrique augmente [415]. **6C :** Inserts d'invasion. Les inserts sont similaires à ceux utilisés pour la migration cellulaire, à ceci près qu'ils sont équipés d'un matrigel, que les cellules doivent envahir avant de pouvoir traverser la membrane poreuse. 129

Figure 7 : Expression de l'apoA-I in vivo et in vitro. 7A : Expression de l'apoA-I au niveau de l'ARNm dans les tissus sains (NX : Normalized eXpression). Les données présentées ici sont issues de la combinaison de trois sources différentes : le Human Protein Atlas (HPA), le projet Genotype-Tissue Expression (GTEx), et le projet FANTOM5 [418]. **7B :** Expression de l'apoA-I au niveaux protéique dans les différents types de cancer [418]. Les données protéiques pour tissus sains ne semblent pas être disponibles. **7C :** Expression de l'apoA-I dans différentes lignées cellulaires (en haut : l'expression dans chacune des lignées considérées individuellement, en bas : l'expression dans les lignées moyennée et regroupée par organe) [418]. 140

Figure 8 : Expression de l'apoE in vivo et in vitro. 8A : Expression de l'apoE au niveau ARNm dans les tissus sains (NX : Normalized eXpression). Les données présentées ici sont issues de la combinaison de trois sources différentes : le Human Protein Atlas (HPA), le projet Genotype-Tissue Expression (GTEx), et le projet FANTOM5 [418]. **8B :** Expression de l'apoE au niveau protéique dans les tissus sains [418]. **8C :** Expression de l'apoE au niveau protéique dans les différents types de cancer [418]. **8D :** Expression de l'apoE dans différentes lignées cellulaires (en haut : l'expression dans chacune des lignées considérées individuellement, en bas : l'expression dans les lignées moyennée et regroupée par organe) [418]. 143

Figure 9 : Expression de l'apoA-I et de l'apoE dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. 9A : Schéma hypothétique des mécanismes attendus. En exprimant l'apoA-I, nous nous attendions à favoriser une sortie de cholestérol médiée par le transporteur ABCA1. En surexprimant l'apoE, nous nous attendions à favoriser une entrée ou une sortie de cholestérol. Dans chacun des cas, l'impact de l'une ou l'autre de ces apolipoprotéines sur le métabolisme du cholestérol visait à freiner (dans le cas de l'apoA-I, et potentiellement de l'apoE si cette dernière devait favoriser une sortie de cholestérol) ou stimuler (dans le cas où l'apoE devait favoriser une entrée de cholestérol) la croissance tumorale. **9B :** Visualisation de la fluorescence des cellules contrôles transfectées avec l'ADNc de la GFP. L'échelle représente 500µm. **9C :** Analyse de l'expression de l'apoA-I et de l'apoE au niveau de l'ARNm par RT-qPCR dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 transfectées (N=4 ; n=6). L'expression de l'apoA-I et de l'apoE est statistiquement significative dans le cas des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. **9D :** Analyse de l'expression de l'apoA-I et de l'apoE au niveau protéique par immunofluorescence. L'échelle représente 10 µm. Les noyaux cellulaires ont été colorés grâce au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et apparaissent en bleu, l'apoA-I ou l'apoE apparaissent en rouge. 146

Figure 10 : L'apoA-I et l'apoE modifient le métabolisme du cholestérol des lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. 10A : Mesure du contenu cellulaire en cholestérol (total et libre) et en esters de cholestérol par HPTLC et mesure du contenu cellulaire en stérols par GC (N=3 ; n=3). **10B :** Coloration du cholestérol par la filipine (N=2 ; n=3). L'échelle représente 10µm. **10C :** Mesure de la fluidité membranaire grâce à la sonde di-4-ANE (N=3, n=4). En comparaison à une

condition contrôle, une augmentation de la valeur de GP signifie que la membrane plasmique est plus rigide, tandis qu'une diminution de la valeur de GP signifie au contraire que la membrane plasmique est plus fluide..... 150

Figure 11 : L'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération des cellules MCF-7, mais diminuent la prolifération des cellules MDA-MB-231. 11A : Mesure de la prolifération par trois techniques différentes. A gauche : par comptage (N=3 ; n=6) ; au milieu : par coloration au cristal violet (N=3, n=12 pour les cellules MCF-7 ; N=3, n=6 pour les cellules MDA-MB-231) ; à droite : par mesure de l'impédance (xCELLigence) (N=3 ; n=5). En haut : les cellules MCF-7, en bas : les cellules MDA-MB-231. A chaque fois, les cellules sontensemencées dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF. Dans le cas de la mesure par comptage et par coloration au cristal violet, les résultats sont exprimés en ratio de la valeur correspondant à un temps 0 (6h ou 24h après ensemencement). **11B :** Analyse des voies de signalisation en réponse à un stimulus de prolifération (après ensemencement et sevrage à la BSA pendant 24h, la prolifération est stimulée en remplaçant le milieu de culture par un milieu DMEM contenant 10% de SVF). Seules sont représentées les cellules MCF-7. **11C :** Prolifération des cellules MCF-7 en présence d'inhibiteurs de la voie PI3K ou MAPK (N=1 ; n=3). En haut : inhibition de la voie MAPK avec 10µM d'U0126 ; en bas : inhibition de la voie PI3K avec 15µM de LY294002. 154

Figure 12 : L'apoA-I et l'apoE modifient les propriétés migratoires et invasives des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. 12A : Migration des cellules MCF-7. Les cellules sont ensemencées dans des inserts de migration standards (à gauche ; N=3, n=15) ou conçus pour le système xCELLigence (à droite ; N=3 ; n=5) et soumises à un gradient de sérum 1% SVF → 10% SVF, ou ensemencées à confluence avant sevrage (milieu DMEM contenant 0,1% de BSA pendant 24h) puis cicatrisation le lendemain (en bas ; N=3, n=3). La migration par cicatrisation est stimulée par du milieu DMEM contenant 10% de SVF. **12B :** Migration des cellules MDA-MB-231 (N=3, n=15 pour les inserts de migration ; N=3, n=5 pour le système xCELLigence ; N=3, n=6 pour la migration par cicatrisation). **12C :** Invasion des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (N=3, n=10 ou 15 selon les conditions). Les cellules sont là aussi soumises à un gradient de sérum 1% SVF → 10% SVF. **12D :** Migration des cellules MCF-7 en système xCELLigence, en présence d'un inhibiteur de la voie MAPK (U0126, 10µM) ou PI3K (LY294002, 15µM) dans les parties inférieures et supérieures de l'insert (N=1 ; n=3). 159

Figure 13 : Evaluation de l'impact de l'apoA-I et de l'apoE sur l'expression d'ARNm et des protéines correspondantes phares du phénomène de Transition Epithélio-Mésenchymateuse et de l'invasion dans les cellules MCF-7. 13A : Mesure de l'expression des protéines de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse au niveau protéique (Western-Blot ; N=2, n=1). **13B :** Mesure de l'expression des protéines de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse et de protéines impliquées dans le phénomène d'invasion au niveau de l'ARNm (RT-qPCR ; N=3, n=3). **13C :** Mesure de l'expression de protéines de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse au niveau de l'ARNm dans les cellules MCF-7, en présence de TGF-β. Ici, chaque condition est comparée à son équivalent avec les cellules contrôles, et seules sont indiquées les différences statistiquement significatives (N=3, n=4). 163

Figure 14 : Etude de la résistance des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE à la doxorubicine. 14A : Impact de l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE sur la résistance des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 après 48h ou 7 jours de traitement (N=3, n=4). **14B :** Modification de la sensibilité à la doxorubicine des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE en présence d'un inhibiteur du récepteur à œstrogènes (Fulvestrant) ou d'un inhibiteur du transporteur ABCA1 (Glyburide). Cette dernière expérience est une expérience préliminaire n'ayant été réalisée qu'une seule fois (N=1, n=4). 166

Figure 15 : Identification des partenaires de l'apoA-I et de l'apoE qui pourraient réguler leurs effets in vitro. 15A : Analyse de l'expression de certaines protéines clés du métabolisme du cholestérol au niveau de l'ARNm (RT-qPCR ; N=3, n=3). **15B :** Analyse de l'expression de certaines protéines clés du métabolisme du cholestérol au niveau protéique (Western-Blot ; N=3, n=1). Les

cellules HepG2 ont été utilisées comme contrôle positif. 15C : Détection par immunofluorescence de la cavéoline-1 dans les cellules MDA-MB-231 et visualisation par microscopie confocale (N=2). L'échelle correspond à 25µm. 15D : Migration des cellules MCF-7 en présence d'un siARN dirigé contre la cavéoline-1 (inserts de migration ; N=3, n=15).....	170
Figure 16 : L'apoA-I et l'apoE stimulent la croissance tumorale in vivo. 16A : Nous avons injecté cinq millions de cellules MCF-7 dans 50µL de DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et nous avons suivi la croissance tumorale pendant environ soixante jours après injection sous-cutanée de la pilule de 17β-estradiol. Les résultats présentés ici correspondent à la combinaison de deux expériences différentes (n = 10 pour les cellules MCF-7-GFP et MCF-7-apoE, n = 12 pour les cellules MCF-7-apoA-I). La bioluminescence est exprimée en « total counts », après ratio à la valeur de bioluminescence intrinsèque à chaque lignée cellulaire. Sont représentées graphiquement les moyennes assorties de leurs écart-types. L'expression de l'apoA-I ou de l'apoE conduit au développement plus rapide de tumeurs plus grosses. 16B : Mesure des stérols dans le plasma des souris par GC (N=1, n=6).	172
Figure 17 : Les particules HDL pourraient être à l'origine des effets pro-prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs que nous retrouvons dans les MCF-7 exprimant l'apoA-I. Il est possible qu'en exprimant l'apoA-I, le nombre de particules HDL soit augmenté, or il a été montré que ces dernières peuvent stimuler la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires. 17A : Résultats de Danilo et al., 2013 [451]. La migration des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 est fortement augmentée en présence de particules HDL ₃ , mais pas de particules LDL. Les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK sont suractivées en présence de particules HDL ₃ d'une manière temps-dépendante. En diminuant l'expression du récepteur à HDL SRB1 dans les cellules MDA-MB-231 : le contenu en cholestérol total diminue, la prolifération diminue, la migration diminue, et l'invasion diminue. 17B : Résultats de Cao et al., 2004 [453]. La prolifération des cellules MCF-7 augmente en présence de HDL, et ce phénomène est complètement inhibé lorsque SRB1 est rendu inactif par une mutation (« mCLA », figure de gauche). Seule l'inhibition de la voie PI3K/Akt permet de réduire significativement la prolifération induite par les MCF-7 (« WM », figure de droite). 17C : Résultats non publiés de Frank et al. La prolifération des cellules MCF-7 est stimulée par les particules LDL et les particules HDL (HDL ₂ et HDL ₃), mais ces dernières n'ont aucun effet sur les cellules mammaires non cancéreuses MCF-10A.....	183
Figure 18 : L'apoA-I et l'apoE sont-elles capables de capter le cholestérol présent dans le milieu de culture ? 18A : Mesure de la fluidité membranaire des cellules MCF-7 en présence de 1 ou 10% de sérum SVF. 18B : Mesure de la migration par cicatrisation (wound-healing) au bout de 24h dans différentes conditions. Après l'étape de sevrage (0,1% BSA pendant 24h), la cicatrice est tracée et les cellules sont incubées dans un milieu DMEM contenant 1% de SVF, 10% SVF, 1ng/mL EGF, ou 10ng/mL EGF.	184
Figure 19 : Mesure de la prolifération des cellules MCF-7 après inhibition de l'expression ABCA1, de SRB1 ou de ABCG1 via siARN. La prolifération est mesurée par le système xCELLigence. A gauche est représentée l'évolution de l'impédance au cours du temps, à droite la valeur de la vitesse de la prolifération pendant une phase linéaire (N=2, n=2).	186
Figure 20 : Analyse par RT-qPCR des changements d'expression de certaines protéines dans les cellules MCF-7 en présence d'un siARN spécifique de la cavéoline-1. Ces résultats sont issus d'une expérience préliminaire n'ayant été réalisée que deux fois (N=1, n=2).	191
Figure 21 : Analyse de la survie sans apparition de tumeur en fonction de l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE. Les cancers du sein sont séparés par type : « basal-like » à gauche, « luminal A » à droite [502].	193
Figure 22 : Etude de l'activation des voies MAPK/ERK et PI3K/Akt dans les cellules MDA-MB-231 en réponse à un stimulus (10% SVF). Ceci est une expérience préliminaire n'ayant été réalisée qu'une seule fois.....	195

Abréviations

4T1 : cellules cancéreuses mammaires d'origine murine

4T1.2 : lignée cellulaire dérivée des 4T1, plus prompte à former des métastases osseuses

5,6 α -EC : 5,6 α -epoxycholestérol

27HC : 27-hydroxycholestérol

α -SNAP : N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Alpha

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

ABCG1 : ATP-binding cassette transporter G1

ABCG5 : ATP-binding cassette transporter G5

ABCG8 : ATP-binding cassette transporter G8

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN codant

aPKC : atypical Protein Kinase C

apoA-I : apolipoprotéine A-I

apoB : apolipoprotéine B

apo B-100 : apolipoprotéine B-100

apoE : apolipoprotéine E

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BARD1 : BRCA1 Associated RING Domain 1

BCA : acide bicinehoninique

Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large

BRCA1 : breast cancer 1

BRCA2 : breast cancer 2

BRCT : BRCA1 C Terminus

BRIP1 : BRCA1-interacting protein 1

BRK : Breast Tumor Kinase

BSA : Bovin Serum Albumin/albumine sérique bovine

BT474 : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

BTG2 : B-cell Translocation Ggene 2

Ca²⁺ : calcium

Cav1 : cavéoline-1

CD226 : aussi appelée DNAM-1 pour « DNAX Accessory Molecule-1 »

CDC42 : Cell Division Control protein 42 homolog

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CETP : Cholesteryl-Ester-Transfer Protein

CHEK2 : checkpoint kinase 2

COPII : coat protein II

CSL : acronyme de “CBF-1/RBPJ- κ (Homo sapiens/Mus musculus), Suppressor of Hairless (Drosophila melanogaster), Lag-1 (Caenorhabditis elegans)

CYP27A1 : cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1

CYP7B1 : cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCIS : Ductal Carcinoma *In Situ*

DHA : acide docosahexaénoïque

DIA1 : diaphanous 1

DLG : discs large

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTPs : dATP (désoxy-adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy-cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy-guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate)

DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

EBP50 : ERM Binding Protein 50

E-cad : cadhérine E

ECL : enhanced chemiluminescence

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR2 : Epidermal Growth Factor Receptor 2

EGTA : ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

eNOS : endothelial nitric oxide synthetase

EPA : acide eicosapentaénoïque

EPIC : European Investigation into Cancer and Nutrition

ER : Estrogen Receptor

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

FBW7 : F-box/WD repeat-containing protein 7

FGF : Fibroblast Growth Factor

FHS : Family History Score

FVB-N : souche de souris sensibles au virus « Friend leukemia virus B NIH »

GADD45 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GC : chromatographie en phase gazeuse

GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor

GLI-1 : Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1

GLI-2 : Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1

GP value : Generalized Polarisation value

GSK-3 β : Glycogène Synthase Kinase 3 bêta

GTPase : enzymes catalysant l'hydrolyse de la GTP (guanosine triphosphate) (GTP)

HepG2 : cellules cancéreuses hépatiques d'origine humaine

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HER3 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-3

HDL : High Density Lipoprotein

HGF : Hepatocyte growth factor

HMG-CoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A

HMGCR : HMG-CoA Réductase

HMGCS : HMG-CoA Synthase

HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans

HTPLC : High-performance thin-layer chromatography

HR : Hazards Ratio (équivalent du Risque Relatif dans le cas où le risque n'est pas constant en fonction du temps, généralement utilisé dans le cadre d'analyses de survie)

H-Ras : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

HTB-126 : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

HTB-20 : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

IBC : Inflammatory Breast Cancer

IC_{95%} : Intervalle de Confiance à 95%

IDC : Invasive Ductal Carcinoma

IGF1 : Insulin-like Growth Factor-1

ILC : Invasive Lobular Carcinoma

IMC : Indice de Masse Corporelle

Insig-1 : Insulin-induced gene protein-1

INPP4B : Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II

JAK : Janus kinase

JIMT-1 : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

Jnk : c-Jun N-terminal kinase

LCAT : Lecithin-cholestérol acyltransférase

LDL : Low Density Lipoprotein

LDLR : LDL Receptor

LGL : Lethal Giant Larvae

LRP5/6 : LDL-R-Related Protein 5/6

LUC : luciférase

LXR : Liver X Receptor

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCF-10A : cellules mammaires épithéliales non cancéreuses d'origine humaine

MDA-MB-231 : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

MDA-MB-436 : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

MDM2 : Murine Double Minute 2

MEK : MAPK/ERK

MET : Metabolic Equivalent Task

Mg²⁺ : Magnésium

miR-33 : microARN-33

MMP1 : Matrix metalloproteinase-1

MMP2 : Matrix metalloproteinase-2

MMP3 : Matrix metalloproteinase-3

MMP7 : Matrix metalloproteinase-7

MMP9 : Matrix metalloproteinase-9

MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus

mTor : mammalian target of rapamycin

MT1-MMP : Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase

MVK : mévalonate kinase

NBSS : Canadian National Breast Screening Study

N-cad : cadhérine N

NHERF1 : Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor

NICD : intracellular domain of the notch protein

NIH 3T3 : fibroblastes d'origine murine

NF-κB2 : nuclear factor-kappa B

NOR1 : Neuron-derived orphan receptor 1

NPC1L1 : Niemann-Pick C1-Like 1

NSF : N-ethylmaleimide Sensitive Factor

Nur77 : aussi appelé NGFIB (Nerve Growth Factor IB)

OR : Odds Ratio (probabilité d'évènement dans un groupe divisée par la probabilité de non-évènement dans le même groupe, le tout divisé par l'équivalent dans le groupe de référence)

P/S : Pennicilin/Streptomycin

PALB2 : Partner and localizer of BRCA2

PALS1 : Proteins Associated with Lin Seven 1

PAK1 : P21 Activated Kinase 1

PAR3 : Partitioning-defective protein 3

PAR6 : Partitioning-defective protein 6

PARP : Poly-ADP-Ribose-Polymérase-1

PATJ : Protein Associated To Tight Junctions

PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1

PEST : sequence peptidique riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), et thréonine (T)

PGF : Platelet Growth Factor

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIDD : P53-Induced Death Domain Protein

PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

PP2A : Protéine Phosphatase 2

PR : Progesterone Receptor

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

PTCH-1 : Protein patched homolog 1

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PTPM : Protein Tyrosine Phosphatase M

PyVmT : Polyoma virus middle T antigen

RAC1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RAP-80 : receptor-associated protein 80

RCT : Reverse Cholesterol Transport/Transport inverse du cholestérol

RE : Réticulum Endoplasmique

RET : rearranged during transfection

RING : Really Interesting New Gene

ROCK : Rho-associated protein kinase

RT-qPCR : Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction

RR : Risque Relatif (probabilité d'évènement dans un groupe divisée par la probabilité d'évènement dans le groupe de reference)

RXR : Retinoid X Receptor

S1P : Site-1 Protease

S2P : Site-2 Protease

SCAP : SREBP Cleavage-Activating Protein

SCRIB : Scribble Planar Cell Polarity Protein

SCP1 : Synaptonemal Complex Protein 1

SDS : Sodium dodécylsulfate

SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator

SHH : Sonic Hedgehog

siARN : small interfering ARN (petit ARN interférent)

SOAT1 : Sterol O-Acyl Transferase 1

SOAT2 : Sterol O-Acyl Transferase 2

SRB1 : Scavenger Receptor, class B type 1

SRE : Sterol Regulating Element

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein

SREBP1 : Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1

SREBP2 : Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2

StAR : Steroidogenic acute regulatory protein

StARD3 : StAR-related lipid transfer protein 3

STAT : Signal transducer and activator of transcription

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

STK11 : Serine/Threonine Kinase 11

SVF : Sérum de Veau Fétal

T47D : cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine

TBS : TRIS-Buffered Saline

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF : Transformation Growth Factor

TNM : système de classification des cancers basé sur la propagation de la maladie au niveau du site de la tumeur primitive (T), des ganglions lymphatiques (N), et à distance avec développement de métastases (M)

TIMP1 : TIMP metallopeptidase inhibitor 1

TIMP2 : TIMP metallopeptidase inhibitor 2

TP53 : Tumor Protein 53

TYK2 : Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2

VAMP-2 : Vesicle-associated membrane protein 2

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VLDL : Very Low-Density Lipoprotein

VLDLR : Very Low-Density Lipoprotein Receptor

vSNARE : vesicular- Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

ZEB : Zinc finger E-box-Binding homeobox

Chapitre I : Introduction

1) Cancer du sein : généralités

a. Historique

Le cancer du sein pose un défi aux scientifiques depuis l'Antiquité. Au fil du temps, il s'est agi de comprendre non seulement quelles étaient les origines de cette maladie et de quelle manière elle se propageait, mais aussi et surtout d'améliorer nos capacités à la diagnostiquer et de découvrir comment l'éliminer par la chirurgie (ablation physique), la chimiothérapie (destruction des cellules) ou des modifications biologiques (thérapies ciblées visant des récepteurs cellulaires ou des enzymes).

En remontant l'horloge, on retrouve des traces de la description du cancer du sein jusque dans l'Égypte et la Grèce antiques. Les Égyptiens décrétaient la maladie incurable dès lors que ce que l'on n'appelait pas encore « tumeur » était « froide au toucher, bombée, et étendue à tout le sein », et les Grecs avaient pour coutume de livrer des offrandes en forme de sein au dieu gréco-romain de la médecine Asclépios pour se préserver de cette maladie [1, 2]. Depuis, et encore aujourd'hui, les savants et médecins qui ont fait l'Histoire se sont donnés pour tâche d'éradiquer cette maladie, chacun d'entre eux apportant sa vision, son explication, et sa stratégie thérapeutique. Ainsi, Hippocrate, en 400 avant J-C, appliqua au cancer du sein sa célèbre théorie des humeurs. Leonide d'Alexandrie, au premier siècle après J-C, détailla une méthode précurseur de nos chirurgies actuelles. Galen, en 200 après J-C, expliquait le cancer du sein par une accumulation de bile noire dans le sang et tentait de la soigner en laissant les plaies se vider de cette bile. Au Moyen-Âge, les Chrétiens décidaient de s'en remettre à leur foi tandis que les Musulmans traduisaient et préservaient les travaux de la Grèce antique. La Renaissance fut une période propice aux progrès de la chirurgie. Si les théories se multiplièrent, et parfois s'égarèrent quant à la cause de la maladie, le but premier des scientifiques et médecins de l'époque consista en effet à tenter de retirer la tumeur par tous les moyens possibles et imaginables (des documents relatent notamment des tentatives d'ablation totale du muscle pectoral ou d'amputation du sein, qui à cette époque-là s'opéraient encore sans la moindre anesthésie), ou même à stranguler la tumeur pour en causer le rétrécissement puis à terme, la disparition. Au XIX^{ème} siècle, les techniques de chirurgie furent

rendues moins dangereuses par le développement des techniques de désinfection et de stérilisation du matériel, l'apparition des gants chirurgicaux, la démocratisation de l'anesthésie générale, et l'amélioration de la transfusion sanguine grâce à la découverte des groupes sanguins. Les microscopes permirent d'observer et de différencier les cellules normales des cellules cancéreuses (grâce aux travaux de Hooke au XVII^{ème} siècle jusqu'à ceux de Müller et Virchow au XIX^{ème} siècle). Müller, justement, réfuta la théorie des humeurs et décréta qu'une tumeur était constituée de cellules vivantes, et que le phénomène de métastase n'était finalement rien d'autre que la propagation de ces cellules. William S. Halstead réalisa en 1894 une mastectomie qui posera les règles de la chirurgie moderne : l'ablation du tissu cancéreux dans sa globalité en une seule fois de manière à en limiter la progression. Au XX^{ème} siècle commença à émerger la théorie d'une origine hormonale du cancer du sein, poussée par le constat suivant : la maladie touchait davantage et de façon plus agressive les jeunes femmes. Pour répondre à cela, Beatson initia dès 1896 la période dite de « chirurgie endocrine », bien avant la découverte des récepteurs d'œstrogène en 1966 [3] et les débuts de l'ovariectomie et de la surrénalectomie, qui permettaient d'entraîner une diminution de la taille de la tumeur chez des femmes avec un cancer du sein à un stade avancé [4]. Stanley Boyd constata néanmoins par la suite que seulement un tiers des patients répondaient positivement à ce genre de méthodes thérapeutiques, et que leur succès ne durait en moyenne que un à deux ans [5 , 6]. Ces deux méthodes, drastiques, furent par la suite progressivement remplacées par des thérapies anti-hormonales (comme par exemple la prescription d'inhibiteurs d'aromatase, ou de tamoxifène, qui est un SERM, « Selective Estrogen Receptor Modulator »). A cette période, les petites chirurgies furent privilégiées aux grosses. Se propagea tout doucement l'idée que la chirurgie seule ne suffisait pas. Pour contrecarrer ce problème, les techniques de radiation et de nouvelles méthodes de chimiothérapie se développèrent, et les progrès de la mammographie permirent de déceler les lésions cancéreuses plus tôt, et l'ensemble de ces nouvelles techniques permit de compléter la chirurgie. Mais dès la fin du XIX^{ème} siècle et tout au long du XX^{ème} siècle, on ne se limite plus à la réparation, c'est le début de la reconstruction. Le chirurgien français Verneuil fut le premier à transférer du tissu du sein non atteint au sein malade en 1887. Plus tard seront ensuite développées les premières prothèses mammaires [6, 7 , 8 , 9].

b. Un point sur les chiffres : état des lieux dans le monde

Au niveau mondial, le cancer le plus fréquemment diagnostiqué en 2018 était le cancer de la prostate dans 105 pays, le cancer du poumon dans 37 pays, et le cancer du foie dans 15 pays. Le cancer du poumon était la première cause de mortalité par cancer pour les hommes dans 93 pays (suivi par le cancer de la prostate dans 46 pays et le cancer du foie dans 20 pays). Mais en ce qui concerne les femmes, c'est le cancer du sein qui génère le plus de nouveaux cas dans la plupart des pays (154), suivi par le cancer du côlon (**Figure 1B**). Le cancer du sein est aussi la première cause de mortalité par cancer pour les femmes dans le monde, suivi par le cancer du poumon, et on considère qu'une femme sur huit sera un jour confrontée à cette maladie. Toujours en 2018, on estimait à 2,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer du sein diagnostiqués dans le monde, ce qui représente un cancer sur quatre pour les femmes. Cela en fait le cancer le plus souvent diagnostiqué dans la plupart des pays du monde et la première cause de mortalité par cancer dans plus de 100 pays. Les plus grosses exceptions à cette dernière règle sont l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Europe du Nord et l'Amérique du Nord, qui sont tout autant de régions dans lesquelles c'est le cancer du poumon qui est le plus dévastateur. Parallèlement, c'est dans ces mêmes régions du monde que l'incidence du cancer du sein est la plus élevée, ainsi qu'en Europe de l'ouest (Belgique, France, Pays-Bas) et du sud (Italie) (**Figure 1A**). C'est en Mélanésie que le cancer du sein tue le plus. Enfin, si l'on compare les chiffres en fonction de l'IDH (Indice de Développement Humain), on constate que l'incidence du cancer du sein chez les femmes est beaucoup plus élevée que celle des autres types de cancer à la fois dans les pays développés et dans les pays en développement [10].

c. Un point sur les chiffres : état des lieux en France

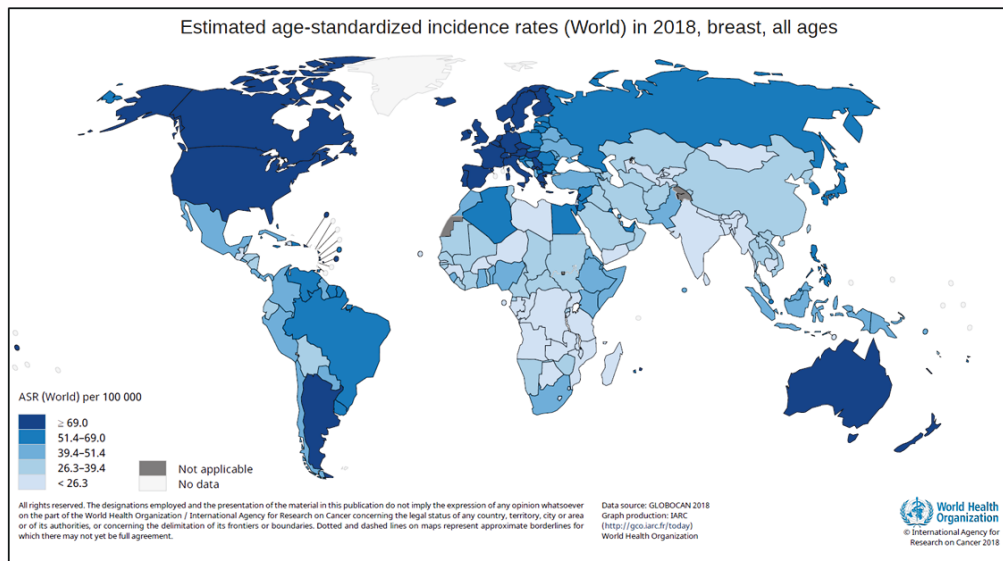
En 2018, le nombre de nouveaux cas de cancer en France (tous cancers confondus) a été estimé à 382 000 : 177 400 parmi les femmes et 204 600 parmi les hommes. L'âge médian au moment du diagnostic est de 67 ans pour les femmes, 68 ans pour les hommes. Chez ces derniers, c'est le cancer de la prostate qui est le plus souvent diagnostiqué, suivi par les cancers du poumon et colorectaux. Chez les femmes, le cancer du sein arrive en tête, suivi là aussi par les cancers du poumon et colorectaux. Tous cancers confondus, la tendance

française est plutôt à la baisse, ou tout du moins, au ralentissement. Ainsi, le taux d'incidence des cancers a baissé de 1,4% par an chez les hommes entre 2010 et 2018 (ce que l'on doit à la diminution de l'incidence des cancers de la prostate), et toujours sur cette même période, n'a augmenté que de 0,7% par an chez les femmes (hausse que l'on doit surtout à l'augmentation de l'incidence des cancers du poumon). La mortalité, elle aussi, a chuté entre 2010 et 2018 : de 0,7% par an pour les femmes et de 2% par an pour les hommes. En 2018, cela a représenté 157 400 décès : 67 800 pour les femmes avec un âge médian égal à 77 ans, et 89 600 pour les hommes avec un âge médian égal à 73 ans. En 2018, le cancer du sein était le premier cancer chez la femme en France, en termes d'incidence (avec 58 459 nouveaux cas), et en termes de mortalité par cancer (il représentait 14% des morts par cancer, soit 12 146 décès), suivi par le cancer du poumon et le cancer colorectal (**Figure 1C**), tandis que le cancer du poumon est le plus meurtrier pour les hommes (devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate). Parallèlement, pourtant, la prévalence des cancers en France augmente. En 2017, elle culminait à 3,8 millions en France métropolitaine (1 844 277 hommes et 1 991 651 femmes). Cela s'explique à la fois par l'augmentation du nombre de nouveaux cas (même si cette dernière est en baisse) mais aussi par l'amélioration de la survie des patients et par le vieillissement de la population [11].

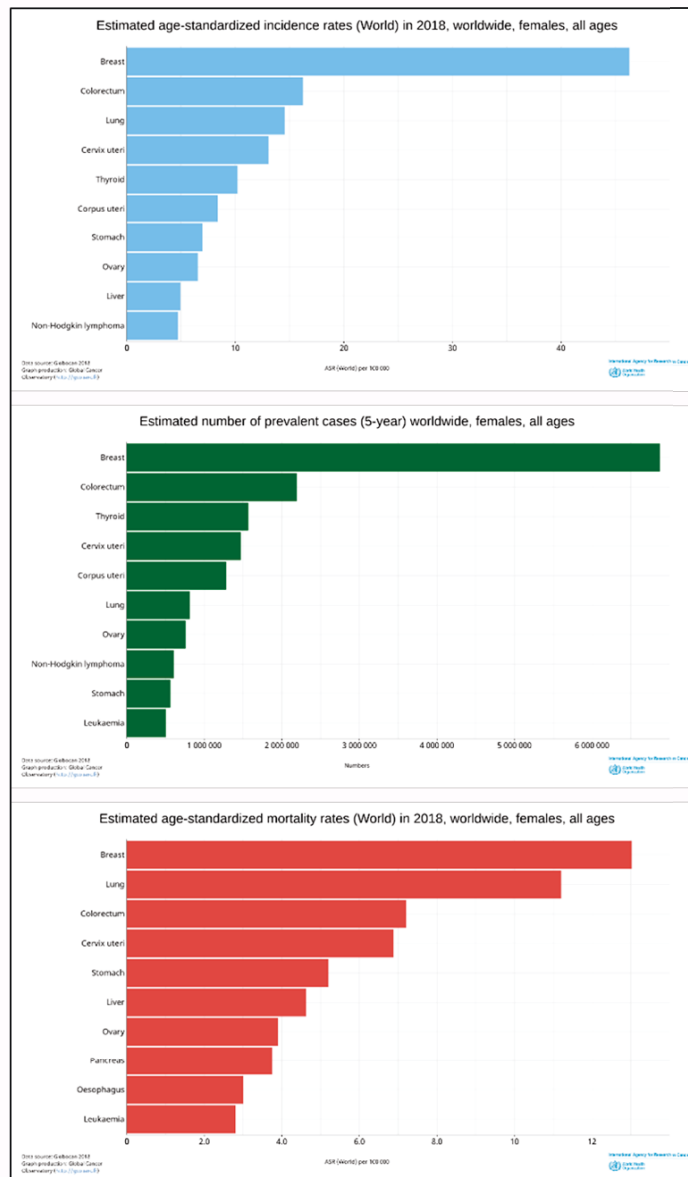
L'incidence du cancer du sein en France est globalement en hausse : en passant de 30 000 en 1990 à 58 400 en 2018, le nombre de nouveaux cas annuel a quasiment doublé, et la hausse se chiffre à 1,1% par an en moyenne. En revanche, le taux de mortalité, lui, diminue (de 1,5% par an en moyenne entre 2005 et 2012). L'âge médian au moment du décès est de 74 ans. La survie nette standardisée sur l'âge à cinq ans, elle aussi, s'améliore : elle était de 80% pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993, elle est de 87% pour les femmes diagnostiquées entre 2005 et 2010. Pour ces mêmes femmes, la survie nette standardisée sur l'âge à 10 ans est de 76%. Ces deux éléments (diminution du taux de mortalité et amélioration de la survie à cinq ans) s'expliquent notamment par l'amélioration des traitements et par un dépistage efficace [12]. Il est en effet à noter que 60% des cancers du sein sont diagnostiqués à un stade précoce en France (contre « seulement » 44% des cancers du côlon et 47 % des cancers du rectum), ce qui est d'autant plus vrai chez les personnes de moins de 75 ans. En revanche, 10% des cancers du sein sont quant à eux diagnostiqués à un stade avancé. C'est pour éviter cela que des campagnes d'information sur le dépistage du cancer du sein ont été mises en place : les femmes âgées de 50 à 74 ans (soit une population cible de près de 10 millions de personnes) sont invitées à y participer tous les deux ans. Le

taux de participation est cependant en baisse : il était de 49,9% en 2017 contre 50,3% en 2016. 7,5% des femmes dépistées s'avèrent être malades [13].

A



B



C

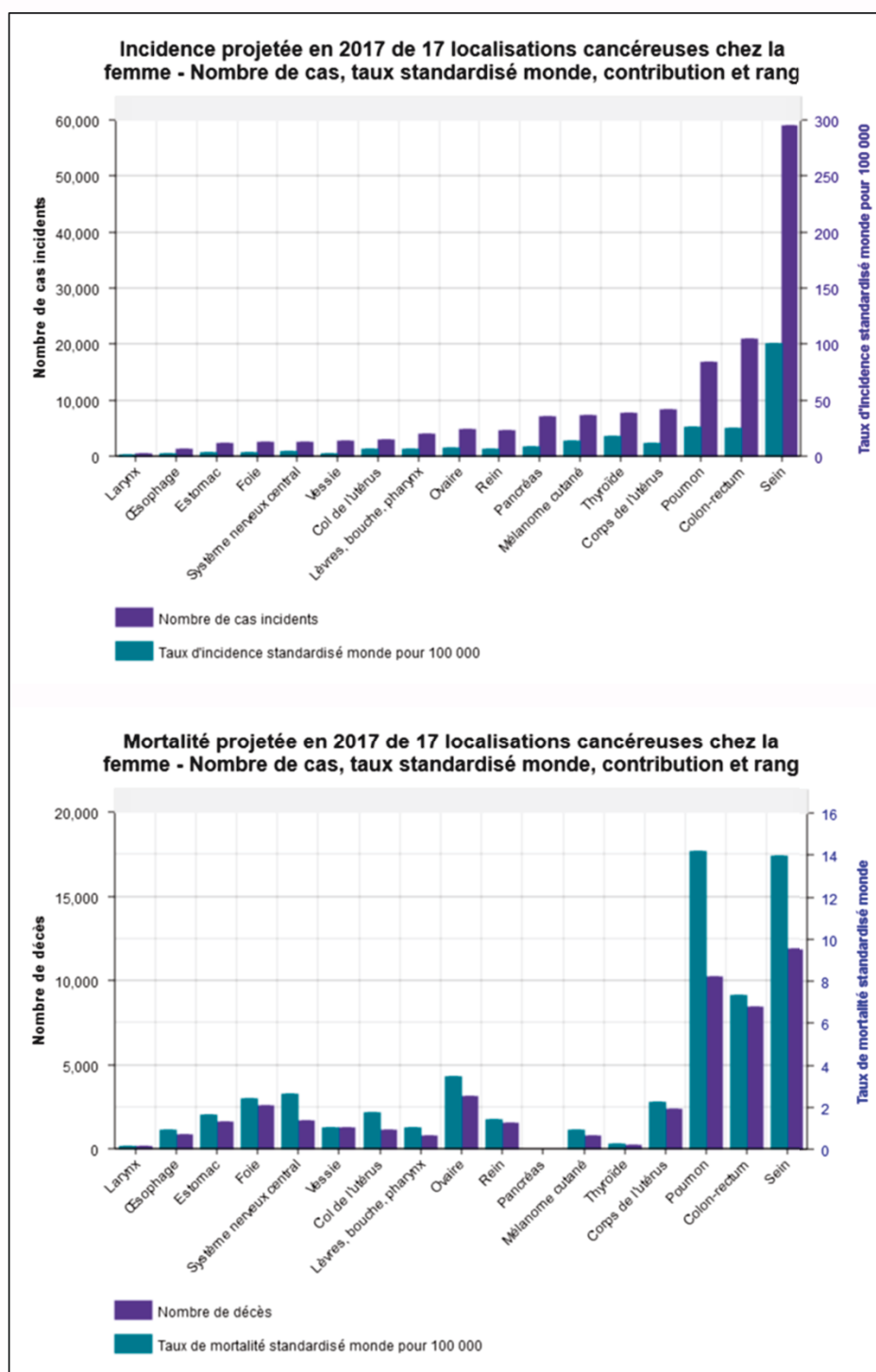


Figure 1 : Etat des lieux des chiffres du cancer du sein. 1A : Incidence des cancers du sein dans le monde en 2018, standardisée sur l'âge (femmes uniquement). Plus la couleur bleue est foncée et plus l'incidence du cancer du sein est grande dans la région considérée [14]. **1B :** De haut en bas : incidence des cancers chez la femme dans le monde en 2018, tous âges confondus, prévalence des cancers chez la femme (à cinq ans) dans le monde en 2018, tous âges confondus, mortalité par cancer chez la femme dans le monde en 2018, tous âges confondus [14]. **1C :** De haut en bas : incidence projetée en 2017 des principaux cancers chez la femme en France, mortalité par cancer projetée en 2017 chez la femme en France [15].

d. Les traitements

En fonction du type de cancer du sein, de l'âge et de l'état de santé de la patiente, des mutations génétiques impliquées, ou bien encore de la taille et du stade de la tumeur, les stratégies thérapeutiques mises en place ne seront pas les mêmes. Les thérapies disponibles actuellement se divisent en trois grandes catégories : la chirurgie, la radiothérapie, et l'usage de médicaments.

Lorsque les tumeurs sont de petite taille, la chirurgie est souvent la première étape. Radiation et autres thérapies peuvent ensuite suivre cette procédure. Cependant, dans le cas de tumeurs plus avancées, un traitement préliminaire (chimiothérapie, hormonothérapie ou thérapie ciblée) sera d'abord réalisé afin de diminuer la taille de tumeur. Les options chirurgicales peuvent consister à retirer uniquement la tumeur et une petite partie du tissu environnant (lumpectomie), ou le sein dans sa globalité (mastectomie). La lumpectomie est généralement suivie de radiothérapie afin d'éliminer toute trace éventuelle de cellules cancéreuses qui pourrait susciter une récurrence de la maladie. Parfois, il est également possible et nécessaire de procéder à une ablation des ganglions lymphatiques axillaires, car ces derniers peuvent eux aussi contenir des cellules cancéreuses. Cela se produit dans la plupart des cas de cancers du sein invasifs, mais peut néanmoins être déconseillé pour des patientes âgées de plus de 65 ans ou en mauvaise santé. La mastectomie est une chirurgie agressive qui peut aboutir à des complications, ce qui explique qu'il est généralement recommandé, si cela est possible, d'opter plutôt pour une lumpectomie combinée à de la radiothérapie. Cette dernière stratégie est cependant associée à un risque de récurrence légèrement plus élevé, bien que la mastectomie ne permette pas non plus de garantir que le cancer ne reviendra pas. Cela étant, il faut souligner qu'il n'existe pas de différence entre les deux options en termes de survie à long terme. Après la chirurgie survient ensuite l'étape de reconstruction : en utilisant des implants mammaires, ou en récoltant du tissu musculaire (ou autre) pour reconstruire le sein, ou en ayant recours à des prothèses externes [16].

La radiothérapie consiste à détruire les cellules cancéreuses grâce à des rayons X à haute énergie. Il en existe de différents types : la radiothérapie externe qui consiste à émettre des rayons de l'extérieur qui vont ensuite traverser la peau, la curiethérapie qui consiste à insérer des sources radioactives à l'intérieur du corps, et la radiothérapie intra-opératoire qui consiste à n'effectuer qu'une seule radiation dans le sein ouvert dès l'opération d'ablation de la tumeur.

Cependant, les deux dernières sont encore peu utilisées aujourd'hui. La radiothérapie s'accompagne d'un programme, qui diffère selon les spécificités propres à chaque patient, et qui peut avoir lieu avant (pour diminuer la taille de la tumeur) ou après (pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles) la chirurgie. Après une lumpectomie, la radiothérapie externe est généralement utilisée pendant trois à quatre semaines si le cancer ne s'étend pas jusqu'aux ganglions lymphatiques, pendant cinq à six semaines si c'est le cas, et elle se cantonne généralement à l'endroit où était localisée la tumeur, et non à l'ensemble du sein. Si besoin, après une mastectomie, la radiothérapie est là aussi prescrite pendant cinq à six semaines. En combinant la radiothérapie à la chirurgie, on estime que le risque de récurrence au bout de dix ans n'est actuellement que de 5%. Cependant, les effets secondaires de la radiothérapie sont nombreux : fatigue, œdème au niveau du sein, rougeurs, décoloration de la peau, brûlures ou douleurs dans la zone irradiée. La radiothérapie n'est pas recommandée pour les patientes âgées de plus de 70 ans, ou présentant des complications de santé, ou même, parfois, pour les malades avec une petite tumeur, car même si elle permet de réduire le risque de récurrence de la maladie, elle n'améliore pas significativement la survie [16].

Enfin, les thérapies reposant sur l'utilisation de médicaments sont nombreuses. On distingue la chimiothérapie, la thérapie hormonale, la thérapie ciblée, et l'immunothérapie. Elles peuvent être utilisées séparément ou combinées, et servent à la fois à réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie et à prévenir le risque de récurrence après la chirurgie. La chimiothérapie vise à éliminer les cellules cancéreuses en freinant leur prolifération. Elle se décline généralement en un programme avec un cocktail de médicaments prescrits par cycles sur une période donnée. Parmi les médicaments on peut citer le docétaxel (qui inhibe la dépolymérisation des microtubules et ainsi perturbe le cycle cellulaire), la doxorubicine (qui appartient à la famille des anthracyclines et qui est un agent intercalant et un inhibiteur de la topo-isomérase de type II), le paclitaxel (qui fonctionne de la même façon que le docetaxel), ou bien encore le gemcitabine (qui paralyse les cellules en phase G1/S en inhibant la synthèse d'ADN). La thérapie hormonale n'est efficace, comme son nom l'indique, que contre les cancers du sein hormono-dépendants. Elle peut cibler directement le récepteur aux œstrogènes (c'est le cas du tamoxifène), ou participer à la réduction des niveaux d'œstrogènes (c'est le cas des inhibiteurs de l'aromatase, qui ne peuvent fonctionner qu'après la ménopause), ou passer par l'ablation des ovaires. Le tamoxifène présente des effets secondaires (bouffées de chaleur, saignements, etc...), les inhibiteurs d'aromatase aussi (douleurs, bouffées de chaleur, fragilité osseuse avec risque d'ostéoporose, etc...). D'autres thérapies ciblées, quant à elles,

s'attaquent directement à l'un des marqueurs du cancer du sein. Ainsi, il est possible de citer le trastuzumab qui est un anticorps qui cible HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), l'olaparib qui est un inhibiteur de PARP utile pour les patientes atteintes d'un cancer HER2-négatif présentant des mutations de *BRCA1* ou *BRCA2*, l'abemaciclib, le palbociclib (approuvé pour le traitement des cancers du sein ER-positifs en complément de la thérapie anti-hormonale) ou le ribociclib, qui ciblent les cycline-dépendantes kinases CDK4 et/ou CDK6, ou bien encore l'alpelisib qui est prescrit aux malades dont le gène *PIK3CA* est muté. L'immunothérapie sert à améliorer les défenses immunitaires du malade, de façon à l'aider à mieux combattre la maladie. Ces médicaments (Atezolizumab, Pembrolizumab, par exemple) ont été approuvés aux Etats-Unis et en Europe en 2019 et sont particulièrement utiles pour les patientes atteintes de cancers du sein difficiles à soigner car métastatiques et/ou Triple-Négatifs [16].

Il est à souligner que dès 1997 était déjà constatée une efficacité de plus en plus réelle des traitements contre le cancer du sein [17]. Aujourd'hui, le cancer du sein est considéré comme l'un des cancers les plus curables. Cela concerne surtout les cancers du sein à des stades précoces (0 ou 1), avec des taux de survie à 5 ans qui sont de l'ordre de 99%, et des taux de survie à 20 ans qui dépassent les 80% [16, 18]. Les cancers Triple-Négatifs restent cependant un cas à part, étant très agressifs et beaucoup plus difficiles à soigner, avec des stratégies thérapeutiques limitées. Il semblerait néanmoins que l'immunothérapie puisse dans ce cas faire ses preuves [19].

2) Cancer du sein : mécanismes

a. Les différents types de cancers du sein

Il existe différents types de cancers du sein, qui peuvent se classer en deux catégories en fonction des cellules qui sont affectées : les carcinomes et les sarcomes. Les premiers d'entre eux démarrent au niveau des cellules épithéliales du sein, c'est-à-dire celles qui sont situées au niveau des lobes, des lobules, et des canaux terminaux qui servent à la fabrication du lait. Les seconds sont beaucoup plus rares (ils représentent moins de 1% des cancers du sein) et s'initient au niveau du stroma du sein, c'est-à-dire au niveau des myofibroblastes et des cellules des vaisseaux sanguins. Il existe cependant parfois des cancers

du sein qui transcendent ces deux catégories, avec des tumeurs mammaires résultant d'une combinaison de plusieurs types cellulaires [20 , 21]. Parmi les carcinomes, qui constituent donc la vaste majorité des cancers du sein, on distingue trois sous-types : les cancers non invasifs (aussi communément appelés cancers du sein « *in situ* »), les cancers invasifs, et les cancers métastatiques. L'un des cancers du sein les plus répandus est un cancer non invasif appelé « DCIS » (pour « Ductal Carcinoma *In Situ* »). Il se développe au sein des canaux mammaires, et bien que non invasif, peut évoluer en tant que tel et doit donc être traité. Lorsque le cancer du sein est dit invasif, les cellules cancéreuses se propagent, quittant les lobules et canaux mammaires pour envahir dans un premier temps les tissus du stroma du sein, et allant même parfois jusqu'à atteindre d'autres organes, dans les cas les plus extrêmes. Ils deviennent alors métastatiques. Deux tiers des femmes diagnostiquées avec un cancer du sein invasif sont âgées d'au moins 55 ans. Les cancers du sein invasifs peuvent être de deux types : les « IDC » (« Invasive Ductal Carcinoma »), qui sont les plus courants, et les « ILC » (« Invasive Lobular Carcinoma »), que l'on retrouve le plus souvent chez les femmes les plus âgées.

Il est important de noter que ces deux sous-types de cancers du sein sont assortis de pronostics différents, et ne sont pas traités en clinique de la même façon. Lorsqu'ils sont devenus métastatiques, les cancers du sein peuvent s'étendre jusqu'aux ganglions lymphatiques situés au niveau des aisselles, aux poumons, au foie, aux os ou au cerveau. Le fait de retirer la tumeur primaire ne permet pas toujours d'éviter les métastases, car subsistent parfois dans le corps des cellules tumorales. Le caractère métastatique d'un cancer du sein n'est pas toujours prévisible au moment du diagnostic et varie beaucoup d'une personne à l'autre. On estime cependant qu'environ 30% des femmes chez lesquelles est diagnostiqué un cancer du sein subit par la suite une évolution de la maladie en métastases [21].

Il est également possible de classifier les cancers du sein d'un point de vue moléculaire, en fonction, notamment, du profil d'expression de certains gènes parmi lesquels le récepteur aux œstrogènes (ER) et le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2). On distingue ainsi :

- Les cancers du sein « Luminal A », qui sont ER-positifs et/ou PR-positifs (Progesterone Receptor), qui sont HER2-négatifs, et qui présentent de faibles niveaux de prolifération (moins de 13% des cellules cancéreuses sont positives pour le marqueur de prolifération Ki-67). Représentant 40% des cancers du sein,

ils sont de grades peu élevés, se développent lentement, et généralement se soignent bien (par thérapie hormonale).

- Les cancers du sein « Normal-like », qui ont un profil d'expression en ARNm proche du tissu normal et qui sont similaires aux précédents, mais avec un pronostic un peu moins bon.
- Les cancers du sein « Luminal B », qui sont ER-positifs et/ou PR-positifs, qui peuvent être HER2-positifs ou négatifs, et qui présentent de hauts niveaux d'expression de Ki-67. Représentant 20% des cancers du sein, ils se développent un peu plus rapidement que les cancers du sein Luminal A et sont assortis d'un pronostic un peu moins bon que ces derniers.
- Les cancers du sein « HER2-enrichis », qui sont ER-négatifs et PR-négatifs, qui expriment fortement des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et très peu ceux des clusters luminaux et basaux, et surtout qui expriment très fortement HER2. Il faut distinguer les cancers du sein HER2-enrichis des cancers du sein HER2-positifs, car seulement la moitié de ces derniers sont HER2-enrichis, et 30% des cancers HER2-enrichis sont HER2-négatifs. Représentant 10 à 15% des cancers du sein, ils se développent plus vite que les cancers luminaux et sont assortis d'un pronostic plus mauvais que ces derniers. Les stratégies thérapeutiques employées ciblent directement HER2, généralement avec succès.
- Les cancers du sein Triple-Négatifs/Basal-like, qui sont ER-négatifs, PR-négatifs, et HER2-négatifs. Représentant 20% des cancers du sein, ils sont plus fréquents chez les femmes qui disposent de mutations du gène BRCA1, chez les femmes âgées de moins de 40 ans, et chez les femmes Afro-Américaines, et ce sont des cancers du sein très agressifs de haut grade. Les stratégies thérapeutiques disponibles sont moins nombreuses car ni les antagonistes des ER, ni les anticorps dirigés contre HER2 ne peuvent être utilisés. Hormis la chirurgie, seule la chimiothérapie peut être envisagée, ou éventuellement, les inhibiteurs des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) efficaces dans le cas des cancers résultant de mutations de BRCA1 ou BRCA2 [20 , 21].

Il existe d'autres cancers du sein, moins fréquents (représentant moins de 5% des cas, voire parfois moins de 1%). Les cancers du sein inflammatoires (IBC, « Inflammatory Breast Cancers ») se caractérisent par l'absence de grosseur palpable au niveau du sein (ce qui les rend indétectables en mammographie), et par le fait que les cellules cancéreuses bloquent les vaisseaux lymphatiques, ce qui génère différents symptômes typiques de l'inflammation. Ils sont plus souvent diagnostiqués chez les femmes jeunes, les Afro-Américaines, ou les femmes obèses ou en surpoids. Ce sont des cancers agressifs qui se développent et se généralisent rapidement. Le cancer du sein « Paget disease » est un cancer qui démarre au niveau du canal mammaire avant de se propager d'abord au niveau de la peau du mamelon, puis au niveau de l'auréole. La plupart des cellules de Paget sont HER2-positives, la moitié sont ER-positives et PR-positives. Le cancer du sein papillaire se caractérise par des cellules cancéreuses parfois de petite taille, et généralement organisées en projections digitiformes. Ce sont des cancers invasifs, mais avec de meilleurs pronostics vitaux que les autres cancers du sein invasifs. Les tumeurs Phyllodes se développent au niveau du stroma du sein et ne sont malignes que dans un quart des cas. Elles concernent le plus souvent les femmes âgées d'une quarantaine d'années, ou les femmes atteintes du syndrome Li-Fraumeni (prédisposition au cancer). Enfin, l'angiosarcome du sein commence à se développer dans les cellules épithéliales qui tapissent les vaisseaux lymphatiques ou les vaisseaux sanguins. Ils se développent et s'étendent rapidement [22].

b. Mécanismes : les théories établies

La particularité de toute cellule cancéreuse est de réussir à échapper aux contrôles et aux mécanismes qui, en situation normale, régulent la prolifération, la survie et la migration cellulaire, ce qui leur permet de proliférer à l'infini. Pour atteindre un tel état, certaines voies de signalisation pro-prolifératives, pro-migratoires, pro-invasives, ou anti-apoptotiques sont suractivées, tandis qu'au contraire, les voies de signalisation pro-apoptotiques sont inactivées. Les communications entre cellules sont coupées, la capacité d'inhibition de contact est perdue, et l'anarchie, progressivement, se met en place [23].

i. Signalisation via ER

Deux molécules semblent être à l'origine des nombreuses cascades de signalisation impliquées dans le cancer du sein hormono-dépendant : les récepteurs ER et HER2 [24]. La famille des récepteurs ER comprend à la fois des récepteurs membranaires et deux récepteurs

nucléaires, ER α et ER β , qui sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes [25 , 26]. ER α est celui qui, en clinique, est utilisé comme marqueur, et on estime que 75% des cas de cancers du sein sont ER-positifs. Il existe notamment un lien fort entre les récepteurs ER et BRCA1. En effet, ce dernier est un gène suppresseur de tumeur, notamment car il est capable d'inhiber l'activation transcriptionnelle médiée par ER α [27]. Un des mécanismes principaux par lequel l'ER α participe au développement du cancer du sein implique la cycline D1, qui est capable de se lier au récepteur pour activer, en présence d'œstrogènes, la transcription des Cyclines-Dépendantes Kinases 4 et 6 (CDKs). Ces dernières stimulent le passage des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire [28 , 29].

ii. Voie HER2

La famille de protéines HER (Human Epidermal growth factor Receptor) regroupe les récepteurs tyrosine kinase HER1, HER2, HER3 et HER4. Ils sont exprimés dans les tissus normaux comme dans les tissus cancéreux. HER2 en est le représentant principal dans le cadre du cancer du sein. Structuellement, les protéines HER se divisent en trois parties : un domaine extracellulaire de liaison à un ligand, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire qui est le domaine tyrosine kinase. La première étape d'activation de HER2 est une dimérisation avec un autre membre de la famille HER (HER3), qui survient après liaison du ligand (heregulin pour HER3) au niveau extracellulaire (qui induit un changement de conformation). En plus de cette dimérisation se produit aussi la phosphorylation des résidus tyrosine de son domaine intracellulaire. Ensuite, le dimère phosphorylé peut activer certaines voies de signalisation parmi lesquelles la voie RAS–RAF–MEK–MAPK, qui stimule la prolifération cellulaire en agissant sur des cascades de signalisation cyclines-dépendantes, et la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K, via Akt et mTor), qui participe fortement à la survie cellulaire [26 , 30 , 31]. De toute la famille HER, HER2 est celui qui possède l'activité tyrosine-kinase la plus élevée, et les dimères contenant HER2 sont ceux qui possèdent l'activité de signalisation la plus élevée [32]. L'activation de HER2 dans le cancer du sein entraîne aussi souvent l'activation de HER1, qui est un autre membre de la famille des récepteurs HER souvent surexprimé dans les cancers [26].

Il apparaît que les cascades de signalisation impliquant le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sont également impliquées (et suractivées) dans le cancer du sein [26] ce qui permettrait d'activer l'angiogenèse au niveau des tumeurs.

iii. Voie canonique Wnt/beta catenin

Une autre voie de signalisation impliquée dans le cancer du sein est la voie Wnt/ β -caténine. Les protéines Wnt ont des rôles multiples dans la cellule : elles participent à la différenciation cellulaire à l'ère embryonnaire et à l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte. Lorsque les protéines Wnt sécrétées se fixent aux récepteurs Frizzled et LRP5/6 (Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein), cela permet de recruter les protéines Axin et Dishevelled au niveau de la membrane plasmique et ainsi d'inhiber la protéine GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase). Cette dernière est un régulateur négatif de la voie Wnt, et le fait de l'inhiber va diminuer l'ubiquitinylation de la β -caténine et ainsi entraîner une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau où elle agira comme co-activateur transcriptionnel de certains oncogènes comme par exemple le gène Myc. Inhiber la voie Wnt permet de provoquer la dégradation de la β -caténine, ce qui lève l'activation transcriptionnelle des oncogènes, et ainsi freine le développement tumoral [20 , 33].

iv. CDK

Les CDKs, déjà mentionnées plus haut, participent elles aussi à la progression du cancer du sein. On rapporte en effet parfois une surexpression de la cycline D1 et de la cycline E ainsi qu'une diminution de l'expression de p27Kip1, qui est un inhibiteur des CDKs, dans les cancers du sein (60% des cancers du sein sont notamment concernés par la surexpression de la cycline D1). Lorsque c'est le cas, cela est généralement le signe d'un mauvais pronostic qui passerait notamment par une résistance aux thérapies endocrines [34].

v. PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR est l'une des voies les plus touchées dans les cas de cancers du sein. Au début de cette cascade de signalisation, la protéine Ras interagit avec p85 (qui est la sous-unité régulatrice de PI3K) ou via des protéines adaptatrices, ce qui aboutit au recrutement de PI3K au niveau de la membrane. Ainsi activée, PI3K va phosphoryler le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) pour ainsi produire le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3). Puis PIP3 va à son tour être recruté à la membrane et ainsi activer des protéines comme PDK1 ou Akt. Celle-ci phosphoryle la Tubérine, qui est une « GTPase-activating » protéine de Rheb (un homologue de Ras), ce qui l'inactive. Par conséquent, Rheb, sous sa forme liée à la GTP, s'accumule et active le complexe mTOR/Raptor, ce qui, *in fine*, induit la synthèse de protéines, la croissance cellulaire et la progression dans le cycle cellulaire. mTOR est également capable de former un complexe avec Rictor pour

phosphoryler Akt au niveau de Ser473, ce qui l'active. Les protéines PTEN et INPP4B sont des régulateurs négatifs de cette voie : ils sont capables de déphosphoryler PIP3 et PIP2, respectivement [35 , 36]. La voie PI3K est également impliquée dans la résistance à l'ainokis et dans l'apoptose médiée par la protéine p53 [37 , 38 , 39]. Une mutation de PI3K conduit à la dédifférenciation des cellules mammaires luminales ou basales, tandis qu'une suractivation d'Akt, et en cascade de mTOR, peut conférer aux cellules une résistance aux thérapies endocrines, qu'il est possible de contrecarrer en inhibant mTOR [40 , 41 , 42].

vi. Notch

La voie Notch regroupe cinq ligands (les protéines transmembranaires Delta-like 1, 3 et 4, et Jag 1 et 2) et le récepteur Notch. Cette voie est activée lorsque l'un des ligands lie le récepteur Notch d'une cellule à celui d'une cellule voisine via le domaine extracellulaire du récepteur. Cela entraîne un clivage qui permet de libérer le domaine intracellulaire de Notch (NICD). Une fois détaché de la membrane plasmique, ce dernier se dirige vers le noyau où il se lie au facteur de transcription CSL (« CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1 ») pour réguler la transcription de plusieurs gènes. Sans NICD, le facteur CSL se lie au promoteur de certains gènes et recrute des co-répresseurs, bloquant ainsi la transcription de ces gènes, mais lorsque NICD s'y fixe, il empêche la liaison des répresseurs par un phénomène de compétition et favorise au contraire le recrutement de co-activateurs. Parmi les gènes concernés (qui n'ont pas encore été tous identifiés) se trouve notamment le régulateur du cycle cellulaire Waf1, impliqué en particulier dans la différenciation cellulaire. En réalité, cette voie reste assez méconnue. Certaines études la pointent du doigt comme un mécanisme promoteur de tumeur : la voie serait impliquée dans des phénomènes de résistance à l'apoptose, d'ainokis, ou de différenciation, activerait la voie PI3K, induirait l'expression de HER2 ou de NF- κ B2 [43 , 44 , 45]. D'autres études ont au contraire plutôt fait émerger la voie Notch comme un mécanisme suppresseur de tumeur, qui passerait notamment par l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine [43]. Dans le cas précis du cancer du sein, une forte expression de Notch1 et/ou de Jag1 au niveau des tumeurs mammaires est associée à de mauvais pronostics et à une diminution significative de la survie à cinq et à dix ans [46 , 47]. Il a également été montré que le fait de bloquer Notch4 avec un anticorps spécifique empêche la régénération des cellules mammaires [48].

vii. BRK

Il existe une kinase appelée « Breast tumor kinase » (BRK), qui a été retrouvée pour la première fois au niveau des tumeurs mammaires en 1994 (mais qui n'est pas retrouvée au

niveau du tissu sain ou des lésions bénignes) et qui est surexprimée dans plus de 60% des cas de cancers du sein (voire plus de 80% selon certaines études) [49 , 50]. Inhiber BRK conduit à diminuer la phosphorylation des voies de HER2, PTEN, MAPK/ERK, p38/MAPK, et STAT3, à diminuer l'expression de la cycline E des cellules cancéreuses mammaires T47D, BT474 et JMT-1, et réduit la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Activer BRK, au contraire, permet de stimuler la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231, tout en provoquant une suractivation de la voie MAPK [51 , 52].

viii. Sonic Hedgehog

La voie Sonic Hedgehog (SHH), qui peut être régulée par le cholestérol, participe à la croissance et à la différenciation cellulaire et est particulièrement importante pour le développement de la glande mammaire. Patched homolog-1 (PTCH-1) et glioma-associated oncogene-2 (GLI-2) sont deux des cibles de cette voie. Le fait de les inhiber conduit à des anomalies dans la morphogénèse ductale, et il semblerait que ces deux gènes soient perturbés dans le cas du cancer du sein [53 , 54 , 55]. Une forte expression de SHH, PTCH-1, et GLI-1 est corrélée avec l'invasivité du cancer du sein et est associée au phénomène de récurrence de la maladie [56].

ix. Voie JAK/STAT

La famille JAK (« Janus kinase ») compte quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ils possèdent deux domaines kinase adjacents : JH1, qui est responsable de la phosphorylation et donc de l'activation, et JH2, qui régule JH1. Inactifs, ils sont associés à des récepteurs membranaires. Après liaison du ligand (qui peut être une cytokine ou un facteur de croissance), les récepteurs changent de conformation, ce qui permet d'activer la fonction tyrosine kinase des JAKs. Ces dernières vont alors phosphoryler les résidus tyrosine des récepteurs, qui vont ainsi pouvoir recruter les STATs (« Signal Transducers and Activators ») à la membrane. La famille STAT regroupe sept membres : STAT 1 à 4, STAT5A, STAT5B, et STAT6. Les modes d'action de ces protéines sont variés : STAT3 et STAT5A/B sont généralement considérés comme des oncogènes, tandis que STAT1 peut agir dans un sens comme dans l'autre. Les STATs sont phosphorylées par les JAKs, se dimérisent et sont transférées vers le noyau. Là, elles se lient à des promoteurs spécifiques et ainsi agissent sur la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, ou l'apoptose [57]. Par ailleurs, il a été montré que l'activation de la voie JAK/STAT pouvait expliquer certains phénomènes de chimiorésistance des cellules cancéreuses mammaires, et qu'inhiber JAK2 permettait de remédier à cela [58].

x. p53

La voie de signalisation impliquant p53 n'est pas fonctionnelle en conditions normales, et n'est activée qu'en réponse à un stress (dommages causés à l'ADN, activation d'oncogènes). L'activation peut se produire de différentes façons et sous l'action de plusieurs protéines. La plupart du temps, c'est une phosphorylation au niveau de résidus sérine qui active la protéine p53 et qui ainsi permet sa liaison à l'ADN. Les gènes cibles de p53 sont nombreux et codent pour des inhibiteurs du cycle cellulaire (« cyclin-dependent kinase inhibitor 1 », qui inhibe les CDKs, 14-3-3 σ , qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/S, GADD45, qui arrête le cycle cellulaire en phase G1 ou induit l'apoptose, ou encore BTG2, qui empêche la transition G1/S), des régulateurs de l'apoptose (Bax, qui induit l'apoptose en provoquant un relargage de cytochrome C depuis la mitochondrie, Apaf 1, qui est l'une des protéines constituant l'apoptosome, ou bien encore PIDD, qui agit de concert avec la caspase-2), des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (par exemple p53R2, qui fournit des dNTPs pendant la réparation de l'ADN), et des inhibiteurs de l'angiogénèse et de la métastase (maspin, qui inhibe l'angiogénèse et l'invasion) [59 , 60 , 61 , 62 , 63 , 64].

xi. BRCA1 et BRCA2

BRCA1 et BRCA2 sont deux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (et plus spécifiquement, des cassures double-brins), principalement par recombinaison homologue (mais aussi, à moindre mesure, par jonction d'extrémités non homologues, et par hybridation simple brin). BRCA1 interagit avec des protéines codées par des gènes suppresseurs de tumeur, des protéines de réparation et des régulateurs du cycle cellulaire. Structuellement, BRCA1 contient un domaine N-terminal appelé RING, muni d'une activité ubiquitine E3 ligase, et un domaine BRCT (BRCA1 C Terminus) qui permet la liaison à ses partenaires protéiques. Ces deux domaines sont importants dans le cadre du cancer du sein, car ils peuvent tous les deux être mutés, ce qui augmente la probabilité de développer des tumeurs. C'est néanmoins le domaine BRCT qui permet la liaison entre BRCA1 et certaines protéines comme BRIP1 ou CtIP. Cette dernière permet de recruter les protéines Abraxas et RAP-80 pour former avec BRCA1 un complexe protéique nécessaire à la liaison aux cassures double-brins de l'ADN [65]. C'est ensuite principalement via CtIP que s'opère la réaction en tant que telle. BRCA1 and BRCA2 sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs.

BRCA1 ne se contente pas de participer à la réparation de l'ADN, elle est aussi l'une des protéines régulatrices du cycle cellulaire. En effet, le complexe BRCA1-BARD1 (BRCA1 Associated RING Domain 1) est impliqué dans différents points de contrôle : transition G1/S (en permettant la phosphorylation et donc l'activation de p53), phase S (mécanisme encore peu connu), transition G2/M (selon un mécanisme qui nécessiterait BARD1, RAP80 et abraxas) [66].

BRCA2, en revanche, participe essentiellement à la recombinaison homologue, en recrutant la protéine RAD51 [66]. Sans BRCA1 ou BRCA2 opérationnelles (ce qui se produit dans certains types de cancer du sein, lorsque l'un ou l'autre de ces deux gènes est muté), la réparation des dommages de l'ADN par recombinaison homologue n'est plus possible [67]. Le fait que BRCA1 et BRCA2 soient davantage impliqués dans les cancers du sein (ou de l'ovaire) que dans les autres types de cancer pourrait s'expliquer par l'association entre BRCA1 et les récepteurs à œstrogènes. BRCA1 est en effet capable de bloquer la signalisation transitant par ER α [68].

c. Les théories originales ou émergentes

Certaines études se sont interrogées sur une origine virale de certains types de cancer du sein, d'une part en remarquant que dans certains groupes de patients, environ un tiers des cas contenait des séquences d'ADN homologues à celle du Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), et d'autre part en constatant un lien entre l'incidence des cancers du sein dans le monde et la répartition géographique d'une espèce de souris (la *Mus domesticus*) [26]. Cependant, d'autres études ont remis en cause cette théorie [69].

3) Cancer du sein : les facteurs de risque

Il existe plus d'une douzaine de facteurs de risque connus du cancer du sein [70]. Il faut les séparer en deux groupes : les facteurs de risque héréditaires (mutations génétiques), et les facteurs de risque non héréditaires. En effet, s'il existe des gènes qui sont connus pour être associés au cancer du sein, des études portant sur les populations migrantes ont révélé que les facteurs non héréditaires étaient eux aussi des déterminants majeurs du cancer du sein. On estime que ce sont eux qui expliquent les différences majeures qui sont observables en termes d'incidence du cancer du sein dans le monde. Cela s'est confirmé, surtout, lorsqu'en étudiant des populations à faible risque de cancer du sein ayant migré au cours de leur vie vers des

régions du monde dans lesquelles l'incidence de la maladie était plus élevée, on s'est aperçu que le taux d'incidence du cancer du sein augmentait dans leur famille de génération en génération pour finalement rejoindre les niveaux de la population locale [10].

Dans cette partie, nous détaillerons dans un premier temps les facteurs de risque héréditaires, en passant en revue les gènes fréquemment mutés dans le cas des cancers du sein, puis nous nous intéresserons aux facteurs de risque non héréditaires, ceux qui, confirmés ou suspectés, sont dus à l'alimentation, au mode de vie, aux choix qui, additionnés, fabriquent l'histoire de chaque individu, ou à l'environnement.

a. Les facteurs de risque héréditaires

Selon certaines études, près d'un quart des cancers du sein seraient attribuables aux antécédents familiaux, mais d'autres évaluent plutôt ce chiffre autour de 5 à 10%. Ce qui est avéré, c'est que les femmes dont la mère ou une sœur a été atteinte d'un cancer du sein sont plus à risque d'en développer un à leur tour. Selon certaines études américaines, ce risque va jusqu'à être multiplié par deux, et on estime qu'aux Etats-Unis, 15% des femmes atteintes d'un cancer du sein possèdent un membre de la famille du premier degré qui est ou a été dans le même cas [71, 72]. Une autre étude, cette fois en 2017, a utilisé les données d'une cohorte de plus de 113 000 femmes âgées de 16 à 102 ans au Royaume-Uni pour se pencher sur l'association entre le risque de cancer du sein et le nombre de membres de la famille du premier degré touchés par la maladie [73]. Pour cela, ils ont interrogé les patientes quant à leurs antécédents familiaux et calculé des scores standardisés (score FHS pour « Family History Score », égal au nombre de membres de la famille du premier degré ayant eu un cancer du sein divisé par le nombre attendu de cancers du sein dans cette famille, ce dernier étant calculé en s'appuyant sur les statistiques nationales du cancer du sein de l'époque considérée pour chaque famille). De cette étude a émergé le résultat suivant : le groupe de patientes avec le plus fort FHS avait 3,5 fois plus de risque ($HR = 3,5$ [2,56–4.79]) de développer un cancer du sein que le groupe avec le FHS le plus faible. En réalité, être lié au premier degré à une seule personne ayant eu un cancer du sein suffisait déjà à faire augmenter significativement son propre risque ($HR = 1,75$ [1,53–1.92]). Ce même risque va jusqu'à atteindre 2,5 ([1,83–3.47]) si l'on considère les femmes avec au moins deux membres atteints dans leur famille (au premier degré).

Or qui sous-entend « caractère héréditaire » du cancer de sein, implique « mutations génétiques ». Plusieurs gènes sont impliqués. Parmi eux, on trouve surtout les gènes *BRCA1* et *BRCA2* [74], qui à eux deux seraient responsables d'environ 20% des cancers du sein dits familiaux [75]. Pour rappel, d'un point de vue mécanistique, *BRCA* est considéré comme un gène suppresseur de tumeur car les protéines *BRCA* sont impliquées dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue [76]. Les premières études menées sur ces deux gènes concluaient que posséder l'un ou l'autre muté était associé à un risque quasi fatal de développer la maladie, mais la pénétrance génétique de ces gènes a ensuite été revue un peu à la baisse. En effet, Antoniou et al. [77] ont combiné les données de 22 études (soit 8 139 cas, hommes et femmes) et ont estimé que le fait de posséder le gène *BRCA1* ou *BRCA2* mutés conférait respectivement un risque d'être atteint du cancer du sein avant 70 ans égal à 65% ($IC_{95\%} = [44\% - 78\%]$) et 45% ($IC_{95\%} = [31\% - 56\%]$). Ces mêmes auteurs ont également montré que les individus présentant des mutations au niveau du gène *BRCA1* avaient 30 fois plus de chance de développer un cancer du sein s'ils étaient âgés de moins de quarante ans, et 14 fois plus de chance s'ils étaient âgés de plus de 60 ans. Le risque relatif associé à des mutations du gène *BRCA2*, en revanche, n'était que de 11 si les individus étaient âgés de plus de 40 ans et, contrairement à celui de son homologue, ne variait pas significativement en fonction de l'âge. En moyenne, cependant, une femme dont le gène *BRCA1* ou *BRCA2* est muté aura 70% de chances de développer un cancer du sein avant de souffler ses quatre-vingt bougies. Les mutations de ces gènes peuvent toucher toutes les femmes, mais certains groupes ethniques y seraient davantage confrontés, notamment, aux Etats-Unis, les populations juives issues d'Europe de l'Est, populations pour lesquelles le risque de développer un cancer du sein est de l'ordre de 30 à 35% [20, 78]. Les femmes présentant ce type de mutation sont par ailleurs plus susceptibles d'être concernées par la maladie jeune, leur cancer a davantage de risque de toucher les deux seins [20], et ces mutations sont connues pour augmenter également le risque du cancer des ovaires [79].

Un autre gène impliqué dans les cancers du sein est celui codant pour la protéine p53 (*TP53*). Les mutations de ce dernier surgissent plus fréquemment dans les cancers du sein à des stades tardifs qu'à des stades précoces (38% des cas pour le premier contre seulement 18% des cas pour le second), ce qui laisse supposer que ce phénomène ne se produit que tardivement dans la progression de la maladie. Ce qui est certain, c'est que lorsqu'elles sont présentes, de telles mutations sont associées à des facteurs pronostics moins bons (tumeurs plus volumineuses, davantage de métastases) et à une diminution de la survie [80, 81]. Des

mutations entraînant une inactivité de la protéine p53 conduisent aussi à une diminution de la chimiosensibilité des cellules cancéreuses mammaires, et sont également impliquées dans le développement d'autres cancers (leucémies, cancers du cerveau, sarcomes) [20].

La voie PI3K/AKT/mTOR est la voie de signalisation oncogénique qui est la plus fréquemment activée dans les cas de cancers du sein (plus de 70% des cancers du sein sont impactés par une mutation de PI3K). La protéine PI3K est divisée en trois classes (I, II, et III) qui diffèrent selon leur fonction et leur substrat, et la classe I est elle-même divisée en classes IA et IB. C'est la classe IA qui est la plus fréquemment impliquée dans les cas de cancers du sein [82]. Le gène *PIK3CA* code pour l'une des isoformes de la sous-unité catalytique de PI3K. C'est surtout à son niveau qu'ont lieu les mutations qui sont à blâmer dans le cas du cancer du sein (elles se produisent dans environ 30% des cas de mutations de la voie PI3K, et dans 10% des cas de cancers du sein). Apparaît ensuite, en terme de fréquence d'observation, la perte de la protéine PTEN [20].

D'autres gènes, quoique moins répandus, ou à l'impact moindre, sont également impliqués dans le développement du cancer du sein. Ils sont souvent associés à d'autres maladies génétiques. Parmi eux : le gène *ATM* (dont la protéine participe à la réparation de l'ADN, et dont les mutations causent par ailleurs l'ataxie-télangiectasie ; on estime que les personnes atteintes de cette maladie ont 11% de chances de développer un cancer du sein avant l'âge de 50 ans, 30% avant l'âge de 70 ans [83]), *CHEK2* (qui code pour une sérine/thréonine kinase qui est activée pour participer à la réparation de l'ADN et éventuellement à l'arrêt du cycle cellulaire ou au déclenchement de l'apoptose en réponse aux dommages non réparables, et dont la mutation multiplie presque par deux le risque de cancer du sein [84]), le gène *PTEN* (dont les mutations conduisent au syndrome de Cowden, qui augmente le risque d'apparition de tumeurs, cancéreuses ou non, au niveau des seins ; on estime que les mutations de *PTEN* responsables du syndrome de Cowden confèrent aux malades un risque de développer un cancer du sein au cours de leur vie allant de 25 à 50% [85]), le gène *CDH1* (qui code pour la E-cadhérine, et dont les mutations augmentent le risque de cancer du sein et de cancer gastrique), le gène *STK11* (dont les mutations causent le syndrome de Peutz-Jeghers et qui sont impliqués dans de nombreux types de cancer qui ne se limitent pas au cancer du sein), ou encore le gène *PALB2* (dont la protéine interagit avec les protéines du gène *BRCA1* et *BRCA2* et ainsi peut causer des mutations de ces deux gènes) [20].

b. Les facteurs de risque non héréditaires

i. Le sexe

Le sexe est de très loin le premier facteur de risque du cancer du sein : être une femme multiplie le risque de développer un cancer du sein par 100 [22], et les hommes représentent moins de 1% des cancers du sein diagnostiqués dans le monde [86]. En revanche, il est parfois rapporté que les hommes souffrant d'un cancer du sein font face à de plus mauvais pronostics [87], quoique ces estimations tendent à disparaître après ajustement sur l'âge et sur l'année de diagnostic [88]. Cela s'explique par le fait que même si les lésions sont plus faciles à détecter que chez la femme, celles-ci sont généralement traitées plus tardivement en raison d'une prise de conscience moins forte que chez la femme, et par le fait que la progression est plus rapide étant donnée la faible distance à traverser pour atteindre les tissus adjacents [89].

ii. L'âge

L'incidence du cancer du sein est fortement liée à l'avancement en âge, ce qui en fait avec le sexe l'un des facteurs de risque les plus importants de la maladie. Dans le détail, l'incidence des cancers du sein avant 30 ans n'excède pas 25 cas/100 000, puis augmente de façon linéaire avec l'âge jusqu'à se stabiliser à 500 cas/100 000 à partir de 80 ans. On estime que le risque de développer un cancer du sein après 65 ans est 5,8 fois plus fort qu'avant 65 ans, et 150 fois plus fort qu'avant 30 ans [26]. Ainsi, en 2016, environ 99,3% des morts attribuables au cancer du sein aux Etats-Unis ont touché des femmes de plus de 40 ans, et 71,2% des femmes de plus de 60 ans. C'est pour cette raison que le dépistage par mammographie est généralement conseillé pour les femmes âgées de 40 ans ou plus [74].

iii. Les facteurs de risque liés à la reproduction

Le cancer du sein est très sensible à certains facteurs de risque liés à la reproduction. Une ménarche (premières menstruations) précoce, une ménopause tardive, un âge avancé lors de la première grossesse, et un faible nombre d'enfants sont ainsi connus pour augmenter le risque de cancer du sein. En particulier, chaque délai d'un an dans le déclenchement de la ménarche diminue le risque de cancer du sein de 5%, chaque délai d'un an du déclenchement de la ménopause augmente le risque de cancer du sein de 3%, et chaque naissance supplémentaire diminue le risque de cancer du sein de 10% [74].

Les études épidémiologiques recensant l'effet de ces facteurs de risque sont nombreuses. Dès 1974, Stavraký et al. [90] ont réalisé une étude cas témoins (373 cas, 586 témoins) au Canada qui leur a permis de conclure que le risque de cancer du sein :

- augmentait avec l'âge au moment de la première grossesse des femmes ménopausées (RR = 2,91 en comparant des femmes ayant connu leur première grossesse après 30 ans à des femmes ayant connu leur première grossesse avant 20 ans)
- augmentait avec un âge de ménarche précoce pour les femmes non ménopausées (RR = 0,45 en comparant les femmes étant âgées de plus de 13 ans au moment de la ménarche à celles étant âgées de moins de 12 ans),
- augmentait avec un âge de ménopause tardif pour les femmes ménopausées (RR = 2,57 en comparant des femmes étant devenues ménopausées après 55 ans à celles l'étant devenues avant 40 ans).

Ces mêmes auteurs ont également constaté que plus la durée entre l'âge de ménarche et l'âge au moment de la première grossesse augmentait, plus le risque de cancer du sein augmentait pour les femmes ménopausées comme pour les femmes non ménopausées. En revanche, ils n'ont pas rapporté d'association entre le risque de cancer du sein et le nombre de grossesses. L'étude de cohorte norvégienne de Horn et al. [91], en 2013, portant sur plus de 58 000 femmes âgées de 28 à 73 ans visait à mettre en évidence un lien éventuel entre l'âge à la première grossesse et le risque de cancer du sein. Selon leurs résultats, les femmes âgées d'au moins 35 ans lors de leur première grossesse étaient plus à risque de développer un cancer du sein que les femmes âgées de moins de 20 ans (HR = 1,69 [1,09 – 2,64] pour les femmes âgées de 55 à 69 ans et HR = 1,54 [1,13 – 2,11] pour les femmes âgées de plus de 70 ans). La même étude a montré que les femmes n'ayant jamais eu d'enfants étaient plus à risque de développer un cancer du sein que les autres (HR = 1,34 [1,16 – 1,55] pour les femmes âgées de 55 à 69 ans et HR = 1,31 [1,17 - 1.46] pour les femmes âgées de plus de 70 ans). Plus les femmes ayant accouché au moins une fois au cours de leur vie avaient d'enfants et moins elles étaient à risque (HR = 0,59 [0,42 – 0,83] pour les femmes ayant entre 55 et 69 ans, et HR = 0,68 [0,54 - 0.86], en comparant à chaque fois les femmes ayant eu au moins cinq enfants à celles n'en ayant eu qu'un seul). Toujours dans cette même étude, l'âge au moment de la ménopause était associé significativement au risque de cancer du sein : les femmes étant ménopausées entre 50 et 54 ans étaient plus à risque de développer un cancer du sein que les femmes ménopausées avant l'âge de 45 ans (HR = 1,38 [0,87 – 2,19] pour les

femmes entre 55 et 69 ans, HR = 1,44 [1,10 – 1,90] pour les femmes âgées de plus de 70 ans). Khalis et al. [92] ont obtenu des résultats similaires au cours de leur étude cas-témoins (237 cas et 237 témoins) menée au Maroc entre 2014 et 2015 : les femmes ayant connu une ménarche précoce étaient plus à risque de développer un cancer du sein (OR = 1,60 [1,08 – 2,38] en prenant un âge référent égal à 13 ans), tout comme les femmes n'ayant jamais eu d'enfant (OR = 3,77 [1,98 – 7,30]), mais les femmes ayant subi une première grossesse (ayant atteint son terme) avant 20 ans étaient moins à risque (OR = 0,41 [0,25 – 0,65]).

Sweeney et al. [93] se sont interrogés sur l'effet des facteurs liés à la reproduction sur les femmes les plus âgées. En effet, bien que le taux d'incidence du cancer du sein augmente avec l'âge, il diminue lorsque survient la ménopause [94]. En utilisant les données de la cohorte Iowa Women's Health Study (1986-2001, 36 658 sujets), ils ont mis en évidence qu'un âge élevé lors de la ménopause tendait à augmenter le risque de cancer du sein pour les femmes âgées de plus de 75 ans, tandis qu'un nombre élevé de naissances diminuait leur risque (HR = 0,67 [0,51 – 0,88] en comparant cinq naissances ou plus à une ou deux naissances).

En réalité, les facteurs de risque liés à la reproduction sont intimement associés avec les niveaux d'œstrogènes, et le statut ER du cancer du sein. Ainsi, l'impact de la plupart de ces facteurs sur le risque de cancer du sein change lorsque l'on discrimine les cas de cancer en fonction du statut ER. Ainsi, les femmes ayant eu des enfants sont moins à risque de développer un cancer du sein ER-positif qu'un cancer du sein ER-négatif (OR = 0,7 contre 0,9, en comparant les femmes ayant eu plus de trois enfants à celles n'en ayant jamais eu), et les femmes plus âgées lors de leur première grossesse sont plus exposées à un cancer du sein ER-positif qu'à un cancer du sein ER-négatif (OR = 1,6 contre 1,2 en comparant des femmes âgées de 30 ans ou plus lors de leur première grossesse à des femmes âgées de moins de 25 ans), les femmes ménopausées sont moins à risque que les femmes non ménopausées de développer un cancer du sein ER-positif qu'un cancer du sein ER-négatif (OR = 0,7 contre 0,8), et les femmes âgées lors de la ménopause sont plus à risque de développer un cancer du sein ER-positif qu'un cancer du sein ER-négatif (OR = 1,3 contre 1,2, en prenant un âge référent égal à 50 ans) [74, 95].

iv. Les œstrogènes

Il est connu que des niveaux plasmatiques élevés d'œstrogènes, d'origine à la fois exogènes et endogènes, sont associés au risque de cancer du sein [74]. Les œstrogènes

endogènes sont majoritairement produits par l'ovaire (et en moindres quantités, par la glande surrénale et le placenta) chez les femmes non ménopausées. L'analyse de données de participants à sept études prospectives (767 cas et 1 699 témoins, toutes non ménopausées et d'âge inférieur à 50 ans), menée par l'« Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group » a montré que le risque de cancer du sein était associé à l'augmentation de la concentration en œstradiol circulant (OR = 1,19 [1,06-1,35] pour une concentration multipliée par deux), en œstrone circulant (OR = 1,27 [1,05 – 1,54]), en androstènedione circulant (OR = 1,3 [1,1 – 1,55]), et en testostérone circulante (OR = 1,18 [1,03 – 1,35]) [96]. Il est également rapporté (notamment par Press et al. [97], en 2011) que le fait de subir une ovariectomie réduit le risque de cancer du sein de manière générale (OR = 0,59 [0,50 – 0,69] dans le cas d'une ovariectomie bilatérale, pour les femmes âgées de moins de 45 ans seulement). Dans le détail, ce sont en réalité uniquement les cancers du sein ER-positifs et PR-positifs qui sont concernés par cette diminution du risque (OR = 0,63 [0,52 – 0,75]). L'hystérectomie avec ou sans conservation des ovaires est elle aussi associée à une diminution du risque de cancer du sein, quoique moindre (OR = 0,83 [0,72 – 0,96] pour le premier cas et OR = 0,73 [0,59 – 0,91]). Kreiger et al. rapportaient d'ailleurs déjà des observations similaires en 1999 [98].

Les sources principales d'œstrogènes exogènes sont les contraceptifs oraux et le Traitement Hormonal Substitutif (THS). Les contraceptifs oraux sont très répandus depuis les années 1960. Depuis leur mise sur le marché, les industries pharmaceutiques essaient de réduire leurs effets secondaires. Malgré cela, le risque de cancer du sein associé à la prise de contraceptifs oraux reste élevé. Bien que Stavsky et al. [14], en 1974, n'aient pas rapporté d'association entre la prise de traitement hormonaux et le risque de cancer du sein, depuis, nombreuses furent les études à montrer le contraire. Une méta-analyse de 2016 a compilé vingt-six études (réunissant plus de 46 000 sujets en tout) menées en Iran entre 2000 et 2015 et a estimé que les femmes prenant des contraceptifs oraux étaient plus à risque que les autres de développer un cancer du sein (OR = 1,52 [1,25 – 1,85]) [99]. Une étude cas-témoins de 2015 ayant inclus 1 848 femmes Afro-Américaines a obtenu des résultats similaires [100]. Dans cette étude, menée par Bethea et al., la consommation de contraceptifs oraux a été classée en plusieurs durées, et chacune d'entre elles était significativement associée à une augmentation du risque de cancer du sein, à la fois ER-positifs (OR = 1,15 [1,02 – 1,28]) et ER-négatifs (OR = 1,24 [1,07 – 1,43]). La plus forte association mesurée concernait l'utilisation de contraceptifs oraux pendant les cinq années précédant l'apparition de la

maladie, que ce soit pour les cancers du sein ER-positifs (OR = 1,46 [1,18 - 1,81]), ER-négatifs (OR = 1,57 [1,22 - 1,43]) ou Triple-Négatifs (OR = 1,78 [1,25 - 2,53]). De manière générale, plus il s'écoulait de temps depuis la dernière prise de contraceptif oraux et plus le risque diminuait. En regardant les résultats de plus près, on constate que les OR restaient élevés pour les cancers du sein ER-positifs de 15 à 19 ans après la dernière prise (avec un OR statistiquement significatif pour cette même période, égal à 1,29 [1,04 - 1,58]). Pour les cancers du sein ER-négatifs, la relation était plus complexe, moins linéaire : le risque diminuait avec le temps écoulé depuis la dernière prise, mais redevenait élevé pour une dernière consommation remontant à 25 à 29 ans (OR = 1,41 [1,09 - 1,81]). Par ailleurs, plus les femmes avaient consommé longtemps des contraceptifs oraux et plus elles étaient à risque de développer un cancer du sein ER-négatifs (OR = 1,43 [1,13 - 1,80] pour une prise de pilules pendant 10 à 14 ans et OR = 1,54 [1,15 - 2,06] pour une consommation d'une durée supérieure ou égale à 15 ans) et, à moindre mesure, ER-positifs (OR = 1,35 [1,12 - 1,61] pour une consommation pendant 10 à 14 ans mais OR = 0,98 [0,76 - 1,27] pour une consommation d'une durée supérieure ou égale à 15 ans).

Le THS, quant à lui, consiste à administrer des œstrogènes exogènes ou d'autres hormones à des femmes après la ménopause. Plusieurs études ont montré que ce traitement pouvait augmenter le risque de cancer du sein [74]. C'est le cas notamment de l'étude « The Million Women Study », publiée en 2003 et menée au Royaume-Uni entre 1996 et 2001 sur, comme son nom l'indique, plus d'un million de femmes âgées de 50 à 64 ans [101]. La moitié des participantes de cette cohorte avaient utilisé le traitement THS au cours de leur vie, et les résultats de cette étude ont montré que les femmes qui prenaient ce type de traitement étaient plus à risque de développer un cancer du sein que les autres (RR = 1,66 [1,58 - 1,75]), et d'en mourir (RR = 1,22 [1,00 - 1,48]), mais que les femmes ayant subi ce traitement par le passé mais n'en consommant plus n'étaient pas plus à risque que les autres (RR = 1,01 [0,94 - 1,09]). Toujours dans cette étude, il est apparu que le risque était accru pour les traitements contenant un mélange d'œstrogènes et de progestagènes (RR = 2,00 [1,88 - 2,12]). Une autre étude de cohorte, cette fois menée de façon rétrospective à Taïwan sur 22 929 femmes âgées de moins de 45 ans en 1997, a également montré que les femmes ayant subi un traitement THS étaient plus à risque que les autres de développer un cancer du sein (HR = 1,48 [1,03 - 2,13] après 4 ans de traitement et HR = 1,95 [1,34 - 2,84] après 8 ans de traitement) [102]. Là encore, il s'est avéré que parmi tous les traitements THS possibles, c'était une combinaison d'œstrogènes et de progestagènes qui était la plus nocive (HR = 2,17 [1,41-3,32]), tandis

qu'une consommation d'œstrogènes uniquement n'était pas associée significativement à un accroissement du risque de développer un cancer du sein (HR = 1,37 [0,64 – 2,95]). En revanche, le risque de cancer du sein diminuait de façon significative deux ans après l'arrêt du traitement [74].

En plus des femmes ménopausées, le traitement THS était aussi traditionnellement administré aux survivantes de cancers du sein. Cependant, il s'est avéré que le taux de récurrence du cancer du sein était élevé parmi ces femmes. C'est ainsi que l'essai randomisé HABITS (« Hormone Replacement Therapy After Breast Cancer – Is it Safe? », [103]) a dû être stoppé prématurément en 2003 (avec une durée médiane de suivi égale à 2,1 ans) car les patientes prenant un traitement THS étaient plus à risque de récurrence que les autres (HR = 3,3 [1,5 – 7,4]). Cependant, toutes les études sur ce sujet n'ont pas rapporté ce même genre d'effet : d'après les résultats de l'essai Stockholm (lancé lui aussi en Suède la même année que l'essai HABITS) après 10 ans de suivi ([104]), les survivantes ayant pris le traitement THS n'étaient pas plus à risque de récurrence ou de mortalité, mais elles étaient toutefois plus à risque d'apparition d'une nouvelle tumeur mammaire controlatérale (HR = 3,6 [1,2 – 10,9]). Malgré ces résultats divergents, l'essai Stockholm a lui aussi été arrêté en 2003 par mesure de précaution. Par la suite, les résultats de l'essai HABITS ont parfois été expliqués par une surexposition aux progestagènes de certaines patientes [74]. Ce ne sont cependant pas les seuls essais cliniques à avoir noté des effets indésirables de ce type de traitements. Ceux rapportés par l'essai clinique contrôlé randomisé de Women's Health Initiative ont été publiés en 2003, ce qui a eu de réelles conséquences sur l'avenir [105]. Cet essai devait initialement être mené pendant 8,5 ans sur 16 608 femmes ménopausées âgées de 50 à 79 ans, mais a dû être arrêté après 5 ans car les effets indésirables étaient trop nombreux (HR = 1,29 [1,02 – 1,63] pour les maladies coronariennes, HR = 1,26 [1,00 – 1,59] pour les cancers du sein, HR = 1,41 [1,07 – 1,85] pour les accidents vasculaires cérébraux, et HR = 2,13 [1,39 – 3,25] pour les embolies pulmonaires). Depuis cette publication, l'utilisation du THS a été considérablement réduite, et on impute à cet événement une diminution de l'incidence du cancer du sein aux Etats-Unis d'environ 7% [106]. Les œstrogènes ne se contenteraient pas, par ailleurs, de favoriser le développement des tumeurs, mais ils seraient aussi capables (ou certains de leurs métabolites) de causer des dommages directs à l'ADN et ainsi de participer non seulement au développement du cancer du sein mais aussi à son initiation [107, 108]. Cependant, les œstrogènes possèdent également certaines propriétés anti-cancéreuses qui

permettent notamment de traiter les cancers du sein métastatiques de femmes ménopausées [109].

Enfin, il est important de noter que certains facteurs de risque du cancer du sein sont en fait directement liés aux œstrogènes : une ménarche précoce ou une ménopause tardive participent en effet à augmenter l'exposition du corps aux œstrogènes. Ces deux phénomènes peuvent être liés à la génétique en apparaissant suite à des mutations, mais bien souvent, il est possible d'expliquer l'hyperœstrogénie par le mode de vie, et notamment le mode de vie occidental (peu d'enfants par femme, âge « avancé » lors de la première grossesse, courte période d'allaitement, excès alimentaires, manque d'activité physique). Tout cela est intrinsèquement lié, et finalement, bon nombre de facteurs de risque interagissent les uns avec les autres. Ainsi, l'obésité est corrélée à une augmentation des niveaux d'œstrogènes et à une augmentation du risque de cancer du sein, mais cela n'est vrai que pour les femmes ménopausées. En effet, pour les femmes non ménopausées, le fait d'être en surpoids ou obèse est associé à des cycles menstruels sans ovulation, ce qui au contraire réduit le risque de cancer du sein [26].

v. L'alimentation

Le régime alimentaire occidental moderne, tel qu'on le connaît aujourd'hui, a tendance à être enrichi graisses. Or un excès de graisses, et notamment de graisses saturées, est parfois associé à la mortalité et à un mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du sein [74]. Néanmoins, toutes les études ne s'accordent pas nécessairement pour lier cancer du sein et alimentation. Ainsi Newman et al. [110] ont réalisé une étude cas-témoins au Canada entre 1973 et 1975 et n'ont pas conclu à une association significative entre la consommation de graisse et la mortalité par cancer du sein ($RR = 0,91$, $p = 0,689$). Nomura et al. [111], dans leur étude cas-témoins menée à Hawaï entre 1975 et 1980, en revanche, ont conclu que parmi les femmes caucasiennes, celles qui avaient un apport en graisses plus élevées étaient plus à risque de mortalité par cancer du sein ($RR = 3,2$ [$1,2 - 8,6$]), mais n'ont pas retrouvé ce résultat pour les femmes japonaises ($RR = 0,66$ [$0,25 - 1,76$]). Holmes et al. [112] ont inclus les données de 1 982 infirmières diagnostiquées entre 1976 et 1990 et n'ont pas conclu à une association significative entre l'apport en graisses et la mortalité par cancer du sein. Ils n'ont pas non plus observé d'association entre la consommation de viande rouge et la survie. Ils ont en revanche constaté que les femmes consommant plus de protéines étaient à moins à risque de mortalité par cancer du sein ($RR = 0,65$ [$0,47 - 0,88$]). Une étude de cohorte menée au Japon a conclu à une augmentation non significative, mais néanmoins de 30%, du risque de

développer un cancer du sein entre la plus forte consommation de graisses et la moins élevée [113]. La méta-analyse de Cao et al. [114] a réuni 24 études de cohorte prospectives portant sur le lien entre la consommation de graisses et d'acides gras et le risque de cancer du sein et a conclu à une augmentation du risque de cancer du sein lorsque la consommation totale de graisses augmentait ($RR = 1,10 [1,02 - 1,19]$ en comparant la consommation la plus haute à la consommation la plus faible). En revanche, aucune association ne pouvait être mise en évidence après ajustement sur les autres facteurs de risque du cancer du sein (parmi lesquels, notamment : les antécédents familiaux, l'IMC, la consommation, d'alcool). Aucune association, non plus, n'existait entre le risque de cancer du sein et, prises séparément, la consommation de graisses animales, de graisses végétales, d'acides gras saturés, d'acides gras monoinsaturés, d'acides gras polyinsaturés, d'acides gras polyinsaturés n-3, d'acides gras insaturés n-6, d'acide eicosapentaénoïque, d'acide docosahexaénoïque, d'acide alpha-linoléique, d'acide oléique, d'acide linoléique, ou d'acide arachidonique. En compilant les résultats de sept études de cohorte prospectives menées sur le lien entre le risque de cancer du sein et les concentrations sériques d'acides gras, Cao et al. ont également conclu à une absence d'association entre le cancer du sein et les quantités d'acides gras saturés, d'acides gras monoinsaturés, d'acides gras polyinsaturés, d'acides gras polyinsaturés n-3 et d'acides gras polyinsaturés n-6 présents dans le sérum.

Au-delà de l'effet des graisses saturées, réel ou non, certains aliments sont soupçonnés d'augmenter ou de réduire le risque de cancer du sein. Catsburg et al. [115] ont analysé les données alimentaires provenant d'une sous-cohorte de 3 320 femmes provenant de la cohorte « Canadian Study of Diet, Lifestyle and Health » (CSDLH), et de 49 410 sujets de la cohorte « National Breast Screening Study » (NBSS). De l'analyse des données de la cohorte CSDLH est apparu qu'un régime alimentaire dit « sain » (riche en fruits et en légumes) était associé à un risque plus faible de cancer du sein ($HR = 0,73 [0,58 - 0,91]$), tandis qu'un régime alimentaire riche en viande rouge et en pommes de terre était associé à une augmentation du risque du cancer du sein pour les femmes ménopausées ($HR = 1,26 [0,92 - 1,73]$). Si le premier constat n'a pas été retrouvé dans la cohorte NBSS, le second a été confirmé ($HR = 1,31 [0,98 - 1,76]$). Kim et al. [116], avec leur étude de cohorte menée en Corée entre 2002 et 2007, ont montré que les femmes consommant davantage de viande grillée étaient plus à risque de développer un cancer du sein ($HR = 1,77 [1,09 - 2,85]$ pour toutes les femmes et $HR = 3,06 [1,31 - 7,15]$ pour les femmes ménopausées). Leur étude est même allée jusqu'à montrer qu'au-delà du contenu des assiettes, les habitudes alimentaires, elles aussi, avaient

potentiellement de l'importance et un impact, puisque les femmes prenant leur repas de façon irrégulière voyaient elles aussi augmenter leur risque de développer un cancer du sein (HR = 2,19 [1,20 – 3,98] pour toutes les femmes et HR = 2,35 [1,13 – 4,91] pour les femmes ménopausées). Le régime Méditerranéen, quant à lui, est associé à une réduction de la mortalité et du risque de maladies cardiovasculaires, et beaucoup se sont demandés s'il en allait de même pour le cancer, et notamment pour le cancer du sein. Les données d'une cohorte aux Pays-Bas, ayant inclus 62 573 femmes âgées de 55 à 69 ans (dont 3 986 avec des informations complètes quant à leur régime alimentaire), ont permis de mettre en évidence que les femmes qui adhéraient au régime Méditerranéen étaient moins à risque de développer un cancer du sein ER-négatif (HR = 0,6 [0,39 – 0,93]), mais que cela n'avait pas d'impact significatif sur le risque de cancer du sein ER-positif ou du cancer du sein en général [117]. La consommation de certains acides gras oméga-3 comme l'EPA (acide eicosapentaénoïque) et de DHA (acide docosahexaénoïque) diminuerait à la fois le risque d'apparition de cancer du sein et la mortalité associée, comme l'a montré l'étude de Patterson et al. [118] (HR = 0,74 [0,58 – 0,94] pour le risque de cancer du sein en comparant les femmes avec la plus forte consommation à celles avec la plus faible consommation, et HR = 0,75 [0,55 – 1,04] pour la mortalité par cancer du sein).

Enfin, Farvid et al. [119] se sont eux aussi penchés sur l'influence de l'alimentation dans le développement du cancer du sein, mais en s'intéressant plus particulièrement à la période de l'adolescence et des premières années de l'âge adulte. Ils ont pour cela analysé les données de 90 476 femmes non ménopausées de la cohorte « Nurses' Health Study II » âgées de 27 à 44 ans, ayant toutes répondu à un questionnaire alimentaire en 1991, et 44 223 d'entre elles ayant également rempli en 1998 un questionnaire alimentaire relatif à leur alimentation pendant leur adolescence. Les résultats de leur étude ont montré que les femmes consommant beaucoup de fruits durant leur adolescence étaient moins à risque de développer un cancer du sein (HR = 0,75 [0,62 – 0,90] en comparant une consommation médiane de 2,9 parts/jour à une consommation médiane de 0,5 parts/jour). Ce constat était d'autant plus vrai pour les cancers du sein ER-négatifs et PR-négatifs que pour les cancers du sein ER-positifs et PR-positifs. Dans le détail, les femmes ayant consommé en grande quantité des fruits ou des légumes riches en α -carotène durant les premières années de l'âge adulte étaient également moins à risque de développer un cancer du sein avant la ménopause (HR = 0,82 [0,70 – 0,96] en comparant une consommation médiane de 0,5 parts/jour à une consommation médiane de 0,03 parts/jour). Parmi les fruits et légumes les plus fortement associés à la diminution du

risque de cancer du sein, on retrouvait les pommes, les bananes et le raisin pour la période de l'adolescence, et les oranges et le chou pour la période des premières années de l'âge adulte. Il est également possible de noter que la consommation de jus de fruits à ces périodes n'était pas associée avec le risque de cancer du sein.

vi. La consommation d'alcool

Il est estimé qu'en France, 8% des cancers sont causés par la consommation d'alcool, et que le cancer du sein est le plus impacté par ce facteur de risque, avec près de 8 000 cas imputables à la consommation d'alcool. En réalité, le lien entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein a été étudié à de nombreuses reprises, mais les résultats des différentes études ayant tendance à diverger, il est difficile de conclure de façon définitive. Ce que l'on sait, c'est que la consommation d'alcool peut augmenter les niveaux d'hormones liées aux œstrogènes dans le sang, et ainsi stimuler les voies du récepteur aux œstrogènes. [13]

Une méta-analyse de 53 études épidémiologiques (incluant en tout plus de 160 000 sujets) publiée en 2002 a montré un lien entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein. En particulier, la consommation de 35 à 44 grammes d'alcool par jour augmentait le risque de cancer du sein de 32% ($RR = 1,32$ [$1,19 - 1,45$]), et une consommation de 45 grammes d'alcool ou plus par jour l'augmentait de 46% [$1,33 - 1,61$]. Le risque relatif augmentait de 7,1% ($[5,5 - 8,7]$) pour chaque quantité de 10 grammes d'alcool par jour supplémentaire. Ces résultats suggèrent qu'environ 4% des cancers du sein des pays développés sont attribuables à la consommation d'alcool, la consommation d'alcool moyenne dans ces pays étant de 6 grammes par jour. Dans les pays en développement, en revanche, la consommation moyenne d'alcool n'étant égale qu'à 0,4 grammes par jour, l'impact de la consommation d'alcool sur l'incidence des cancers du sein est négligeable, voire inexistante [120].

Il semblerait que les femmes consommant un verre d'alcool par jour maximum (soit environ 12g d'alcool) ne soient pas plus à risque de développer un cancer du sein, et que l'alcool devienne un facteur de risque uniquement si consommé à des doses élevées. Harvey et al. [121] ont ainsi montré avec leur étude cas-témoins que le fait d'avoir ou non consommé de l'alcool dans sa vie n'influait pas le risque de cancer du sein ($OR = 1,1$ [$1,0 - 1,3$]), mais ils ont constaté une augmentation du risque significative lorsque la consommation

d'alcool hebdomadaire augmentait. Consommer un verre d'alcool par jour ou moins n'exposait pas, selon leur étude, à un risque plus élevé que le fait de ne pas boire du tout, mais consommer entre un et deux verres par jour ou plus de deux verres augmentait le risque ($OR=1,3$ [$1,0 - 1,7$] et $OR = 1,7$ [$1,2 - 2,4$], respectivement). Willet et al. [122] ont quant à eux rapporté qu'une consommation considérée comme faible d'alcool (5 à 14g d'alcool par jour, soit trois à neuf verres par semaine) augmentait le risque de cancer du sein ($OR = 1,3$ [$1,1 - 1,7$]), et qu'une consommation de 15g ou plus par jour l'augmentait encore plus ($RR = 1,6$ [$1,3 - 2,0$]). Chen et al. [123] ont travaillé avec les données de l'étude « Nurses' Health Study » qui a inclus 105 986 femmes entre 1980 et 2008 et ont constaté que la consommation d'alcool entraînait une augmentation du risque, et ce même pour des catégories considérées comme faibles (5 à 9,9g par jour, soit trois à six verres par semaine ; $RR = 1,15$ [$1,06 - 1,24$]), qu'après ajustement sur la quantité cumulée d'alcool consommé, le fait de boire de façon compulsive était associé au risque mais pas la fréquence de consommation, et que la consommation d'alcool était associée au risque que cette dernière ait lieu tôt ou tard dans la vie d'adulte. L'étude WECARE, publiée en 2017 [54], a également rapporté une association entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein ($RR = 1,19$ [$1,01 - 1,41$] lorsque l'on compare des personnes consommant de l'alcool à des personnes n'en ayant jamais consommé). Männistö et al. [124], par contre, ont réalisé une étude cas-témoins en Finlande et n'ont retrouvé aucune association significative entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein, indépendamment de la quantité, chez les femmes ménopausées comme chez les femmes non ménopausées. Zhang et al. [125] ont utilisé les données de l'étude Framingham et en divisant la consommation d'alcool en quatre catégories, ont montré que le risque de cancer du sein n'augmentait pas avec la consommation d'alcool.

Il se pourrait que les différences de résultats entre les études s'expliquent en partie par l'existence de facteurs de confusion, parmi lesquels pourraient se retrouver une interaction entre la consommation d'alcool et les antécédents familiaux [70]. Vachon et al. [126], par exemple, ont remarqué que l'impact de la consommation d'alcool sur le risque de cancer du sein était plus accentué pour les individus dont un membre de la famille au premier degré avait été touché par la maladie ($RR = 2,45$ [$1,20, 5,02$], contre $RR = 1,27$ [$0,73 - 2,22$] pour ceux dont un membre de la famille au deuxième degré était touché, et $RR = 0,99$ [$0,42 - 1,90$] pour les femmes étant uniquement lié par alliance à ces familles). Ursin et al. [127], en revanche, n'ont pas confirmé ce résultat. Il est également possible qu'il existe une interaction entre la consommation d'alcool et l'IMC : Royo-Bordonada et al. [128] n'ont pas constaté

d'association significative entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein, mais ont remarqué que le risque augmentait pour les individus dont l'IMC était inférieur à la valeur médiane. En effet, la consommation excessive d'alcool est associée à des déficiences nutritionnelles importantes [129].

vii. La consommation de tabac

L'association entre le fait de fumer et le risque de cancer du sein demeure controversée. Ces dernières années, les études semblent converger vers l'idée d'une association positive, mais modeste, particulièrement vraie pour les femmes ayant fumé longtemps. La cohorte NBSS (« Canadian National Breast Screening Study », [130]) a suivi 89 835 femmes âgées de 40 à 59 ans pendant 22 ans en moyenne. Les résultats issus de cette étude ont révélé qu'il existait une association entre le risque de cancer du sein et la durée de consommation de tabac (HR = 1,57 [1,29 – 1,92] en comparant des femmes ayant fumé 40 ans à des femmes n'ayant jamais fumé), l'intensité de la consommation (HR = 1,21 [1,04 – 1,40] en comparant des femmes fumant 40 cigarettes par jour à des non-fumeuses), et le temps de latence (HR = 1,19 [1,10 – 1,53] en comparant des femmes ayant commencé à fumer depuis 40 ans à des femmes n'ayant jamais fumé). Selon cette étude, fumer avant la première grossesse augmentait davantage le risque de cancer du sein que fumer après (HR = 1,18 [1,10 – 1,26] en comparant les femmes ayant fumé pendant cinq ans avant la première grossesse à celles n'ayant pas fumé avant leur grossesse). L'analyse regroupée de 14 études de cohorte (934 681 sujets au total) menée par Gaudet et al. [131] en 2017 a confirmé l'association entre la consommation de tabac avant la première grossesse et le risque de cancer du sein (HR = 1,18 [1,12 – 1,24] en comparant des femmes ayant fumé plus de dix ans avant leur première grossesse et des femmes n'ayant jamais fumé), mais ce constat s'est pour eux limité aux cancers ER-positifs. Les résultats de la méta-analyse du « Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer » ([120]) n'ont pas montré d'association (HR = 1,03 [0,98 – 1,07] pour les personnes ayant déjà fumé dans leur vie, et HR = 0,99 [0,92 – 1,05] pour les fumeurs actuels). L'étude « WECARE » de 2017 [132], a quant à elle rapporté une association entre la consommation de tabac et le risque de cancer du sein (RR = 1,25 [1,03 – 1,51] lorsque l'on compare des fumeurs actuels à des personnes n'ayant jamais fumé, avec augmentation du risque avec la durée d'exposition au facteur de risque). Mais cette étude a surtout mis en évidence que le risque était accru pour les femmes qui cumulaient

consommation d'alcool et consommation de tabac au moment de leur premier diagnostic (RR = 1,62 [1,24 – 2,11]).

Bien que l'association entre le fait de fumer et le risque de cancer du sein demeure controversée, des agents mutagènes provenant de la fumée de cigarette (nicotine, cotinine) ont été détectés dans le liquide mammaire de femmes n'allaitant pas [133 , 134].

viii. Le surpoids et l'obésité

L'importance de ce facteur de risque est aussi mal comprise. Stavrakys et al. [90], en 1974, n'ont pas rapporté d'association entre l'obésité et le risque de cancer du sein. Newman et al. [110] ont montré qu'il existait un risque accru de mortalité par cancer du sein pour les femmes plus lourdes que la moyenne (HR = 1,68, p = 0,026). Nomura et al. [111], quant à eux, ont montré que les femmes Japonaises obèses étaient plus à risque de mortalité par cancer du sein (RR = 3,53 [1,25 – 10,00], mais n'ont pas retrouvé ce résultat pour les femmes Caucasiennes (RR = 1,15 [0,51 – 2,62]). Tretli [135] a utilisé les données de 570 000 Norvégiennes collectées entre 1963 et 1975 pour étudier l'impact de la taille et du poids sur l'incidence du cancer du sein et la mortalité par cancer du sein. Ils ont ainsi montré que l'IMC (et donc, par extension, le surpoids et l'obésité) était associé, mais pour les femmes ménopausées seulement, à une augmentation significative du risque d'incidence du cancer du sein à partir d'âges supérieurs ou égaux à 55 ans, et à une augmentation significative du risque de mortalité pour des âges compris entre 45 et 49 ans, puis supérieurs à 55 ans. Inoue et al. [136] ont étudié l'impact de certains éléments du syndrome métabolique sur l'incidence de plusieurs types de cancers avec une étude de cohorte ayant inclus 9 548 hommes et 18 716 femmes au Japon. Pour rappel, le syndrome métabolique, aussi connu sous le nom de « syndrome de résistance à l'insuline », se caractérise par un ensemble de symptômes parmi lesquels l'intolérance au glucose, l'augmentation de la masse grasseuse au niveau intra-abdominal, l'hypertension, la dysfibrinolyse, et une dyslipidémie s'exprimant notamment par l'augmentation de la quantité de triglycérides, la diminution des niveaux de HDL-cholestérol, et la présence de petites particules denses de LDL [137]. Les résultats de Inoue et al. ont mis en évidence que les femmes obèses étaient plus à risque de développer un cancer du sein (HR = 1,75 [1,21 – 2,55]) [136].

Le rôle du surpoids et de l'obésité dans le développement du cancer du sein pourrait être dû aux œstrogènes que l'on retrouve en grande quantité dans le tissu adipeux, ou bien au

fait qu'un IMC élevé soit associé à des niveaux d'insuline (et d'insulin-like growth factors) élevés [70]. Le fait que l'influence du surpoids soit plus marquée pour les femmes ménopausées peut s'expliquer par cette dernière théorie, car un phénomène de prise de poids au niveau abdominal accompagne la ménopause, et il est connu que l'obésité abdominale favorise l'augmentation des niveaux d'insuline. L'obésité est également associée, mais cette fois de façon négative, aux niveaux d'adiponectine, qui pourrait également expliquer l'augmentation du risque de cancer du sein [138].

ix. L'insuline

L'insuline a souvent été associée au risque de cancer du sein car liée à l'obésité (qui entraîne une hausse des niveaux d'insuline et une baisse des niveaux d'adiponectine), mais certaines études tendent à montrer qu'elle peut être un facteur de risque du cancer du sein indépendamment du phénomène d'obésité [139]. Ish-Shalom et al. en 1997 [140] et Chapelle et al. en 2001 [141] ont ainsi montré que l'insuline stimulait la prolifération à la fois des cellules mammaires normales et des cellules mammaires cancéreuses, et Shafie et al. en 1981 [142 , 143] ont rapporté qu'elle pouvait aussi stimuler la croissance tumorale *in vivo* dans des modèles de souris. L'étude de Gunter et al. [144], quant à elle, a permis de mettre en évidence que dans une population de femmes obèses ménopausées, une hyperinsulinémie était associée avec une augmentation du risque de cancer du sein (HR = 1,46 [1,00 – 2,13]).

x. L'adiponectine

Tout d'abord, il est important de noter que les niveaux d'adiponectine circulante sont corrélés négativement avec l'IMC [145]. Ensuite, Miyoshi et al. [146] ont rapporté que les femmes avec de plus faibles niveaux d'adiponectine dans le sérum étaient plus à risque de développer un cancer du sein (OR = 3,63 [1,61 – 8,19]), de façon non significative pour les femmes non ménopausées (OR = 3,46 [0,89 – 13,50]), mais significative pour les femmes ménopausées (OR = 3,90 [1,23 – 12,44]). Ces mêmes auteurs ont également constaté que des tumeurs de grande taille étaient plus fréquemment retrouvées chez les femmes avec les plus faibles niveaux d'adiponectine, et que ces dernières étaient souvent atteintes de tumeurs à des stades histologiques plus avancés. De plus, l'adiponectine aurait des effets pleiotropiques, parmi lesquels des effets anti-inflammatoires, anti-prolifératifs et pro-apoptotiques [147] [148].

xi. L'activité physique

L'activité physique serait un facteur protecteur du cancer du sein. C'est vers cette théorie que convergent notamment les résultats de Thune et al. [149], qui ont utilisé les données d'une cohorte de 25 624 femmes parmi lesquelles ils ont identifié 351 cas de cancers invasifs. Selon leur étude, une plus grande activité physique était associée à une diminution du risque de cancer du sein, après notamment un ajustement sur l'âge, l'IMC, la taille, et le nombre d'enfants (RR = 0,63 [0,42 - 0,95] en comparant des femmes avec une activité physique régulière à des femmes sédentaires). Cette réduction du risque était plus visible pour les femmes non ménopausées que pour les femmes ménopausées, et plus visible pour les femmes jeunes (moins de 45 ans) que pour les femmes plus âgées (plus de 45 ans). Ces mêmes auteurs ont également constaté que la réduction du risque de cancer du sein pouvait également être associée à une plus grande activité au travail, là encore davantage pour les femmes non ménopausées que pour les femmes ménopausées (RR = 0,46 [0,25 - 0,86] en comparant des femmes exerçant une profession manuelle physiquement difficile à des femmes sédentaires au travail, tout statut ménopausal confondu). Holmes et al. [150] se sont quant à eux intéressés à la mortalité par cancer du sein, et ont trouvé que plus les malades font preuve d'une activité physique, et moins elles sont à risque de décéder (RR = 0,80 [0,60 - 1,06] en comparant des femmes ayant une activité physique de 3 à 8,9 « Metabolic Equivalent Task-heures » (MET-heures) par semaine à celles ayant une activité physique de moins de 3 MET-heures, en sachant que 3 MET-heures équivalent environ à une heure de marche à une allure modérée ; RR = 0,50 [0,31 - 0,82] pour les femmes ayant une activité physique de 9 à 14,9 MET-heures, RR = 0,56 [0,38 - 0,84] pour celles ayant une activité physique de 15 à 23,9 MET-heures, et RR = 0,60 [0,40 - 0,89] pour celles ayant une activité physique de 24 MET-heures ou plus). A titre d'exemple, cela représente une réduction du risque de mortalité à 10 ans (absolue et sans ajustement) de 6% pour les femmes avec une activité supérieure ou égale à 9 MET-heures par semaine (soit trois heures de marche à une allure modérée). Il faut noter que la diminution du risque de mortalité associée à l'activité physique rapportée par Holmes et al. était plus visible pour les femmes atteintes de cancers hormono-dépendants que pour les autres. Pour confirmer cet effet de l'activité physique, Lynch et al. [151] ont effectué une méta-analyse de 73 études à ce sujet, et ont ainsi calculé que les femmes physiquement actives voyaient leur risque de cancer du sein diminuer de 25%. Eux, en revanche, ont constaté que cet effet était plus marqué pour les femmes ménopausées, et plus marqué, également, pour les femmes de corpulence normale, sans antécédent familial de cancer du

sein, et ayant accouché. Les associations les plus fortes ont été constatées pour : une activité physique exercée pendant son temps libre, une activité physique maintenue tout au long de sa vie, une activité physique exercée après la ménopause, et une activité physique régulière et d'intensité soutenue.

xii. L'allaitement

L'allaitement pourrait réduire le risque de cancer du sein, surtout s'il se prolonge pendant 1,5 à 2 ans. Cet effet bénéfique pourrait s'expliquer par le fait que l'allaitement réduise le nombre total de cycles menstruels de la femme au cours de sa vie [22]. Sikind et al. [152] ont réalisé une étude cas-témoins en Australie et ont constaté une tendance à la diminution du risque, mais non significative. Brinton et al. [153], avec le même type d'étude, mais cette fois-ci aux Etats-Unis, ont confirmé ce résultat, toujours de façon assez légère ($RR = 0,87 [0,7 - 1,0]$). Ces mêmes auteurs rapportent également que la diminution du risque était plus importante pour les femmes ayant allaité le plus longtemps (mais non significative) et pour les femmes ayant allaité avant 22 ans ($RR = 0,68 [0,5 - 0,9]$), mais qu'elle n'était pas impactée par le nombre d'enfants allaités. Chang-Claude et al. [154], toujours avec une étude cas-témoins, mais en Allemagne, ont obtenu des résultats similaires : le fait d'avoir allaité un enfant pendant au moins un mois n'était pas associé significativement à une diminution du risque de cancer du sein, mais ce risque chutait lorsque la durée d'allaitement augmentait (jusqu'à atteindre $RR = 0,5 [0,3 - 1,1]$ pour une durée d'au moins 25 mois). Comme Brinton et al., Chang-Claude et al. ont constaté que le nombre d'enfants allaités importait moins que la durée d'allaitement. Tryggvadóttir et al. [155], en Islande, ont quant à eux étudié les données de 993 cas et 9 729 témoins et ont trouvé qu'il existait une association inverse entre la durée d'allaitement et le cancer du sein pour les femmes âgées de moins de 40 ans au moment du diagnostic ($OR = 0,77 [0,59 - 1,00]$), et que le simple fait d'avoir allaité diminuait le risque pour toutes les femmes ($OR = 0,33 [0,19 - 0,56]$).

En plus de son rôle dans la réduction du nombre total de cycles menstruels, des études ont suggéré que l'allaitement permettrait de maintenir la différenciation des cellules de la glande mammaire et donc de limiter les possibilités qu'elles se transforment en cellule cancéreuse [156].

xiii. Fausses idées reçues : les non-facteurs de risque du cancer du sein

Enfin, certains éléments ont été ou pourraient être soupçonnés d'être des facteurs de risque du cancer du sein, mais ils ne le sont pas. Ainsi, contrairement au cancer du poumon et de la vessie, le cancer du sein serait moins sensible aux agents cancérigènes de l'environnement [26]. Cependant, des études récentes ont tout de même montré qu'une exposition à certains agents chimiques et à certains polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques, dichlorodiphényltrichloroéthane, perfluorooctanesulfonamide, dioxines, amines aromatiques, oxyde d'éthylène, solvants, colorants, encres, essence, pollution de l'air) pendant la phase de développement mammaire, pendant l'enfance, au cours d'une grossesse, ou dans le cadre de son travail, pouvait augmenter le risque de cancer du sein [157, 158, 159], et que les polluants organiques persistants pouvaient augmenter le risque de métastases de cancers du sein [160].

Le stress physiologique ne serait pas associé au risque de cancer du sein [70, 161, 162]. Le lien entre les traumatismes du sein et la survenue de cancer, quant à lui, n'a été que trop peu étudié pour conclure quant à ce facteur de risque [26].

Facteurs de risque	« Promoteurs »	« Protecteurs »
Généraux	• Sexe (femme) • Age • Antécédents Familiaux	• Sexe (homme)
Génétiques	• Mutations des gènes : <i>BRCA1/BRCA2</i> <i>TP53</i> <i>PI3KCA</i> <i>ATM</i> <i>CHEK2</i> <i>PTEN</i> <i>CDH1</i> <i>STK11</i> <i>PALB2</i>	
Liés à la reproduction	• Première grossesse tardive • Ménarche précoce • Ménopause tardive • Niveaux élevés d'oestrogènes (contraceptifs oraux, Traitement Hormonal Substitutif)	• Allaitement
Alimentation	• Apport en graisses élevé • Haute consommation de viande rouge	• Régime « sain » riche en fruits et en légumes • Apport en protéines élevé • Consommation d'EPA et de DHA
Habitudes de vie	• Consommation d'alcool • Tabac • Interaction alcool x tabac • Surpoids/obésité	• Activité physique
Biologie	• Niveaux d'insuline élevés	• Niveaux d'adiponectine élevés

Tableau 1 : Facteurs de risque du cancer du sein. Sont listés ici les facteurs qui peuvent soit contribuer à augmenter le risque de développement d'un cancer du sein ou le risque de mortalité par cancer du sein (« promoteurs »), soit au contraire réduire ce risque (« protecteurs »).

4) Le cholestérol est-il un facteur de risque du cancer du sein ?

Si le lien entre dérèglement du métabolisme lipidique et risque de maladies cardiovasculaires est connu et bien établi, ce n'est pas encore le cas pour le cancer du sein. Depuis les années 1980 ont été menées des recherches à ce sujet, notamment pour étudier l'association entre le risque de cancer du sein et les niveaux de cholestérol total, ou plus

spécifiquement les niveaux de HDL-cholestérol ou de LDL-cholestérol, voire même d'apolipoprotéine A-I (apoA-I) ou d'apolipoprotéine B (apoB). Cela est d'autant plus important que les niveaux sanguins de cholestérol associé aux lipoprotéines sont d'ores et déjà régulièrement mesurés en pratique clinique de routine (bien qu'ils soient moins faciles à mesurer que l'on ne pourrait le croire, [163]). S'ils s'avéraient être de vrais marqueurs du risque de cancer du sein, leur utilisation pourrait donc être immédiate et efficace [164].

Nous traiterons ici de cette question qui est au cœur de la genèse même de ce projet, en évoquant successivement les apports des études épidémiologiques, des études *in vivo* et des études *in vitro* à ce sujet.

a. Les réponses des études épidémiologiques

Menées à travers le monde sur de larges cohortes, les études épidémiologiques constituent, conceptuellement, l'une des mines d'informations les plus riches et les plus fiables. Toutes ne s'accordent pas quant au potentiel effet du cholestérol sur le risque d'incidence du cancer du sein. Sans en faire un résumé exhaustif, nous évoquerons ici certaines d'entre elles. Il existe différentes hypothèses sous-jacentes à l'idée que le cholestérol serait important pour l'initiation ou le développement du cancer du sein, voire du cancer en général. L'une d'entre elles repose sur le constat que le cholestérol étant un élément majeur de la composition des membranes plasmiques, il pourrait en tant que tel être nécessaire aux cellules cancéreuses qui, se multipliant plus que de raison, nécessitent par conséquent davantage de cholestérol pour synthétiser les nouvelles membranes plasmiques.

Il apparaît pourtant que le cholestérol n'affecte pas de la même manière tous les types de cancer. Ainsi, Kitahara et al. [165] ont étudié de façon prospective les données de 1 189 719 Coréens (hommes et femmes) et ont rapporté que des niveaux élevés en cholestérol total sanguin (supérieurs à 160 mg/dL) étaient associés de façon positive au risque de cancer de la prostate (HR = 1,24 [1,07 – 1,44]) et de cancer du côlon (HR, 1,12 [1,00 – 1,25]) pour les hommes, et au risque de cancer du sein (HR = 1,17 [1,03 – 1,33]) pour les femmes, mais étaient en revanche associés à une diminution du risque de cancer du foie (HR = 0,42 [0,38 – 0,45] pour les hommes et HR = 0,32 [0,27 – 0,39] pour les femmes), du cancer de l'estomac (HR = 0,87 [0,82 – 0,93] pour les hommes et HR = 0,86 [0,77 – 0,97] pour les femmes), et de cancer des poumons pour les hommes (HR = 0,89 [0,82 – 0,96]). Knekt et al. [166] ont étudié

le lien entre les niveaux de cholestérol sérique et le risque de différents types de cancer dans une cohorte de 39 268 sujets (hommes et femmes) âgés de 15 à 99 ans. Les niveaux de cholestérol étaient associés négativement avec le risque de cancer (tous cancers confondus) pour les hommes non-fumeurs en particulier, mais aussi pour les femmes. Toutefois, les conclusions de l'étude différaient en fonction du type de cancer. Ainsi, les hommes avec des niveaux de cholestérol plus élevés étaient moins à risque de développer un cancer de la prostate, un lymphome ou une leucémie, mais plus à risque de développer un cancer colorectal, et les femmes avec des niveaux de cholestérol plus élevés étaient moins à risque de développer un cancer colorectal. Osaki et al. [167] se sont penchés rétrospectivement sur l'association entre l'incidence du cancer du foie ou du sein et le syndrome métabolique, cette fois au Japon, ce qui constitue une façon indirecte de mesurer l'impact du cholestérol (mais pas seulement). Leur étude a ainsi inclus 23 715 sujets (hommes et femmes), suivis pendant 9,1 ans en moyenne et a mis en évidence un lien significatif entre le syndrome métabolique et le risque de cancer du foie (HR = 1,89 [1,11 – 3,22] pour les hommes et HR = 3,67 [1,78 – 7,57] pour les femmes), et avec le risque de cancer du sein pour les femmes (HR = 2,87 [1,67 – 4,94]). Cette dernière association augmentait considérablement lorsque seules étaient prises en compte les femmes ménopausées âgées de 55 ans ou plus (HR = 6,73 [2,93 – 15,43]). Le « Metabolic syndrome and Cancer Project » (Me-Can), qui comme son nom l'indique s'intéresse exclusivement au syndrome métabolique, réunit sept cohortes de Norvège, Suède et Autriche, regroupant ainsi 289 273 hommes et 288 057 femmes suivis pendant 11,7 ans en moyenne [168]. L'analyse des données de ces cohortes montre que des niveaux élevés en cholestérol total sont associés à une diminution du risque de cancer en général pour les hommes (HR = 0,94 [0,88 – 1,00] en comparant le cinquième quantile au premier quantile), et plus spécifiquement au risque de cancer du foie (HR = 0,14 [0,07 – 0,29]), de cancer du pancréas (HR=0,52 [0,33 – 0,81]), au cancer de la peau hors mélanomes (HR = 0,67 [0,46 – 0,95]), et de cancers lymphatiques (HR = 0,68 [0,54 – 0,87]), et pour les femmes à une diminution du risque de cancer en général (HR=0,86 [0,79 – 0,93]) et plus spécifiquement des cancers de la vésicule biliaire (HR=0,23 [0,08 – 0,62]), du mélanome (HR=0,61 [0,42 – 0,88]), des cancers lymphatiques (HR=0,61 [0,44 – 0,83]), et du cancer du sein (HR=0,70 [0,61 – 0,81]). L'étude cas-témoins nichée de Agnoli et al. [169] visait elle aussi à mesurer l'impact du syndrome métabolique (mais ici à la fois dans son ensemble et en considérant séparément chacun de ses éléments) sur l'incidence du cancer du sein post-ménopause. Selon leurs résultats, le fait d'être atteint du syndrome métabolique (c'est-à-dire d'être concerné par au moins trois éléments de sa définition) augmentait le risque de développer un cancer du sein

(RR = 1,58 [1,07 – 2,33]), augmentation qui devenait d'autant plus conséquente à chaque ajout d'un nouvel élément du syndrome métabolique. Pris séparément, seuls des niveaux faibles en HDL-cholestérol sériques et des niveaux élevés en triglycérides sériques étaient selon cette étude associés significativement et positivement au risque de cancer du sein (RR = 1,60 [1,10 – 2,33] pour des niveaux en HDL-cholestérol sériques $\leq$ 55 mg/dL, et RR = 1,59 [1,10 – 2,29] pour des niveaux en triglycérides sériques $>$ 126 mg/dL).

Certaines études tendent à montrer que le cholestérol est plutôt associé à une diminution du risque de cancer du sein. Ainsi, l'étude de cohorte de Tulinius et al. [170] a inclus 11 580 Islandaises et 11 366 Islandais et a montré que les niveaux de cholestérol dans le sérum étaient associés négativement au cancer du sein (et au cancer en général, tous sites confondus) pour les femmes. Llanos et al. [171] ont inclus 97 cas et 102 témoins, toutes des femmes Afro-Américaines, dans leur étude et ont mis en évidence que des niveaux élevés en cholestérol total et en LDL-cholestérol diminuait le risque de cancer du sein (OR = 0,46 [0,25 – 0,85] pour le cholestérol total et OR = 0,41 [0,21 – 0,81] pour le LDL-cholestérol), tandis que des niveaux faibles en HDL-cholestérol augmentait le risque de cancer du sein (OR = 1,99 [1,06 – 3,74]). L'étude prospective de 7 557 sujets de la cohorte française « Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants Study » [172] a permis d'analyser le lien entre le cancer (de façon générale, puis plus spécifiquement le cancer du sein et de la prostate) et les niveaux de triglycérides, de cholestérol total et de glucose. Selon leurs résultats, aucun des éléments étudiés n'étaient significativement liés au risque de cancer de la prostate, mais les niveaux de cholestérol total étaient inversement associés au risque de cancer en général (HR = 0,91 [0,82 – 1,00] pour une augmentation de 1mmol/L) et au risque de cancer du sein en particulier (HR = 0,83 [0,69 – 0,99] pour une augmentation de 1mmol/L). Le constat était le même pour les niveaux de HDL-cholestérol (HR = 0,61 [0,46 – 0,82] pour le risque de cancer en général en considérant une augmentation de 1mmol/L, et HR = 0,48 [0,28 – 0,83] pour le risque de cancer du sein), et pour les niveaux d'apoA-I (HR = 0,56 [0,39 – 0,82] pour le risque de cancer en général en considérant une augmentation de 1g/L, et HR = 0,36 [0,18 – 0,73] pour le risque de cancer du sein). Kim et al. [173] ont mené une étude cas-témoins en Corée entre 2004 et 2005 ayant inclus 690 cas et 1 380 témoins. Les résultats de leur étude ont montré que les femmes non ménopausées ayant de hauts niveaux de HDL-cholestérol étaient moins à risque de développer un cancer du sein (OR = 0,49 [0,33 – 0,72] en comparant des concentrations en HDL-cholestérol supérieures ou égales à 60mg/dl à des concentrations inférieures à 50mg/dl). Cela était d'autant plus vrai pour les femmes non

obèses (OR = 0,34 [0,22 – 0,53]). Par ailleurs, le fait d'avoir à la fois des niveaux en HDL-cholestérol faibles (inférieurs à 50 mg/dL) et des niveaux de triglycérides élevés (supérieurs ou égaux à 150mg/dL) augmentait davantage le risque de cancer du sein ER-négatif et PR-négatif (OR = 2,20 [1,32 – 3,67]). Furberg et al. [174], en analysant les données provenant de deux cohortes (38 823 femmes Norvégiennes en tout), ont eux aussi conclu à une association inverse entre le risque de cancer du sein et les niveaux de HDL-cholestérol (RR = 0,75 [0,58 – 0,97] en comparant le quartile le plus élevé au quartile le plus faible), association qui s'avérait plus forte pour les femmes dont l'IMC était supérieur à 25 (RR = 0,43 [0,28 – 0,67]). Ces mêmes auteurs, un an plus tard, ont utilisé les données de 206 femmes de la cohorte Norvégienne « Energy Balance and Breast Cancer Aspects » (EBBA), âgées de 25 à 35 ans et ont remarqué que les femmes dont l'IMC dépassait 23,6 voyaient leur concentration salivaire en œstradiol augmenter avec la quantité de HDL-cholestérol dans le sérum, et que les femmes avec un IMC supérieur à 23,6 et un ratio LDL-cholestérol/HDL-cholestérol élevé (supérieur à 2,08 qui était le 75^{ème} percentile) avaient des concentrations salivaires en œstradiol plus élevées que les autres. Leurs résultats indiquent que l'IMC est très fortement associé à la concentration d'œstradiol moyenne, que les niveaux de HDL-cholestérol sont inversement associés aux concentrations sériques de leptine, d'insuline, et de déhydroépiandrostérone sulfate, et que la densité mammaire est associée de façon positive à un profil métabolique dit « sain » (IMC faible et concentrations sériques en HDL-cholestérol élevées) et à des concentrations salivaires en progestérone élevées. Pour eux, ces résultats tendent à ériger le HDL-cholestérol en biomarqueur du risque de cancer du sein : des niveaux faibles en HDL-cholestérol seraient associés à un profil hormonal à risque avec notamment des niveaux élevés d'œstrogènes, et cela serait d'autant plus vrai pour les femmes en surpoids ou obèses. Lofterød et al. [175] ont analysé les quantités de triglycérides et de HDL-cholestérol de 434 femmes atteintes de cancer du sein, mesurées avant leur diagnostic : en considérant les cancers du sein dans leur ensemble, aucun lien significatif n'a été retrouvé entre le risque de mortalité et les niveaux de triglycérides, d'HDL-cholestérol ou de cholestérol. Cependant, dans le détail, les femmes atteintes d'un cancer du sein Triple-Négatif avec de hauts niveaux de triglycérides étaient plus à risque de décéder (HR = 2,99 [1,17 – 7,63] en comparant le tertile le plus élevé au plus faible), et celles avec de hauts niveaux de HDL-cholestérol moins à risque de décéder (HR = 0,33 [0,12 – 0,89]). Aucune association significative n'a en revanche été mise en évidence en ce qui concerne les cancers du sein de type luminal A (défini de la façon suivante : ER-positif, PR-positif, HER2-négatif, et Ki-67 < 20%) ou B (ER-positif et/ou PR-positif, HER2-positif, ou HER2-négatif et Ki-67 ≥ 20% ou PR-négatif)

et les niveaux de triglycérides, de cholestérol total, ou de HDL-cholestérol. Enfin, les patientes HER2-positives (ER-négatives, PR-négatives, HER2-positives) ne voyaient pas non plus leur mortalité associée d'une manière ou d'une autre aux niveaux de cholestérol total ou de HDL-cholestérol, mais étaient moins à risque de décès si elles possédaient des niveaux de triglycérides élevés (HR = 0,06 [0,01 – 0,55]). La méta-analyse de Ni et al. [176], elle aussi, nuance un peu l'effet du cholestérol : en regroupant les résultats de 15 études de cohorte prospectives (1 189 635 participants en tout) portant sur l'association entre le risque de cancer du sein et les niveaux de cholestérol et de triglycérides, ils n'ont pas mis en évidence d'association significative, si ce n'est en ce qui concernait les femmes ménopausées, pour lesquelles des concentrations élevées en HDL-cholestérol étaient associées à une diminution du risque de cancer du sein (RR = 0,77 [0,64 – 0,93]). Borgquist et al. [177] ont utilisé les données de la cohorte suédoise « Malmö Diet and Cancer Study », qui a inclus 17 035 femmes et 11 063 hommes entre 1991 et 1996, et qui a notamment mesuré les niveaux initiaux de apoA-I et de apoB pour toute la cohorte et les niveaux de HDL-cholestérol et LDL-cholestérol pour 5 281 des participants. Leurs résultats n'ont mis en évidence aucune association entre ces biomarqueurs et le risque global de cancer sur l'ensemble des données de la cohorte. En revanche, l'apoB était pour les hommes associée de façon positive au risque de cancer (HR = 1,06 [1,01 – 1,10]), pour les femmes inversement associée au risque de cancer du sein (HR = 0,92 [0,86 – 0,99]), et pour les femmes comme pour les hommes associée à une augmentation du risque de cancer colorectal (HR = 1,08 [1,01 – 1,16]). L'apoA-I quant à elle, qui est la principale protéine constituant les HDL, était associée inversement au risque de cancer du poumon à la fois pour les femmes et pour les hommes (HR = 0,88 [0,80 – 0,97]). Les niveaux d'HDL-cholestérol étaient inversement associés au risque global de cancer (HR = 0,89 [0,84 – 0,94]), et les niveaux de LDL-cholestérol n'étaient pas significativement associés au risque global. Aucune association significative n'a été mise en évidence entre les niveaux de HDL-cholestérol ou de LDL-cholestérol et le cancer du sein. Enfin, l'étude cas-témoins de Lu et al. [178], nichée dans la cohorte « European Investigation into Cancer and Nutrition » (EPIC), a inclus 530 cas et 1036 témoins (jusqu'à deux par cas) et a permis d'analyser le lien entre les concentrations sériques, non pas de cholestérol, mais de l'un de ses métabolites, le 27-hydroxycholestérol (27HC), et le risque de cancer du sein. Selon leurs résultats, les niveaux de 27HC n'étaient pas globalement associés au risque de cancer du sein (RR = 0,9 [0,66 – 1,22] en comparant le quatrième quartile au premier), mais les femmes ménopausées avec de hauts niveaux de 27HC étaient moins à risque de cancer du sein (RR =

0,56 [0,36 – 0,87], tandis qu'il n'existait pas de différence significative en ce qui concernait les femmes non ménopausées (RR = 1,33 [0,75 – 2,38]).

D'autres études indiquent au contraire que des niveaux élevés en cholestérol (ou plus précisément, en HDL-cholestérol) sont associés à une augmentation du risque. Martin et al. [179], par exemple, ont réalisé en 2015 une étude cas-témoins nichée dans un essai clinique incluant 4 690 femmes suivies pendant 10 ans en moyenne, en choisissant parmi elles 279 cas et 558 témoins. Leurs résultats indiquent que les niveaux d'HDL-cholestérol sont associés positivement au risque de cancer du sein (HR = 1,23, $p=0,05$ en comparant le 75^{ème} percentile au 25^{ème}), et qu'il en va de même pour les niveaux d'apoA-I (HR = 1,28, $p=0,02$). Les niveaux de cholestérol non HDL, en revanche, étaient associés négativement au risque de cancer du sein (HR = 0,81, $p=0,03$), et il en allait de même pour les niveaux d'apoB (HR = 0,78, $p=0,01$). Katzke et al. [180] ont utilisé une sous-cohorte de la cohorte EPIC-Heidelberg et ont trouvé que les femmes avec de hauts niveaux de apoB circulante et de triglycérides étaient moins à risque de développer un cancer du sein (HR = 0,71 [0,52 – 0,98] et HR = 0,65 [0,46 – 0,92], respectivement, en comparant le quartile le plus élevé au quartile le plus faible), tandis que les femmes avec de hauts niveaux de HDL-cholestérol étaient plus à risque (HR = 1,39 [1,01 – 1,93]). Ces mêmes auteurs ont également rapporté que les hommes avec de hauts niveaux de lipoprotéines avaient plus de chance de développer un cancer de la prostate (HR = 1,43 [1,02 – 2,03]), et les individus avec de hauts niveaux d'apoA-I moins de chances de développer un cancer des poumons (HR = 0,52 [0,30 – 0,91]). Par ailleurs, des niveaux élevés de triglycérides, d'HDL-cholestérol, d'apoA-I et de lipoprotéines étaient associés à une baisse de la mortalité par cancer (tous cancers confondus, HR = 0,71 [0,54 – 0,94], HR = 0,67 [0,50 – 0,91], HR = 0,71 [0,54 – 0,93], et HR = 0,74 [0,57 – 0,98], respectivement). L'étude de cohorte de Kim et al. [116], en Corée, a révélé qu'un apport élevé en cholestérol via l'alimentation augmentait le risque de cancer du sein pour toutes les femmes (HR = 1,69 [1,01 – 2,82]). Hu et al. [181] ont également étudié l'influence d'une alimentation riche en cholestérol. Ils ont pour cela récolté des données via des questionnaires alimentaires à propos de 24 771 individus (hommes et femmes) entre 1994 et 1997 au Canada. Parmi ces individus se trouvaient 19 732 cas (différents types de cancers) et 5039 témoins, et les questionnaires visaient à retranscrire les habitudes alimentaires des participants pendant les deux années précédant l'étude. Les résultats issus de cette analyse ont montré qu'une alimentation riche en cholestérol augmentait le risque de cancer de l'estomac, du côlon, du rectum, du pancréas, des poumons, des reins, de la vessie, des lymphomes non Hodgkiniens, et du cancer du sein (HR

= 1,45 [1,14 – 1,85]). En détaillant selon le statut ménopausique, il est apparu que seules les femmes ménopausées étaient plus à risque de développer un cancer du sein (HR = 1,48 [1,07 – 2,07], contre HR = 1,10 [0,75 – 1,62] pour les femmes non ménopausées). En revanche, une haute teneur en cholestérol dans l'alimentation diminuait le risque de cancer de la prostate, et aucune association n'a été mise en évidence entre la consommation de cholestérol et les cancers de l'ovaire, des testicules, du cerveau, et les leucémies. Le LDL-cholestérol, en particulier, pourrait également être un facteur de risque du cancer du sein. C'est en tout cas ce vers quoi tendent les résultats de Rodrigues dos Santos et al. [182], qui en analysant le profil lipidique de façon prospective de 244 femmes atteintes d'un cancer du sein, ont constaté que les patientes possédant des niveaux de LDL-cholestérol plus élevés faisaient face à des tumeurs plus grosses, à un stade de différenciation plus avancé, avec une vitesse de prolifération plus rapide (Ki67 étant le marqueur utilisé), qui étaient plus souvent HER2-positives, et étaient diagnostiquées à des stades plus tardifs. Des niveaux élevés en LDL-cholestérol étaient également associés à une survie plus faible (après ajustement sur le stade et le sous-type immunohistochimique de la tumeur). Cependant, il faut aussi préciser qu'il semblerait qu'il existe des interactions entre certains facteurs de risque. En effet, Ha et al. [183] ont inclus 170 374 femmes Coréennes non ménopausées dans leur analyse, et en ajustant uniquement sur l'âge, ont mis en évidence une association positive significative entre les niveaux de cholestérol total dans le sérum et le risque de cancer du sein (HR = 1,11 [1,04 – 1,19] pour une augmentation de 1mmol/L). Cette association demeurerait légèrement significative en ajustant également sur des facteurs de risque connus du cancer du sein (l'âge à l'apparition des premières règles, l'âge au moment du premier accouchement, le fait d'avoir ou non eu des enfants, la prise de traitements hormonaux, la durée de la période d'allaitement, le fait de fumer, la consommation d'alcool), mais cette significativité disparaissait dès lors que l'IMC était lui aussi pris en compte (HR = 1,09 [1,01 – 1,18], contre HR = 1,06 [0,98 – 1,15]).

Enfin, d'autres études ne permettent pas du tout de conclure quant à l'existence d'un lien éventuel entre cholestérol et cancer du sein, qu'il soit positif ou négatif. Ainsi, l'étude prospective de Gaard et al. [184], par exemple, a utilisé les données de 31 209 Norvégiennes âgées de 20 à 54 ans pour étudier la relation entre le taux de lipides dans le sang et le risque de cancer du sein, et s'ils ont constaté que les femmes dont les niveaux de cholestérol total se situaient dans le quartile le plus élevé étaient moins à risque de développer un cancer du sein (RR = 0,87 [0,61 – 1,23]), ce résultat n'était pas statistiquement significatif. Il en allait de

même pour les niveaux de HDL-cholestérol (RR = 1,02 [0,73 – 1,42]), et de LDL-cholestérol (RR = 0,93 [0,67 – 1,29]), et de triglycérides (RR = 0,82 [0,58 – 1,16]). L'étude de cohorte de Hiatt et al. [185], portant sur 160 135 sujets (hommes et femmes) en Californie, n'a pas non plus mis en évidence d'association entre les niveaux de cholestérol et le risque de cancer, sauf en ce qui concernait les lymphomes et les cancers cervicaux pour les hommes (avec un risque qui diminuait en comparant pour le quintile le plus élevé comparé au quantile le plus faible). Steenland et al. [186] ont étudié 1 250 cas de cancers (657 hommes et 593 femmes) parmi les 14 407 sujets de la cohorte « National Health and Nutrition Survey I » (1970 – 1987) et ont conclu à une légère association inversée entre les niveaux de cholestérol et le risque de cancer (en général) pour les hommes mais pas pour les femmes. Moorman et al. [187], avec leur étude cas-témoins nichée, testaient quant à eux une hypothèse moins répandue, contraire à ce que l'on retrouve le plus souvent dans la littérature, à savoir que les femmes avec des niveaux élevés de HDL-cholestérol étaient plus à risque de développer un cancer du sein. Cette idée se basait sur le fait que beaucoup de facteurs de risque connus du cancer du sein sont associés à des niveaux élevés de HDL-cholestérol. La population étudiée incluait 95 000 femmes. Parmi elles, 200 cas ont été choisis de façon aléatoire, et à chacun d'entre eux a été associé un témoin. Les résultats de cette étude n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les niveaux de HDL-cholestérol des cas et ceux des témoins, mais ils ont néanmoins fait émerger une interaction significative entre les niveaux de HDL-cholestérol et le statut ménopausique : les femmes ménopausées atteintes d'un cancer du sein possédaient en effet des niveaux de HDL-cholestérol plus faibles (de 3,48 mg/dl, [-7,05 – 0,09]) que leurs témoins respectifs, tandis que les femmes ménopausées atteintes d'un cancer du sein avaient en revanche des niveaux de HDL-cholestérol plus élevés (de 2,05 mg/dl, [-0,94 – 5,03]). Aucune association significative entre les niveaux de HDL-cholestérol et le risque de cancer du sein n'a cependant été mise en évidence non plus en dissociant les statuts ménopausiques. His et al. [188] ont analysé 583 cas et 1 043 témoins issus de la cohorte prospective « E3N » et n'ont pas mis en évidence d'association significative entre la concentration en lipides dans le sérum et le risque de cancer du sein ou la mortalité par cancer du sein. Melvin et al. [189], en Suède, ont inclus 234 494 femmes dans leur étude, pour lesquelles étaient mesurés les niveaux de triglycérides, de cholestérol total et de glucose. Pour 27 394 de ces femmes étaient aussi disponibles les niveaux de HDL, de LDL, d'apoB et d'apoA-I. Leur étude a mis en évidence une légère diminution du risque de cancer du sein lorsqu'augmentaient les niveaux de triglycérides (HR = 1,01 [0,94 – 1,09], 0,93 [0,86 – 1,00] et 0,91 [0,84 – 0,99] en comparant, dans l'ordre, le deuxième, troisième et quatrième quartile au premier quartile), mais aucune

autre association significative entre le risque de cancer du sein et les niveaux de cholestérol total, de HDL, de LDL, d'apoB ou d'apoA-I n'a émergée de leurs résultats. Kucharska-Newton et al. [190], avec des travaux similaires (étude cas-témoins nichée dans la cohorte « Atherosclerosis Risk in Communities »), n'ont pas, eux non plus, été en mesure de détecter une association significative entre les niveaux de HDL-cholestérol et le risque de cancer du sein tous statuts ménopausiques confondus, mais ont tout de même conclu à une légère association significative pour les femmes non ménopausées (HR = 1,67 [1,06 – 2,63]). Enfin, Eliassen et al. [191] se sont penchés sur la question des traitements qui permettent de diminuer les niveaux de lipides ou de cholestérol et n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les individus suivant ce genre de traitements et ceux n'en prenant pas (RR = 0,99 [0,86 – 1,13]), relativement au risque de cancer du sein. Le même constat pouvait être fait en ce qui concernait les statines (RR = 0,91 [0,76 – 1,08]). Les mêmes auteurs ont également analysé les niveaux de cholestérol sériques et n'ont pas fait apparaître d'association significative (RR = 1,04 [0,91 – 1,17] en comparant les quantités les plus élevées aux plus faibles).

Au premier abord, les divergences de résultats entre les différentes études peuvent sembler déconcertantes. Comment les expliquer ? Plusieurs hypothèses peuvent entrer en jeu. D'une part, certains facteurs de risque du cancer du sein sont liés, et en fonction des ajustements qui sont réalisés, les conclusions peuvent changer. Prendre en compte l'IMC dans un modèle de régression, par exemple, peut masquer l'effet du cholestérol. D'autre part, l'impact du cholestérol ingéré via l'alimentation (ou plus généralement, de l'apport en graisses) peut être difficile à mesurer, car il est difficile de retranscrire avec exactitude la composition du régime d'un sujet. L'effet diffère aussi en fonction du type de cholestérol mesuré (HDL, LDL, ou total). Enfin, l'impact du cholestérol peut changer en fonction du moment où il est mesuré (avant ou après le diagnostic). Il existe en effet un biais, car le cancer lui-même peut augmenter ou diminuer les niveaux de cholestérol dans le sang, comme le font remarquer Touvier et al. [164]. Il est aussi important de noter que certains facteurs impliqués dans le développement du cancer du sein peuvent aussi affecter les niveaux de cholestérol plasmatiques et influencer sur d'autres pathologies comme l'athérosclérose (c'est notamment l'exemple des œstrogènes) [192 , 193].

Association positive					
Etude	Mesure de l'association	Type de cholestérol	Type de risque	Population	Précisions
Kitahara et al. [165]	HR = 1,17 [1,03–1,33]	Cholestérol total sanguin élevé (> 160mg/dL)	Incidence		
Ha et al. [183]	HR = 1,11 [1,04–1,19]	Cholestérol sérique total (augmentation de 1mmol/L)	Incidence		Ajustement sur l'âge uniquement
	HR = 1,09 [1,01–1,18]	Cholestérol sérique total (augmentation de 1mmol/L)	Incidence		Ajustement sur facteurs de risque cancer du sein sauf IMC
Katzke et al. [180]	HR = 1,39 [1,01–1,93]	HDL-cholestérol élevé ($\geq 1,70$ mmol/L)	Incidence		
Martin et al. [179]	HR = 1,23 [1,00–1,51] p=0,05	HDL-cholestérol élevé ($\geq 1,72$ mmol/L)	Incidence		
Hu et al. [181]	HR = 1,45 [1,14–1,85]	Apport élevé en cholestérol provenant de l'alimentation ($\geq 1880,266$ mg/semaine)	Incidence	Femmes ménopausées	
	HR = 1,48 [1,07–2,07]	Apport élevé en cholestérol provenant de l'alimentation ($\geq 1880,266$ mg/semaine)	Incidence		
Kim et al. [116]	HR = 1,69 [1,01–2,82]	Apport élevé en cholestérol provenant de l'alimentation, (consommation d'aliments riche en cholestérol $\geq 2-3$ fois/mois)	Incidence		
Osaki et al. [167]	HR = 2,87 [1,67–4,94]	Syndrome métabolique	Incidence	Femmes ménopausées > 55 ans	
	HR = 6,73 [2,93–15,43]	Syndrome métabolique	Incidence		
Agnoli et al. [169]	RR = 1,58 [1,07–2,33]	Syndrome métabolique	Incidence		

Association négative					
Tulinius et al. [170]	RR = 0,9 (p=0,07)	Cholestérol sanguin élevé (augmentation d'1 mmol/L) mesuré plus de 10 ans avant le diagnostic	Incidence		
	RR = 0,930 (p=0,23)	Cholestérol sanguin élevé (augmentation d'1 mmol/L) mesuré moins de 10 ans avant le diagnostic	Incidence		
Llanos et al. [171]	OR = 0,46 [0,25–0,85]	Cholestérol total élevé (≥ 200 mg/dL)	Incidence		
« Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants Study » [172]	HR = 0,83 [0,69 – 0,99]	Cholestérol total élevé (augmentation d'1 mmol/L)	Incidence		
Llanos et al. [171]	OR = 1,99 [1,06–3,74]	HDL-cholestérol faible (< 60 mg/dL)	Incidence		
« Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants Study » [172]	HR = 0,48 [0,28–0,83]	HDL-cholestérol élevé (augmentation d'1 mmol/L)	Incidence		
Ni et al. [176]	RR = 0,77 [0,64–0,93]	HDL-cholestérol élevé (≥ 0,35 mmol/L)	Incidence	Femmes ménopausées	
Kucharska-Newton et al. [190]	HR = 1,67 [1,06–2,63]	HDL-cholestérol sérique faible (<50 mg/dL)	Incidence	Femmes non ménopausées	
Ni et al. [176]	RR = 0,77 [0,64–0,93]	HDL-cholestérol élevé (≥ 0,35 mmol/L)	Incidence	Femmes ménopausées	
Lofterød et al. [175]	HR = 0,33 [0,12–0,89]	HDL-cholestérol élevé (≥ 0,35 mmol/L)	Mortalité		Cancers Triple- Négatifs
Kim et al. [173]	OR = 0,49 [0,33–0,72]	HDL-cholestérol élevé (≥ 60mg/dl)	Incidence	Femmes non ménopausées	
	OR = 0,34 [0,22–0,53]	HDL-cholestérol élevé (≥ 60mg/dl)	Incidence	Femmes non ménopausées non obèses	
	OR = 2,20 [1,32–3,67]	HDL-cholestérol faible (< 50mg/dl) et triglycérides élevés (≥ 150mg/dL)	Incidence		Cancers ER- négatifs et PR-négatifs
Agnoli et al. [169]	RR = 1,60 [1,10–2,33]	HDL-cholestérol sérique faible (≤55 mg/dL)	Incidence		
Furberg et al. [174]	RR = 0,75 [0,58–0,97]	HDL-cholestérol élevé (>1,64 mmol/L)	Incidence	Femmes ménopausées	
	RR = 0,43 [0,28–0,67]	HDL-cholestérol élevé (>1,64 mmol/L)	Incidence	Femmes ménopausées obèses	
	RR = 1,44 [0,91–2,30]	HDL-cholestérol élevé (>1,64 mmol/L)	Incidence	Femmes non ménopausées	
Martin et al. [179]	HR = 0,81 [0,66–0,98], p=0,03	Cholestérol non-HDL élevé (≥ 4,29 mmol/L)	Incidence		
Rodrigues dos Santos et al. [182]	HR = 0,129 [0,017 – 0,978]	LDL-cholestérol élevé (> 117 mg/dL)	Survie sans rechute		

Llanos et al. [171]	OR = 0,41 [0,21 – 0,81]	LDL-cholestérol élevé ($\geq$ 130 mg/dL)	Incidence		
Lu et al. [178]	RR = 0,56 [0,36–0,87]	27-hydroxycholestérol élevé ($\geq$ 221 nmol/L)	Incidence	Femmes ménopausées	
« Metabolic syndrome and Cancer Project » [168]	HR=0,70 [0,61–0,81]	Syndrome métabolique	Incidence		

Absence d'association					
Ni et al. [176]	RR = 0,96 [0,86–1,07]	Cholestérol total élevé	Incidence		
Lofterød et al. [175]	HR = 1,46 [0,87–2,44]	Cholestérol total élevé (≥ 6,26 mmol/L)	Mortalité		
Ha et al. [183]	HR = 1,06 [0,98–1,15]	Cholestérol sérique total (augmentation de 1mmol/L)	Incidence		Ajustement sur facteurs de risque cancer du sein y compris IMC
Gaard et al. [184]	RR = 0,87 [0,61–1,23]	Cholestérol sérique total élevé (≥6.86 mmol/L)	Incidence		
Hiatt et al. [185]	Pas d'effet significatif	Cholestérol total élevé	Incidence		
His et al. [188]	OR = 0,98 [0,74–1,30]	Cholestérol total sérique élevé (≥ 5,56 mmol/L)	Incidence		
	OR = 1,56 [0,94–2,58]	Cholestérol total sérique élevé (≥ 5,56 mmol/L)	Survie sans rechute		
Melvin et al. [189]	HR = 0,97 [0,89–1,05]	Cholestérol total sérique élevé (≥ 6,30 mmol/L)	Incidence		
Hu et al. [181]	HR = 1,10 [0,75–1,62]	Apport élevé en cholestérol (≥1880,266mg/semaine) provenant de l'alimentation	Incidence	Femmes non ménopausées	
Eliassen et al. [191]	RR = 0,99 [0,86–1,13]	Traitements diminuant les niveaux de cholestérol	Incidence		
Furberg et al. [174]	RR = 1,44 [0,91–2,30]	HDL-cholestérol élevé (>1,64 mmol/L)	Incidence	Femmes non ménopausées	
Lofterød et al. [175]	HR = 0,82 [0,1–1,33]	HDL-cholestérol élevé (≥ 0,35 mmol/L)	Mortalité		
Borgquist et al. [177]	Pas d'association	HDL-cholestérol	Incidence		
Gaard et al. [184]	RR = 1,02 [0,73–1,42]	HDL-cholestérol sérique élevé (≥1,66 mmol/L)	Incidence		
Moorman et al. [187]	OR = 0,99 [0,97–1,01]	HDL-cholestérol sérique élevé (augmentation de 1 mg/dl)	Incidence		
	OR = 0,53 [0,20–1,39]	HDL-cholestérol sérique élevé (>37 mg/dl)	Incidence	Femmes non ménopausées	
	OR = 0,70 [0,67–4,33]	HDL-cholestérol sérique élevé (>37 mg/dl)		Femmes ménopausées	
His et al. [188]	OR = 0,75 [0,49–1,15]	HDL-cholestérol sérique élevé (≥ 2,63 mmol/L)	Incidence		
	OR = 1,45 [0,87–2,44]	HDL-cholestérol sérique élevé (≥ 2,63 mmol/L)	Survie sans rechute		
	OR = 0,95	HDL-cholestérol sérique	Incidence		Cancers du

	[0,76–1,18]	élevé			sein ER-positifs
	OR = 0,79 [0,38–1,66]	HDL-cholestérol sérique élevé	Incidence		Cancers du sein ER-négatifs)
Melvin et al. [189]	HR = 1,05 [0,86–1,29]	HDL-cholestérol sérique élevé ($\geq 1,98$ mmol/L)	Incidence		
Kucharska-Newton et al. [190]	HR = 1,08 [0,84–1,40]	HDL-cholestérol sérique faible (<50 mg/dL)	Incidence		
	HR = 0,93 [0,66–1,30]	HDL-cholestérol sérique faible (<50 mg/dL)	Incidence	Femmes ménopausées	
Gaard et al. [184]	RR = 0,93 [0,67–1,29]	LDL-cholestérol sérique faible ($\geq 4,72$ mmol/L)	Incidence		
Borgquist et al. [177]	Pas d'association	LDL-cholestérol	Incidence		
His et al. [188]	OR = 0,91 [0,60 –1,38]	LDL-cholestérol sérique élevé ($\geq 2,82$ mmol/L)	Incidence		
	OR = 1,01 [0,61–1,69]	LDL-cholestérol sérique élevé ($\geq 2,82$ mmol/L)	Survie sans rechute		
	OR = 1,10 [0,89–1,36]	LDL-cholestérol sérique élevé	Incidence		Cancers du sein ER-positifs
	OR = 0,99 [0,55–1,79]	LDL-cholestérol sérique élevé	Incidence		Cancers du sein ER-négatifs
Melvin et al. [189]	HR = 0,92 [0,75–1,13]	LDL-cholestérol sérique élevé ($\geq 4,14$ mmol/L)	Incidence		
Lu et al. [178]	RR = 0,9 [0,66–1,22]	27-hydroxycholestérol élevé (≥ 221 nmol/L)	Incidence		
	RR = 1,33 [0,75–2,38]	27-hydroxycholestérol élevé (≥ 221 nmol/L)		Femmes non ménopausées	

Tableau 2 : Aperçu des réponses des études épidémiologiques à la question « le cholestérol est-il un facteur de risque du cancer du sein ? ». Les données présentées ici sont issues d'une revue de la littérature exercée par nos soins à l'aide de données existantes en Décembre 2019 et pourraient ne pas être exhaustives. Elles font néanmoins état de la complexité de cette question de recherche, et des divergences de résultats qui existent dans la littérature en fonction de la population concernée, du type de cholestérol mesuré, ou du type de cancer du sein considéré. Si la population n'est pas précisée, il s'agit des femmes dans leur ensemble.

b. Les réponses des études in vivo

Les études épidémiologiques ne sont pas les seules à apporter des éléments de réponse à notre question de départ, à savoir le cholestérol est-il un facteur de risque du cancer du sein ? Beaucoup d'études sont également menées *in vivo*, soit directement sur l'homme, soit en ayant recours à des modèles animaux.

L'étude interventionnelle de Blackburn et al. [194], par exemple, visait à tester l'impact de la consommation de graisses sur la survie de femmes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce. Pour cela, ils ont randomisé 2 437 femmes malades âgées de 48 à 79 ans, et ont constaté qu'une diminution de la consommation de graisses permettait d'améliorer de 24% la survie sans rechute des femmes ménopausées. En particulier, l'impact positif de ce changement de régime alimentaire était plus marqué pour les femmes ayant un cancer du sein ER-négatif, PR-négatif, ou Triple-Négatif, avec une amélioration de la survie de 42% pouvant s'expliquer par un rôle de l'insuline et de l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1). Rodrigues dos Santos et al. [195], quant à eux, se sont également intéressés à l'impact d'une consommation riche en cholestérol sur la croissance tumorale, mais cette fois-ci avec des modèles de souris. En utilisant trois lignées cellulaires (MDA-MB-231, HTB-20, 4T1) et deux régimes alimentaires différents (un régime riche en cholestérol et un régime contrôle), ils ont montré qu'un régime riche en cholestérol stimulait la croissance tumorale *in vivo* de 20%. Dans l'un de leurs modèles de souris, enrichir l'alimentation en cholestérol conduisait également à une augmentation du phénomène de métastase. Cleary et al. [196] ont utilisé un modèle murin de cancer du sein post-ménopause (les souris transgéniques MMTV-TGF) et ont testé deux régimes alimentaires, l'un à faible teneur en graisses et l'autre à teneur élevée, et ont constaté que les souris qui suivaient un régime alimentaire riche en graisses développaient des tumeurs mammaires plus rapidement que celles suivant un régime alimentaire pauvre en graisses, et qu'à l'intérieur du premier groupe, les souris obèses étaient celles qui développaient des tumeurs le plus rapidement. Cependant, aucune différence en termes d'incidence de tumeurs mammaires n'a été mise en évidence. Avec des méthodes très similaires, Dogan et al. [197] ont quant à eux constaté une plus grande incidence de tumeurs mammaires palpables pour les souris suivant un régime alimentaire riche en graisses (et plus particulièrement encore pour celles qui parmi elles étaient sujettes à l'obésité). Leurs résultats ont également montré que les niveaux de leptine sériques étaient plus élevés pour les souris avec une alimentation riche en graisses, et qu'au niveau protéique et au niveau des ARNm, les

souris avec une alimentation riche en graisses exprimaient moins les récepteurs à leptine ObRb, Jak2 et STAT3 (il n'y avait en revanche aucune différence d'expression de la leptine ou de la protéine ObR entre les deux groupes de souris). Dogan et al. ont également remarqué que certaines protéines pro-apoptotiques (PARP, caspase-3, Bcl-xL) étaient plus exprimées dans les souris avec un régime alimentaire pauvre en graisses que dans les souris avec un régime alimentaire riche en graisses, mais aucune différence d'expression n'a été mise en lumière concernant les protéines Bax, Bcl-2, et phospho-Akt. Pelton et al. [198] ont également étudié l'impact d'un régime alimentaire riche en graisses sur le développement de tumeurs mammaires chez des souris, mais cette fois en injectant des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 dans des souris immunodéficientes. Les souris suivant un régime riche en graisses possédaient des niveaux de cholestérol sériques plus élevés et développaient des tumeurs mammaires plus vite. Pas de différence n'a en revanche été constatée en termes de quantité de cholestérol intra-tumorale, ou en termes de concentration d'insuline. Les souris suivant un régime alimentaire riche en graisses et prenant de l'ezetimibe (traitement permettant de diminuer l'absorption intestinale de cholestérol) développaient par ailleurs des tumeurs moins rapidement que celles ne prenant pas de traitement, soulignant le rôle majeur du cholestérol dans l'effet du régime alimentaire sur la progression de la maladie. En séparant l'ensemble des souris (indépendamment du régime ou du traitement suivis) en deux groupes selon leur niveau de cholestérol sérique, Pelton et al. ont, d'une part, constaté que les souris hypercholestérolémiques développaient des tumeurs *in fine* de plus gros volume, et d'autre part fait émerger une corrélation positive entre le niveau de cholestérol et la taille de la tumeur. Au sein de ces deux groupes (souris hypercholestérolémiques versus toutes les autres), aucune différence de niveau d'insuline n'a été mise en évidence, et en considérant toutes les souris dans leur ensemble, aucune association entre le développement de la tumeur et les niveaux d'insuline n'a été découverte.

Toujours dans la même optique, Alikhani et al. [199] ont utilisé une approche différente pour induire une dyslipidémie. Ainsi, ils ont injecté des cellules cancéreuses mammaires métastatiques (Mvt-1) et non-métastatiques (Met-1) dérivées de souris transgéniques MMTV-PyMT/FVB-N dans un modèle de souris knockout *apoE*^{-/-} (modèle dans lequel les niveaux de cholestérol et de triglycérides sont élevés) ou dans des souris contrôles *wild-type*. Les deux groupes de souris suivaient un régime riche en cholestérol/graisse, et au cours de cette expérience, les souris *apoE*^{-/-} ont vu leurs tumeurs se développer plus rapidement et ont subi davantage de métastase spontanées au niveau des

poumons. L'injection des cellules Mvt-1 a également conduit à une augmentation des métastases chez les souris *apoE*^{-/-} en comparaison aux souris contrôles. Le fait d'administrer aux souris un inhibiteur de PI3K (BKM120) permettait de ralentir la croissance tumorale et le phénomène de métastase dans les souris *apoE*^{-/-}, ce qui laisserait présager que cette voie de signalisation serait impliquée dans le phénomène. Gallagher et al. [200] ont eux aussi utilisé deux modèles de souris immunodéficientes (*Rag1*^{-/-}/*Ldlr*^{-/-} et *Rag1*^{-/-}/*apoE*^{-/-}) et deux modèles de souris non immunodéficientes (*Ldlr*^{-/-} et *apoE*^{-/-}) pour étudier l'impact de niveaux élevés en LDL-cholestérol sur le cancer du sein dérivé des cellules MDA-MB-231 ou de souris surexprimant Her2/Neu, respectivement. Les tumeurs générées par l'une comme l'autre de ces méthodes exprimaient fortement le récepteur LDLR, et grossissaient davantage dans les souris avec une forte concentration en LDL-cholestérol. En inhibant le LDLR, les tumeurs des souris surexprimant Her2/Neu ralentissaient leur croissance dans les souris *LDLR*^{-/-} et *apoE*^{-/-} (avec un mécanisme impliquant une augmentation de l'apoptose). Gallagher et al. ont également rapporté, après analyse de banque de données publiques, qu'une forte expression de LDLR dans les tissus mammaires cancéreux humains est associée à une diminution de la survie sans rechute, constat d'autant plus vrai pour les patientes ayant subi des thérapies systémiques, ce qui va dans le même sens que les conclusions de leurs expériences.

Enfin, il existe également plusieurs études portant sur le 27-hydroxycholestérol, qui est à la fois un métabolite du cholestérol et un ligand du récepteur ER comme du récepteur LXR (Liver X Receptor). Nelson et al. [201] ont ainsi montré qu'il stimule la croissance tumorale (ER-dépendante et LXR-dépendante) *in vivo* dans un modèle de souris. Inhiber la conversion du cholestérol en 27HC par un inhibiteur de la cytochrome P450 oxydase CYP27A1 (qui est responsable de la synthèse de 27-HC) permettait, sinon de stopper totalement, du moins d'atténuer les effets pro-prolifératifs du 27-HC. Les mêmes auteurs ont également investigué ce qu'il se produit au niveau de l'homme avec une analyse immunohistochimique de tumeurs humaines, et ont constaté une association entre l'expression de l'enzyme CYP27A1 et le grade de la tumeur (plus elle est exprimée, à la fois au niveau de la tumeur mais aussi au niveau des macrophages, et plus la tumeur est à un stade avancé). Wu et al. [178] ont eux aussi montré que le 27HC stimule la croissance de tumeurs issues de xénogreffes de cellules MCF-7 sur des souris. Ces mêmes auteurs rapportent également que les patientes atteintes d'un cancer du sein ER-positif arborent une quantité en 27HC plus élevée dans les tissus mammaires normaux que les femmes saines. Une augmentation de 27HC dans les tumeurs est également associée, toujours selon cette étude, à une diminution de

l'expression de CYP7B1 (qui catabolise le 27-HC), qui est elle-même associée à une diminution de la survie. De façon très intéressante, dans la cohorte EPIC-Heidelberg, les niveaux de 27HC n'étaient pas associés avec le risque de cancer dans la population en générale [178]. Cependant, des niveaux élevés de 27HC sont associés à une diminution du risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées. Dans cette étude, la majorité des cancers étaient ER-positifs. Aucune d'association n'y a été observée chez les femmes non ménopausées. Ces informations semblent montrer que, dans cette population, le 27HC pourrait inhiber l'activité des œstrogènes sur ER chez les femmes ménopausées.

c. Les réponses des études *in vitro*

Les études *in vitro* apportent elles aussi leur lot de réponses, en permettant, notamment, de mettre en lumière certains mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'effet du cholestérol sur le cancer du sein.

Alikhani et al. [199] ont étudié la réponse des cellules cancéreuses mammaires métastatiques Mvt-1 au cholestérol et ont conclu que ce dernier stimulait la phosphorylation de Akt (au niveau du résidu sérine S473) et la prolifération, en confirmant que le fait de retirer le cholestérol du milieu permettait d'éradiquer l'effet sur la phosphorylation d'Akt. Rodrigues dos Santos et al. [195] ont incubé des cellules MDA-MB-231, HTB-20 et HTB-126 avec du LDL-cholestérol et ont montré que ce dernier stimulait la prolifération de ces trois lignées (et ce de façon significative pour les deux premières), stimulait également la migration par cicatrisation des cellules MDA-MB-231 (mais pas le HDL-cholestérol), et provoquait une perte d'adhésion des cellules MDA-MB-231. Une analyse complémentaire sur micropuces leur a également permis de mettre en évidence qu'en présence de LDL-cholestérol, certains gènes codant pour des protéines d'adhésion étaient sous-exprimés (notamment : cadherin-related family member 3, CD226, claudine 7, occludine, intégrine $\beta 8$), et certains gènes codant pour des protéines pro-prolifératives étaient au contraire surexprimés (parmi lesquelles : Akt, ERK, Jnk, tous trois sous la dépendance de la voie ErbB2). La suractivation d'Akt et d'ERK a été confirmée par Rodrigues dos Santos et al. au niveau protéique par Western-Blot, mais pas celle de Jnk. Gallagher et al. [200] ont montré qu'inhiber le LDLR diminuait la survie cellulaire des cellules MDA-MB-231, avec un mécanisme impliquant l'apoptose, ce qui là aussi laisse présager d'une implication du LDL dans la survie et la prolifération cellulaire.

Les esters de cholestérol pourraient également être impliqués, notamment en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses [202]. Il semblerait aussi qu'une accumulation d'esters de cholestérol au sein de la tumeur mammaire contribue à son caractère agressif. C'est ce qu'ont constaté de Gonzalo-Calvo et al. [203], par exemple, en analysant la composition tumorale en esters de cholestérol, cholestérol libre et triglycérides de 30 échantillons par chromatographie sur couche mince. En modélisant la relation entre ces concentrations et différents marqueurs du phénotype cancéreux, ils ont constaté qu'il existait une forte association entre la quantité élevée en esters de cholestérol et : le stade histologique de la tumeur (plus la concentration en esters de cholestérol était importante et plus le stade histologique était élevé), Ki-67, et la nécrose tumorale. Gonzalo-Calvo et al. ont également constaté que les tumeurs riches en esters de cholestérol présentaient des niveaux d'ARNm et protéiques élevés en LDLR, Scavenger Receptor Class B member 1 (SRB1), et stérol O-acyltransférase 1 (SOAT1). Antalis et al. [204] ont eux aussi étudié certains marqueurs du stockage de lipides dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-436 (ER-négatives) et dans la lignée cellulaire MCF-7 (ER-positive) et ont constaté que les concentrations en triacylglycérols, en esters de cholestérol, en acide oléique et en LDL-stimulated esters de cholestérol étaient plus élevées dans les lignées ER-négatives que dans la lignée ER-positive. Les cellules ER-négatives possédaient également davantage de gouttelettes lipidiques, et présentaient des niveaux de SOAT1 plus élevés (d'ARNm et de protéine, ainsi qu'une activité plus élevée), plus de cavéoline-1, incorporent davantage les LDL, et présentaient une synthèse *de novo* de cholestérol plus élevée. La prolifération des cellules MDA-MB-231 pouvait être stimulée par les LDL, mais pas celle des cellules MCF-7, et la prolifération des cellules ER-négatives (et plus spécifiquement encore, la prolifération induite par les LDL) pouvait être réduite en inhibant la SOAT (avec l'inhibiteur CP-113,818). Il se pourrait que ces différences entre les cellules ER-négatives et les cellules ER-positives soient notamment dues à leurs capacités différentes à stocker et à ingérer les lipides. Ces mêmes auteurs ont par la suite mis en évidence que si elles étaient cultivées dans un milieu dépourvu de lipoprotéines, les cellules MDA-MB-231 possédaient moins de gouttelettes lipidiques et migraient moins (perte de 85%) [205]. En supplémentant de nouveau ce milieu en LDL, les cellules retrouvaient leur capacité à migrer de façon SOAT-dépendante. Par ailleurs, les niveaux d'ARNm du LDLR étaient 12 fois plus élevés dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules non cancéreuses MCF-10A, et le fait d'ajouter du LDL dans le milieu dépourvu de lipoprotéines diminuait les niveaux d'ARNm du LDLR dans les cellules MCF-10A, mais pas dans les cellules MDA-MB-231. En inhibant la SOAT1, les niveaux

d'ARNm du LDLR dans les MDA-MB-231 étaient réduits, mais pas ceux des MCF-10A, ce qui laisse à penser que c'est l'activité de la SOAT1 qui entraîne une augmentation de l'expression du LDLR.

Il a été montré que ce n'est parfois pas le cholestérol lui-même qui agit dans le développement du cancer, mais ses métabolites. Ainsi, Lin et al. [206] ont montré que certains oxystérols (le cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol) inhibent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate, en inhibant la voie Akt. Dans le cadre du cancer du sein, c'est surtout le rôle du 27-hydroxycholestérol qui a beaucoup été étudié. Ce dernier serait en effet capable de stimuler le phénotype cancéreux de certaines lignées cellulaires mammaires. Produit par les cellules MCF-7, par exemple, il stimule la prolifération cellulaire de façon ER-dépendante, et GDNF-RET-dépendante [178]. Shen et al. [207] ont également montré qu'il stimule la migration, l'invasion et la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules MCF7 et T47D (toutes deux étant des lignées ER-positives) ainsi que l'expression de la matrix metalloproteinase 9 (MMP9) dans ces mêmes cellules, aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique. Ils ont aussi constaté que le 27HC activait STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3) dans les cellules ER-positives, et qu'inhiber STAT3 réduisait l'effet de 27HC sur MMP9, sur la migration et sur l'invasion. Toujours selon leurs travaux, le 27HC augmentait aussi l'expression de la MMP9, de la vimentine et de STAT-3 dans les cellules ER-négatives MDA-MB-231. Les résultats de Torres et al. [208] convergent vers le même constat : une exposition des cellules MCF-7 au 27HC stimule la Transition Epithélio-Mésenchymateuse en diminuant l'expression de la E-cadherine et de la β -caténine et en provoquant une perte des jonctions adhérentes. *A contrario*, lorsque le 27HC était retiré du milieu, les cellules MCF-7 recommençaient à exprimer la E-cadhérine et la β -caténine, mais sans être capables d'adhérer entre elles pour reconstituer un épithélium, et elles exprimaient de façon prolongée EGFR2/neu (epidermal growth factor receptor 2) au niveau de la membrane plasmique, ce qui suggère un mécanisme d'action passant par EGFR2. Ma et al. [209] suggèrent quant à eux un autre mécanisme d'action, car ils ont montré que le 27HC active l'oncoprotéine Myc (qui est généralement surexprimée dans les cancers du sein) dans les cellules MCF-7 en augmentant sa stabilité (notamment en inhibant trois de ses modulateurs négatifs : PP2A, SCP1 et FBW7) au niveau transcriptionnel. Il semblerait que le 27-HC agisse aussi sur la protéine p53. Raza et al. [210] ont en effet mis en évidence qu'exposer les cellules MCF-7 au 27HC réduisait l'activité de p53 au niveau transcriptionnel, mais ne provoquait aucun changement pour les cellules MDA-MB-231. Toujours dans cette

même étude, exposer les cellules au 27HC augmentait l'expression de l'E3 ubiquitin protein ligase MDM2 au niveau protéique, diminuait l'expression de p53, et stimulait une interaction entre p53 et MDM2. En réactivant p53 (avec l'activateur Tenovin-1) ou en inhibant MDM2 (avec l'inhibiteur Nutlin-3 ou en utilisant un siARN), l'effet de 27HC sur la prolifération cellulaire s'en retrouvait diminué. Il se pourrait, d'ailleurs, qu'il existe un lien entre la protéine p53, dont le gène est le plus fréquemment muté dans le cancer du sein (et dont les mutations stimulent la tumorigénèse et annoncent de mauvais pronostics), et la synthèse de cholestérol. En effet, si la protéine p53 n'est plus fonctionnelle, les voies de synthèse du cholestérol s'en trouvent sur-activées (la voie du mévalonate, en particulier), et cela suffit à modifier la structure mammaire normale [211].

Enfin, il se peut aussi que des dérèglements des niveaux de cholestérol de la mitochondrie participent également au développement du cancer du sein. En effet, la protéine StARD3, qui est avec StAR l'une des deux principales protéines qui régulent l'entrée de cholestérol dans la mitochondrie, est associée à un mauvais pronostic pour le cancer du sein. Alpy et al. [212] ont montré que lorsque l'on diminue les niveaux de cette protéine, on diminue la prolifération et on augmente la mort cellulaire des cellules cancéreuses mammaires Her2-négatives, et Vassilev et al. [213] ont montré que lorsqu'au contraire cette protéine est surexprimée, cela augmente les niveaux de cholestérol dans la cellule et en conséquence, diminue les capacités d'adhésion (et donc par là même, diminue les propriétés métastatiques) des cellules MCF-7. Vassilev et al. ont également rapporté, après analyse des données de deux cohortes Finnoises (2 220 patientes), que la protéine StARD3 était surexprimée dans environ 10% des cas de cancers du sein, et que cette surexpression était associée à une amplification de HER2, à des vitesses de prolifération plus élevées, à des tumeurs plus volumineuses, à la présence de métastases nodales au moment du diagnostic, à des cancers du sein de type ER-négatif et PR-négatif, et à l'expression de la protéine p53, soit, de manière générale, à de mauvais facteurs pronostics. Avec les données de la cohorte TCGA (« The Cancer Genome Atlas », [214]), il a été montré que les gènes des protéines StAR et StARD3 étaient surexprimés dans 30 % des cas de cancers du sein, mais sans mise en évidence d'association entre ces gènes et la survie [215]. Un autre moyen de lier cancer et homéostasie du cholestérol mitochondrial se fait par l'expression du ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), qui est modifiée dans certains cas de cancer. En particulier, une baisse de son activité conduit à stimuler la survie des cellules cancéreuses du côlon en augmentant les niveaux de cholestérol dans la mitochondrie [216].

d. Les mécanismes d'action du cholestérol

Le cholestérol semble être impliqué dans le développement du cancer en général [217]. En témoigne à la fois le fait que des niveaux élevés en cholestérol sont souvent associés à une augmentation du risque de certains cancer (en plus du sein, il est possible de citer les cancers de la prostate ou du côlon), et le fait que l'utilisation de certains médicaments visant à diminuer les niveaux de cholestérol, comme les statines, est souvent associée à une diminution de la mortalité par cancer. Il est difficile d'émettre des généralités, en revanche, car certains types de cancer semblent au contraire n'être pas du tout liés aux niveaux de cholestérol (les cancers de la vessie ou des poumons, par exemple), et car certaines études tendent à montrer que les statines peuvent participer au développement du cancer [218 , 219 , 220 , 221].

L'un des mécanismes d'action suspectés du cholestérol implique sa position centrale dans la chaîne de différentes voies de signalisation (**Figures 2 et 3**). Le cholestérol peut en effet activer la voie Hedgehog, par exemple, en se liant de manière covalente au récepteur Smoothened (qui est un récepteur couplé à une protéine G) [222 , 223]. Or la voie Hedgehog stimule la différenciation, la polarisation et la prolifération cellulaire, et est connue pour être impliquée dans différents types de cancers comme les cancers de la peau, des poumons, du cerveau, gastrointestinal, ou les leucémies [224]. Le cholestérol se lie aussi au domaine PDZ de certaines protéines d'échafaudage telles que NHERF1/EBP50, qui régule plusieurs voies de prolifération oncogéniques (PI3K/PTEN/Akt, Wnt/ β -caténine, ou bien encore le récepteur EGFR) [225]. Le cholestérol est également l'un des principaux éléments qui constituent les radeaux lipidiques, qui eux aussi sont essentiels pour certaines voies de signalisation. Lorsque les niveaux de cholestérol changent, c'est toute la structure des radeaux lipidiques qui change, et avec leur structure, leur fonction dans la cellule. Les rôles de ces invaginations membranaires sont effectivement multiples. Ils jouent par exemple un rôle majeur dans la survie cellulaire en étant capable de réguler le déclenchement de l'apoptose. De façon plus générale a lieu au niveau des radeaux lipidiques la phosphorylation ou la déphosphorylation de certaines kinases, de certains récepteurs de mort cellulaire, et de certains canaux calciques [226]. La protéine Akt, par exemple, dont nous avons déjà souligné l'importance, est plus facilement activée lorsqu'elle est transloquée au niveau des radeaux lipidiques [227]. Ainsi, utiliser de la méthyl- β -cyclodextrine permet de modifier la structure des radeaux lipidiques en

extrayant le cholestérol, ce qui inhibe la phosphorylation de Akt et déclenche l'apoptose des cellules cancéreuses [228]. Cela peut aussi avoir comme conséquence la perte de CD44, qui est une glycoprotéine impliquée dans la migration, l'adhésion et la métastase [229]. Le recours aux statines permet lui aussi d'impacter la structure des radeaux, ce qui entrave la phosphorylation (induite par l'EGF) des protéines Src, Akt, et p44/42, et ainsi, empêche, notamment, la migration de certaines cellules cancéreuses [230]. Les radeaux lipidiques participent aussi (avec la cavéoline-1) à la formation des invadopodes et à la dégradation de la matrice extra-cellulaire dans le cas des cancers du sein [231]. Perturber les radeaux lipidiques avec de la méthyl- β -cyclodextrine permet d'ailleurs aussi de freiner l'invasion des cellules cancéreuses mammaires, ce qui pourrait notamment passer par une baisse des niveaux de la métalloprotéinase MMP9 [232]. Des précurseurs ou dérivés du cholestérol peuvent également agir directement sur certaines voies de signalisation. L'acide mévalonique, par exemple, peut activer PI3K, et en cascade mTOR [233]. Certains isoprénoïdes, comme l'isopentenyl-diphosphate, le farnésyl-pyrophosphate, ou le geranylgeranyl-pyrophosphate, peuvent modifier les GTPases Ras et Rho par prénylation et ainsi favoriser leur translocation au niveau de la membrane plasmique. Or ces dernières, une fois prénylées, sont impliquées dans des voies de signalisation cancérigènes [234]. Des oxystérols peuvent aussi agir en se liant au récepteur LXR, qui une fois activé possède des propriétés anti-tumorales, étant capable, notamment, de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et de réduire la croissance tumorale *in vivo* chez des souris [235, 236]. Certains oxystérols peuvent également réguler ces propriétés via leur interaction avec d'autres récepteurs nucléaires tels que ER α ou le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) [217, 237, 238, 239].

Outre son implication dans les voies de signalisation, le cholestérol, en tant que simple composant essentiel de la membrane plasmique, est nécessaire aux cellules cancéreuses, qui prolifèrent à l'infini. La synthèse de cholestérol est par conséquent suractivée lorsque le cancer se développe et s'installe [240]. Stimuler artificiellement la synthèse de cholestérol conduit également à la naissance d'un phénotype cancéreux : cela permet, par exemple, de stimuler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, par un mécanisme p53-dépendant [241]. La HMG-CoA réductase, enzyme phare de la synthèse de cholestérol, serait capable de stimuler la migration des cellules cancéreuses du colon en inhibant la geranylgeranylation de la GTPase RhoA (qui participe au développement cellulaire et à la régulation du cycle cellulaire) [242]. La squalène époxidase, qui est une enzyme qui intervient en aval de la HMG-CoA réductase, est quant à elle surexprimée dans les cancers du sein

HER2-positifs et de grade élevé, et l'inhiber permet de réduire la viabilité cellulaire ces cellules cancéreuses mammaires [243]. La voie PI3K/Akt/mTOR est également liée à la synthèse de cholestérol. En particulier, inhiber le complexe mTORC1 conduit à l'accumulation de SREBP1 (« Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 ») et donc empêche l'activation des gènes cibles de SREBP1. La réciproque est vraie aussi : empêcher l'expression de SREBP inhibe la lipogenèse médiée par Akt, diminue l'effet d'Akt sur l'augmentation de la taille des cellules, et celui de PI3K sur la stimulation de la prolifération cellulaire [244 , 245]. Bloquer le flux entrant de cholestérol a également des propriétés anti-oncogènes, tandis que parallèlement, bloquer le flux sortant de cholestérol stimule le développement du cancer. Ainsi, inhiber NPC1L1 diminue les niveaux de cholestérol dans le plasma, les niveaux de β -caténine, et les niveaux de ERK phosphorylée, et ainsi réduit sous certaines conditions le risque de tumorigenèse colorectale [246]. NPC1L1 est également un transporteurs d'oxystérols parmi lesquels le 5,6 β -epoxycholestérol [247], qui sert de substrat préférentiel à l'enzyme cholestérol-5,6-epoxyde hydrolase pour former le cholestane-3 β ,5 α -diol, lui-même transformé par les cellules cancéreuses mammaires en 6-oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol (OCDO), qui est un promoteur de tumeurs triple-négatives [217 , 237 , 238 , 239]. Inhiber ABCA1, en revanche, permet d'augmenter les niveaux de cholestérol intracellulaires, ce qui favorise la progression du cancer et le rend plus agressif. Il a d'ailleurs été montré que le promoteur du gène *ABCA1* était souvent hyperméthylé dans le cas du cancer de la prostate, mais pas dans les cellules prostatiques bénignes [248]. Lorsque des mutants de TP53 et de Ras sont surexprimés, cela inhibe ABCA1 et augmente les niveaux de cholestérol dans la mitochondrie, ce qui a pour conséquence de stimuler la croissance tumorale *in vivo*. L'action anti-oncogénique de ABCA1 pourrait donc notamment être due à sa capacité de diminuer les niveaux de cholestérol de la mitochondrie. En effet, il a souvent été reporté que les membranes des mitochondries des cellules cancéreuses contiennent plus de cholestérol que ceux des cellules normales, ce qui diminue la fluidité de ces membranes, réduisant l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale (PTPM), et empêchant par conséquent la libération de molécules dont le rôle est de stimuler l'apoptose (le cytochrome C, par exemple) [249 , 250 , 251]. L'inhibition de ABCA1 médiée par les microARN miR-33 est aussi à l'origine d'effets pro-tumoraux [252]. Certains mécanismes cancérigènes impliquent par ailleurs d'autres transporteurs, comme ABCG5 (« ATP-binding cassette transporter G5 ») et ABCG8 (« ATP-binding cassette transporter G8 »), notamment en ce qui concerne le cancer de la vésicule biliaire [253].

Nous avons déjà mentionné le fait que certains métabolites du cholestérol sont eux aussi impliqués dans le développement du cancer du sein, mais il en existe d'autres qui pourraient au contraire le freiner. C'est le cas, par exemple, de la dendrogénine A, qui est un métabolite secondaire du cholestérol qui a été découvert récemment et qui a été identifié comme étant un suppresseur de tumeurs. Alkaloïde stéoridal issu de la condensation du 5,6 α -epoxycholestérol (5,6 α -EC) et de l'histamine, la dendrogénine A est synthétisée dans les tissus sains des mammifères, et son métabolisme est dérégulé dans les cellules cancéreuses. Elle n'est pas retrouvée, par exemple, dans les tumeurs du cancer du sein ou de la peau, ce qui pourrait être dû à un déficit de l'enzyme dendrogénine A synthase [254 , 255]. Non seulement elle est capable de transformer le phénotype de cellules cancéreuses en phénotype de cellules normales, à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais utilisée à hautes doses, elle peut induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans les tissus sains, elle induit la différenciation cellulaire de cellules de mélanomes en mélanocytes, ou la différenciation de cellules pluripotentes carcinoembryonniques en neurones [254]. Elle induit également la polarisation et le phénomène de lactation des cellules cancéreuses mammaires. *In vivo*, elle freine la progression du cancer du sein ou du mélanome dans des modèles de souris immunocompétentes, notamment en induisant la différenciation cellulaire des cellules cancéreuses [254 , 255]. La cytotoxicité de la dendrogénine A se traduit par un comportement s'apparentant à l'apoptose, mais ne passe pas réellement par un déclenchement classique de l'apoptose car les inhibiteurs de la caspase ne permettent pas de contrecarrer les effets de la dendrogénine A. Les mécanismes responsables de sa cytotoxicité impliquent en réalité les facteurs de transcription Nur77 et NOR1 et le récepteur LXR β (mais pas LXR α) et induisent une autophagie léthale [256]. En se liant au récepteur LXR β , la dendrogénine A peut également moduler son activité et ainsi agir sur la transcription d'un certain nombre de gènes du métabolisme du cholestérol. Ainsi, elle inhibe l'expression de ABCA1 mais stimule l'expression du récepteur LDLR [257].

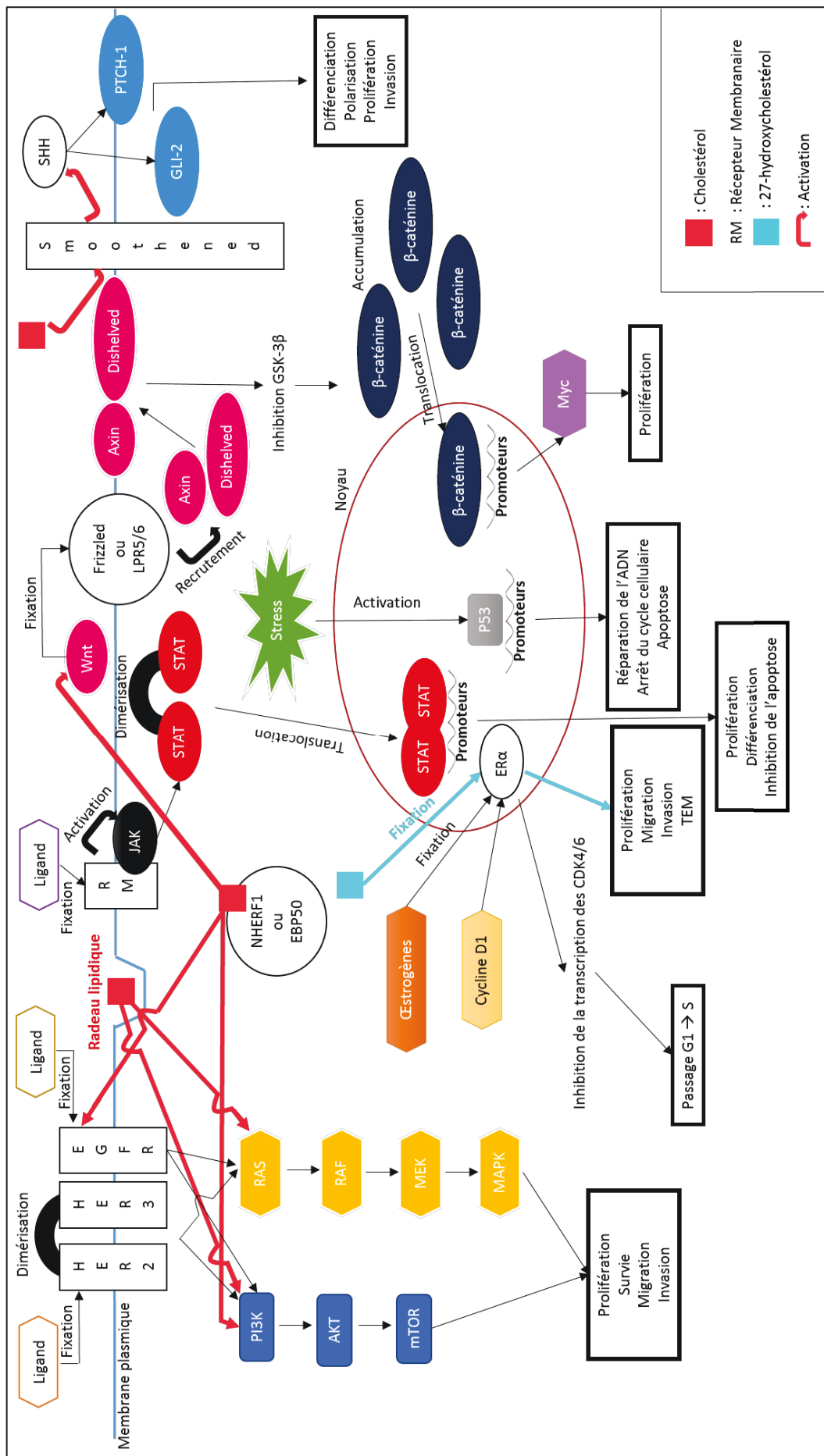


Figure 2 : Principales voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein. Les voies PI3K/Akt/mTOR et RAS/RAF/MAPK, impliquées dans les phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires, peuvent être activées par les récepteurs HER2 ou EGFR. Ce dernier peut être activé par des protéines d'échafaudage comme NHERF1 ou EBP50, sous l'impulsion d'une liaison avec du cholestérol. Liées au cholestérol, NHERF1 ou EBP50 peuvent aussi stimuler la voie Wnt/ β -caténine, qui active la transcription du gène Myc, et ainsi stimule la prolifération. Le cholestérol présent dans les radeaux lipidiques peut contribuer à l'activation des voies PI3K et MAPK. En se liant au récepteur Smoothened, le cholestérol peut activer la voie Hedgehog, qui participe à la différenciation et à la polarisation des cellules mammaires, et stimule la prolifération et l'invasion. Le 27-hydroxycholestérol, qui est un métabolite intermédiaire du cholestérol, peut servir de ligand au récepteur ER α et ainsi contribuer à l'augmentation de la prolifération, de la migration, de l'invasion et à la stimulation de la Transition Epithélio-Mésencymateuse.

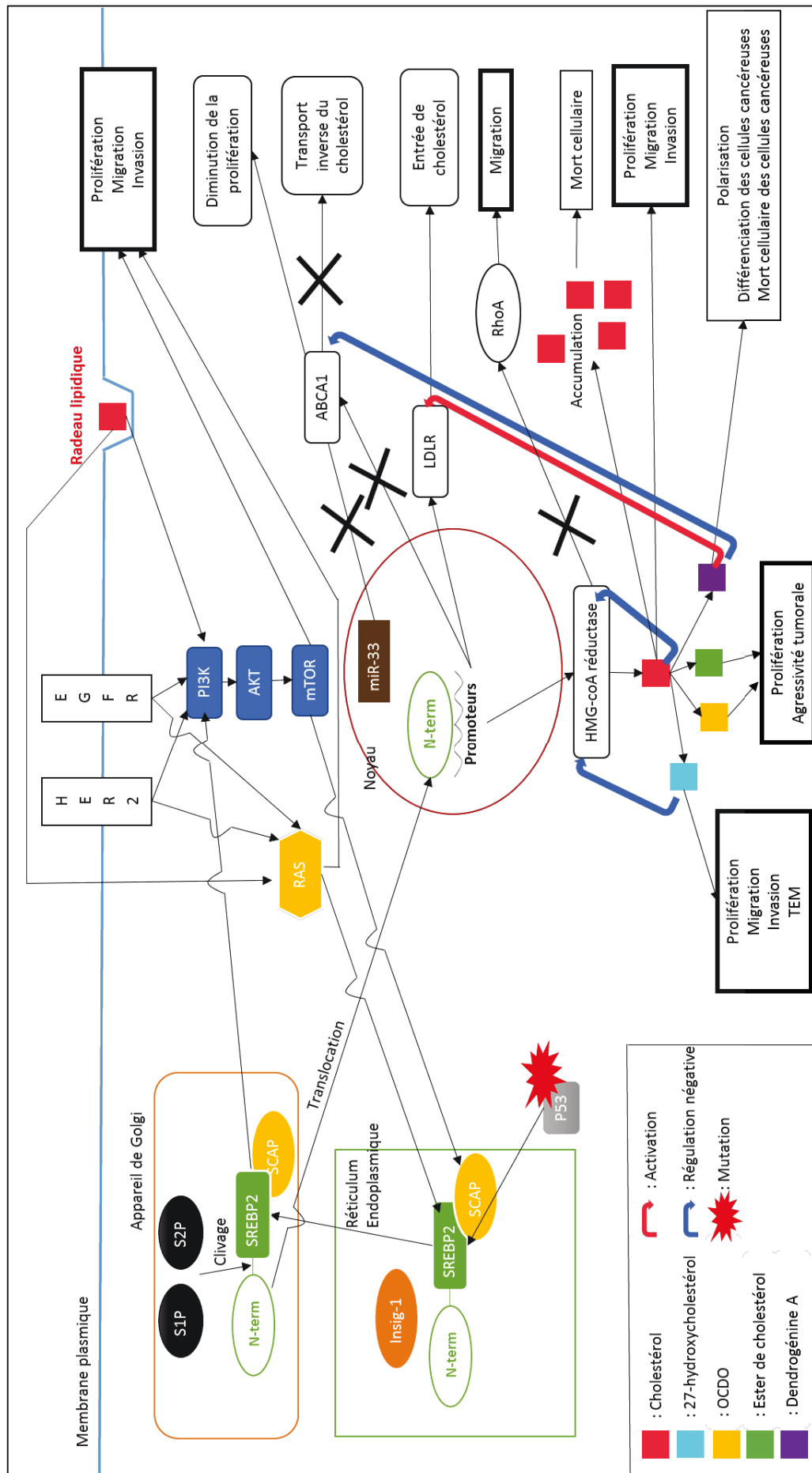


Figure 3 : Principales voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein. Les voies PI3K/Akt/mTOR et RAS/RAF/MAPK, impliquées dans les phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires, peuvent être activées par les récepteurs HER2 ou EGFR. Ce dernier peut être activé par des protéines d'échafaudage comme NHERF1 ou EBP50, sous l'impulsion d'une liaison avec du cholestérol. Liées au cholestérol, NHERF1 ou EBP50 peuvent aussi stimuler la voie Wnt/ β -caténine, qui active la transcription du gène Myc, et ainsi stimule la prolifération. Le cholestérol présent dans les radeaux lipidiques peut contribuer à l'activation des voies PI3K et MAPK. En se liant au récepteur Smoothened, le cholestérol peut activer la voie Hedgehog, qui participe à la différenciation et à la polarisation des cellules mammaires, et stimule la prolifération et l'invasion. Le 27-hydroxycholestérol, qui est un métabolite intermédiaire du cholestérol, peut servir de ligand au récepteur ER α et ainsi contribuer à l'augmentation de la prolifération, de la migration, de l'invasion et à la stimulation de la Transition Epithélio-Mésencymateuse.

5) La cavéoline-1

a. Fonctions in vivo

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique riches en sphingolipides et en cholestérol que l'on retrouve dans la plupart des types cellulaires, mais plus particulièrement dans les adipocytes, les cellules de muscle lisse, et les cellules endothéliales. Elles mesurent 50 à 100nm et ont été découvertes en 1955 par Yamada [258]. Trois principales protéines forment ces domaines : les cavéolines 1, 2, et 3 [259]. Cependant, la présence de la cavéoline-1 ne se cantonne pas qu'aux radeaux lipidiques, elle est aussi retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi, et au niveau de vésicules de transport dérivées de l'appareil de Golgi [260]. La cavéoline-1 est exprimée dans tous les types cellulaires. Néanmoins, en fonction du type de cellule, elle se présente sous sa forme soluble dans le cytoplasme ou sous sa forme sécrétée [261]. Néanmoins, elle est retrouvée en majorité dans les adipocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules du muscle lisse, et certaines cellules épithéliales. Son expression est liée à celle de la cavéoline-2 (d'ailleurs, sans cavéoline-1, la cavéoline-2 n'est pas retrouvée au niveau de la membrane plasmique comme elle devrait l'être), mais pas à celle de la cavéoline-3, qui est surtout exprimée dans les cellules de muscles lisses striés [262]. Sans cavéoline-1, la formation de cavéoles n'est pas possible [263 , 264] (comme le montrent les expériences de Razani et al. [265], dans lesquelles les souris knockout *Cav1^{-/-}* ne possèdent plus de cavéoles). Cependant, cela n'est vrai que dans les cellules non musculaires, car dans ces dernières c'est la cavéoline-3 qui joue ce rôle.

Les cavéoles sont de véritables centres de commande au sein de la cellule : ils recrutent ou piègent des molécules de signalisation en leur sein, où elles peuvent ensuite être activées rapidement en réponse à un stimulus externe. C'est souvent directement via une liaison à la cavéoline-1 que sont emprisonnées les molécules à l'intérieur des cavéoles. En effet, cette protéine possède un domaine hydrophobe de 20 résidus dit « scaffolding domain » qui peut se lier à différentes molécules de signalisation parmi lesquelles H-Ras, c-Src, le récepteur à insuline, ou bien encore l'endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Cela peut résulter en l'activation ou au contraire l'inactivation de certaines voies de signalisation, et en cela il est possible d'imaginer que la cavéoline-1 puisse être impliquée dans le développement des cancers [259].

En plus de son implication dans la régulation de certaines voies de signalisation, les cavéoles participent aussi au transport de vésicules et au phénomène d'endocytose. En effet, au niveau des cavéoles se trouvent des protéines qui sont nécessaires à la formation, l'ancrage ou la fusion des vésicules de transport, comme par exemple les protéines vSNARE VAMP-2, les GTPases monomériques et trimériques, les annexines II et VI, le NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor et son partenaire protéique α -SNAP) [266], ou bien encore la dynamine, essentielle à la fission des vésicules [267]. Il semblerait aussi que la cavéoline-1 joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. C'est d'ailleurs une protéine qui lie directement le cholestérol, et ce de façon spécifique [268, 269, 270]. La régulation existe dans les deux sens. D'une part, le cholestérol libre est non seulement nécessaire pour assurer la formation des cavéoles [271], mais il peut aussi réguler le promoteur de la cavéoline-1 [272]. D'autre part, les cavéolines peuvent elles aussi jouer sur l'équilibre intracellulaire du cholestérol : avec une cavéoline-1 mutante, le transport du cholestérol est modifié, la quantité de cholestérol libre à l'intérieur de la cellule augmente, et celle au niveau de la membrane plasmique diminue [273]. Frank et al. [274] ont également montré que le fait d'inhiber la cavéoline-1 dans des fibroblastes de souris ou dans des macrophages réduisait la quantité de cholestérol libre mais augmentait légèrement la quantité d'esters de cholestérol (ce qui s'avère aussi vrai dans des modèles de souris dans lesquels on éteint la cavéoline-1). Selon cette étude, ces deux phénomènes passaient en partie par une diminution de la synthèse de cholestérol et par une augmentation de la synthèse d'esters de cholestérol. Les cellules sans cavéoline-1 voyaient s'élever leurs niveaux de SREBP-1 dans sa forme complète, et au contraire baisser leurs niveaux de SREBP-1 dans sa forme nucléaire active, ce qui tend à suggérer que les niveaux de cholestérol augmentaient au niveau du Réticulum Endoplasmique. Frank et al. ont également remarqué que la cavéoline-1, qui normalement n'est que peu exprimée dans les macrophages, est surexprimée lorsque ces derniers sont chargés en cholestérol (en utilisant du LDL acétylé). Le transporteur ABCA1 est lui aussi surexprimé dans ce même cas, que les cellules possèdent ou non une cavéoline-1 active. L'expression de SRB1 ou de ABCG1, en revanche, n'est pas modifiée par une déficience de la cavéoline-1, ce qui laisse supposer que le mécanisme d'action de la cavéoline-1 passe par ABCA1, mais ni par SRB1, ni par ABCG1. Il faut aussi noter que le transport inverse du cholestérol effectué par les HDL n'était pas impacté par l'inhibition de la cavéoline-1, mais que celui médié par l'apoA-I était légèrement diminué en conditions basales (c'est-à-dire, lorsque les macrophages n'étaient pas artificiellement chargés en cholestérol) : il est donc possible que la cavéoline-1 influe sur l'expression de ABCA1 et en cela régule le transport du

cholestérol médié par l'apoA-I. Des études plus anciennes faisaient d'ailleurs émerger dès 1995 cette implication des cavéoles dans le transport inverse du cholestérol [275 , 276]. Les cavéoles pourraient également participer à l'entrée des esters de cholestérol via SR-B1[277 , 278]. Il a également été montré que la sortie de cholestérol était accentuée dans des cellules HepG2 dans lesquelles avait été induite l'expression de la cavéoline-1, que l'expression de ABCA1 est augmentée dans les cellules endothéliales dans lesquelles on surexprime la cavéoline-1 (ce qui là aussi résulte en une stimulation de la sortie de cholestérol), et qu'au contraire, inhiber l'expression de la cavéoline-1 diminue l'expression de ABCA1 ainsi que la sortie de cholestérol [279 , 280]. Ce rôle dans la régulation des quantités de cholestérol pourrait expliquer l'effet de la cavéoline-1 dans les athéroscléroses : en effet, il a été montré que des souris *apoE*^{-/-} déficientes en cavéoline-1 voyaient leur niveau de cholestérol non-HDL se multiplier par deux, et étaient moins sensibles aux phénomènes d'athérosclérose [281]. Eteindre la cavéoline-1 dans des modèles de souris induit par ailleurs de profonds changements métaboliques au niveau lipidique : les souris concernées sont notamment résistantes à l'obésité induite par l'alimentation, stockent moins de lipides au niveau des adipocytes, accumulent des triglycérides, et absorbent moins les lipides [282]. Mais les conséquences sur la santé de ces souris ne s'arrêtent pas là : elles tendent également à souffrir de fibroses pulmonaires, d'hypertension, et d'hypertrophie cardiaque [283].

b. Un gène suppresseur de tumeur ?

Si l'on considère souvent la cavéoline-1 comme un gène suppresseur de tumeur, c'est parce qu'elle est responsable de l'inactivation de certaines protéines qui participent au phénotype cancéreux en stimulant la prolifération et la survie cellulaire [259]. Ces suspicions ont commencé en 1989, lorsque Glenney a découvert qu'une protéine de 22kDa, qui n'était pas encore connue sous ce nom mais qui s'avèrera être la cavéoline-1, était phosphorylée au niveau des tyrosines dans des fibroblastes transformés en cellules de sarcome [284]. Quelques années plus tard, Koleske et al. [285] montraient qu'en surexprimant certains oncogènes dans des cellules NIH 3T3, ils réduisaient les niveaux de cavéoline-1 dans la cellule (et ainsi faisaient disparaître les cavéoles de la membrane plasmique), et que plus les niveaux de cavéoline-1 diminuaient et plus les cellules formaient de grosses colonies sur agar. Inhiber l'expression de la cavéoline-1 avec un ARN antisense permet également de conférer aux cellules NIH 3T3 un phénotype cancéreux, en leur faisant perdre leur capacité d'inhibition de

contact, en stimulant leur prolifération, et en provoquant la croissance de tumeurs *in vivo* dans des modèles murins immunodéficients [285]. Dans cette même étude, Galbiati et al. proposent un mécanisme d'action en constatant que les cellules privées de l'expression de la cavéoline-1 suractive la voie de signalisation p42/p44/MAPK, ce qui suggère que le rôle anticancéreux de la cavéoline-1 passerait par une régulation négative de l'activation de cette voie. Cela ne semble pourtant pas être le seul mécanisme en jeu. En effet, Razani et al. [286] ont montré que l'expression de la cavéoline-1 était diminuée dans des cellules cancéreuses du poumon et des cellules cancéreuses cervicales, mais selon leurs travaux, c'est le gène E6 du papillomavirus humain qui induit cette sous-expression, en passant par une inactivation de p53. Park et al. [287], quant à eux, ont montré que l'activation de la protéine Myc entraînait une inhibition de l'expression de la cavéoline-1 au niveau transcriptionnel, et que le fait de réexprimer la cavéoline-1 dans ces cellules était suffisant pour supprimer le caractère malin conféré à des cellules NIH 3T3 par la protéine Myc.

Il est également à noter que les cellules cancéreuses résistantes aux traitements (phénomène de « Multi Drug Resistance ») présentent généralement des changements au niveau de leur membrane plasmique, notamment au niveau de la composition lipidique, des quantités de cholestérol, et des radeaux lipidiques. Elles expriment ainsi généralement plus la cavéoline-1 et la cavéoline-2, et possèdent par conséquent plus de cavéoles [288]. Par ailleurs, l'expression de la cavéoline-1 est inversement corrélée aux niveaux de cycline D1, responsable de la transition de la phase G1 à la phase S dans le cycle cellulaire [289]. Enfin, si les souris knockout *Cav1*^{-/-} sont viables et ne forment pas de tumeurs de façon spontanée [265 , 290], elles deviennent tout de même plus sensibles aux agents cancérigènes (exposés à ces dernières, elles forment des tumeurs beaucoup plus facilement que des souris témoins, [291]).

c. Quelles implications dans le cancer du sein ?

Elsheikh et al. [292] ont analysé avec une micropuce l'expression de la cavéoline-1 et de la cavéoline-2 dans 880 échantillons de cancers du sein invasifs par immunochimie : la cavéoline-1 a été retrouvée dans 13,4% des cas, et la cavéoline-2 dans 5,9% des cas. L'expression de ces deux protéines était associée au stade histologique, et se retrouvait plus souvent dans des cas de cancers du sein ER-négatifs et PR-négatifs. Aucune association n'a

été mise en évidence, en revanche, entre l'expression de la cavéoline-1 et la survie des patientes. Sloan et al. [293] ont analysé l'expression de la cavéoline-1 dans des modèles de souris aux cancers du sein métastatiques et ont rapporté qu'elle était sous-exprimée dans les tumeurs qui se propageaient le plus en métastases, et au contraire très exprimée dans les tumeurs non métastatiques. Sloan et al. ont ensuite transfecté les cellules cancéreuses mammaires 4T1.2 (qui sont hautement métastatiques) avec la cavéoline-1 et ont montré que cela n'impactait pas la vitesse de prolifération, réduisait la capacité à former des colonies sur agar, inhibait l'invasion, et inhibait la migration cellulaire stimulée par la laminine. En injectant ces cellules transfectées dans des souris immunodéficientes, Sloan et al. ont constaté que cela réduisait la vitesse de croissance tumorale et la taille des tumeurs, et atténuait le phénomène de métastase. Les mêmes auteurs, quelques années plus tard, ont cette fois utilisé des tissus mammaires sains ou malades pour vérifier l'expression de la cavéoline-1 par immunocoloration [294]. En ce qui concerne les échantillons de tissus sains, il ressort de leurs analyses que la cavéoline-1 se trouvait au niveau des fibroblastes du stroma et des cellules myoépithéliales qui se trouvaient sous la couche des cellules épithéliales luminales, au niveau des adipocytes, et au niveau des cellules endothéliales vasculaires, mais aucune expression de la cavéoline-1 n'a été retrouvée au niveau des cellules épithéliales luminales. 63% des échantillons cancéreux, n'exprimaient pas la cavéoline-1, 30% ne l'exprimaient que faiblement, et seulement 7% l'exprimaient fortement. Les cellules épithéliales tumorales qui exprimaient le plus la cavéoline-1 étaient celles qui étaient à un stade TNM le moins avancé, mais le niveau d'expression de la cavéoline-1 dans ces cellules épithéliales ne s'est pas révélé être un bon indicateur de la survie à 5 ans (77% des patientes sans cavéoline-1 ont survécu, 79% des patientes l'exprimant faiblement, et 88% des patientes l'exprimant fortement). En revanche, la présence ou non de cavéoline-1 dans le microenvironnement de la tumeur s'est avéré plus intéressante : l'expression de cavéoline-1 au niveau du stroma était associée à des tumeurs de taille plus importante et à un stade plus avancé, et la survie à 10 ans était significativement améliorée pour les patientes qui exprimaient la cavéoline-1 au niveau du stroma (91% des patientes, contre 43%, comparé par un test du log-rank ; RR = 0,088 [0,03 – 0,23] par analyse multivariée). Sloan et al. ont également utilisé des souris knockout *Cav1*^{-/-}, et ont constaté que l'absence de cavéoline-1 au niveau du stroma ne suffisait pas à provoquer la formation de tumeurs mammaires de façon spontanée, accélérât de façon significative le délai d'apparition de la tumeur et la vitesse de croissance tumorale, et n'impactait pas le phénomène de métastase. Fiucci et al. [295], quant à eux, ont transfecté des cellules MCF-7 avec la cavéoline-1 et ont constaté que cela diminuait la prolifération cellulaire ainsi que la

capacité des cellules à former des colonies sur agar, mais que la survie cellulaire n'était pas impactée (au contraire, l'expression de la cavéoline-1 inhibait l'anoikis). L'expression de la cavéoline-1 permettait aussi d'inhiber l'invasion des cellules MCF-7. Le mécanisme proposé par Fiucci et al. implique la voie ERK1/2, qui serait inhibée par la cavéoline-1.

6) Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)

La transition Epithélio-Mésenchymateuse est un phénomène biologique normal qui se produit durant le développement embryonnaire, la régénération tissulaire, la cicatrisation, ou bien encore lors du développement de la fibrose d'organes. La TEM est, comme son nom l'indique, la transformation (ou dédifférenciation) d'une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse [296]. Dans le cas du cancer, ce mécanisme normal est piraté, détourné à leur avantage par les cellules cancéreuses. Sans réaliser une transition complète, les cellules cancéreuses deviennent des cellules hybrides, exprimant à la fois des marqueurs d'un phénotype épithélial et des marqueurs d'un phénotype mésenchymateux, ce qui les rend aptes à se déplacer en groupe, plus résistantes à l'apoptose, et de manière générale, plus agressives [297].

a. Principes généraux

Il existe trois cas physiologiques dans lesquels a lieu la Transition Epithélio-Mésenchymateuse, avec des mécanismes légèrement différents. Le premier type de TEM concerne l'embryogénèse, la gastrulation et la formation de la crête neurale, le deuxième type concerne la cicatrisation et la régénération de tissus ou d'organes, et le troisième et dernier type est celui qui est impliqué dans le cancer. Les cellules épithéliales s'organisent soit en une couche unique de cellules, soit en un tissu multicouche. Elles se caractérisent par une polarité apicale-basale, sont capables d'adhérer et peuvent communiquer entre elles grâce à des jonctions spécialisées intercellulaires. En étant positionnées à la base d'une membrane et en interagissant notamment avec les intégrines, elles aident à dessiner les frontières des différents tissus et organes [298]. De par leur plasticité tissulaire, les cellules épithéliales peuvent subir la TEM dans un sens ou dans l'autre, et ce, un grand nombre de fois. Le processus de TEM est un processus bien conservé. Dans tous les cas, physiologiques ou pathologiques, il passe

par la dissolution des jonctions cellulaires épithéliales, la perte de la polarité apicale-basale, l'acquisition d'une polarité avant-arrière, une réorganisation de l'architecture du cytosquelette, et des changements de morphologie cellulaire. D'un point de vue moléculaire, les cellules en transition perdent l'expression des gènes impliqués dans le phénotype épithélial et activent l'expression des gènes impliqués dans le phénotype mésenchymateux. Tout cela aboutit à une augmentation des protrusions cellulaires, favorise la motilité cellulaire, et confère parfois à la cellule des propriétés de dégradation de la matrice extracellulaire qui permettent l'invasion. Les cellules qui subissent la TEM deviennent aussi résistantes à la sénescence et à l'apoptose [299 , 300].

Au commencement de la TEM, les jonctions cellulaires sont déstructurées et les protéines de jonction sont ensuite relocalisées et/ou dégradées. Lorsque les jonctions serrées sont dissoutes, l'expression de la claudine et de l'occludine diminue, et lorsque les jonctions adhérentes sont détruites, l'E-cadhérine (« Epithéliale-cadhérine ») est clivée au niveau de la membrane plasmique, puis dégradée. La β -caténine ne peut alors plus s'y fixer, et celle-ci est donc soit dégradée, soit au contraire préservée de la dégradation lorsqu'elle participe à la voie de signalisation Wnt. En conséquence, la caténine p120 s'accumule dans le noyau. Son expression diminue lorsque l'expression de l'E-cadhérine diminue (ce qui corrèle par ailleurs avec la progression tumorale) [301]. Les jonctions gap et les desmosomes sont également déstabilisées en raison de la diminution de l'expression des connexines. Plus la TEM progresse et plus la transcription des protéines de jonction est réprimée [298].

Le phénomène suivant la dissolution des jonctions est la réorganisation du cytosquelette. De nouvelles projections de membranes, riches en actine, se mettent en place pour favoriser la motilité cellulaire. Parmi ces extensions, on trouve les lamellipodes, à l'extrémité desquels se trouvent les filopodes, et les invadopodes. Ces derniers sont capables de dégrader la matrice extracellulaire, ce qui permet l'invasion [302 , 303]. Les fibres de stress, riches en actine, se forment davantage pendant la TEM. Les cellules font également preuve de plus de contractilité. Toute cette réorganisation du cytosquelette se déroule sous la régulation de protéines telles que la moésine, mais les processus moléculaires sous-jacents ne sont pas encore parfaitement connus [304]. Il semblerait que les GTPases de la famille de Rho interviennent dans la régulation des changements concernant l'actine : RhoA stimule la formation des fibres de stress, et RAC1 et CDC42 activent la formation des lamellipodes et des filopodes. Après activation des GTPases Rho au début de la TEM, les ROCK (« Rho-associated kinase ») travaillent de concert avec DIA1 (« diaphanous 1 ») pour permettre la

polymérisation de l'actine et la phosphorylation des chaînes légères de myosine, ce qui augmente la contractilité de ces dernières [305]. L'activation de RAC1 ou de CDC42 active aussi la PAK1 (« p21 activated kinase »), elle-même responsable de l'activation de protéines impliquées dans la motilité et la propagation cellulaires [306]. Par ailleurs, la p120 caténine inhibe l'activité des GTPases Rho. Comme elle n'est plus exprimée pendant la TEM, ce phénomène peut constituer un autre mécanisme par lequel les GTPases Rho sont activées pendant la TEM [307].

La polarité apicale-basale des cellules épithéliales est assurée par des complexes protéiques comprenant des protéines « partitioning-defective » (PAR6 et PAR3), et l'atypical protein kinase C (aPKC), par des complexes Crumbs, par des protéines PALS1 (« protein associated with Lin-7 1 ») et par des protéines PATJ (« PALS1-associated tight-junction protein »). Toutes ces protéines se situent du côté apical et sont en association avec les jonctions serrées. De l'autre côté, les complexes protéiques Scribble, constituées des protéines SCRIB (« Scribble »), DLG (« Discs large »), et LGL (« lethal giant larvae »), définissent le compartiment basal [308]. La perte des jonctions durant la TEM a donc comme suite logique immédiate la perte de cette polarité. La perte de l'expression de la E-cadhérine empêche SCRIB d'interagir avec la membrane plasmique latérale (et la diminution de l'expression de la E-cadhérine ou de SCRIB aboutit à une perte progressive de l'adhésion et à une augmentation de la motilité) [309 , 310]. Renforçant cette perte de polarité, l'expression de certains complexes protéiques polarisants comme CRB3 ou LGL2 est réprimée [311]. Ensuite, les complexes PAR et Scribble ainsi que la protéine PATJ se relocalisent à l'avant de la cellule, où RAC1 et CDC42 activent la polymérisation de l'actine et la formation des protusions membranaires, tandis que RhoA se dirige au contraire à l'arrière de la cellule pour favoriser la déstructuration des complexes d'adhésion. La voie PI3K est au cœur de la repolarisation de la cellule : c'est elle qui recrute les protéines CDC4 et RAC à l'avant de la cellule. Ensuite, la polarité avant-arrière est maintenue en l'état par un mécanisme de rétrocontrôle impliquant des protéines de polarisation et des GTPases. Les GTPases de la famille Rho interviennent aussi dans la réorganisation et la polymérisation des microtubules, dans le regroupement des intégrines à l'avant de la cellule (Rac1), et dans la relocalisation de PAR3 et aPKC (« atypical Protein Kinase C ») à l'avant de la cellule (PATJ, PALS1). Dans le même temps, à l'arrière de la cellule, RhoA inhibe l'activation de Rac1 et empêche ainsi la formation de complexes PAR [312].

D'un point de vue génétique et transcriptionnel, la TEM se caractérise surtout, comme nous l'avons déjà mentionné, par une diminution de l'expression de la E-cadhérine (de façon à déstabiliser les jonctions adhérentes). La transcription de la claudine et de l'occludine sont également inhibées (pour déstabiliser les jonctions serrées au niveau apical), tout comme celles de la desmoplakine et de la plakophiline (de façon à déstabiliser les desmosomes) [298]. En plus de déstructurer les jonctions déjà présentes, cela empêche aussi la formation de nouvelles jonctions [299]. En parallèle est activée la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion mésenchymateuse, et en particulier la N-cadhérine [313]. Les cellules perdent ainsi leur association avec les cellules épithéliales et voient augmenter leur affinité pour les cellules mésenchymateuses. Ces dernières adhèrent entre elles via des interactions N-cadhérine, qui sont moins solides que les interactions E-cadhérine et qui permettent donc la migration et l'invasion [314]. La N-cadhérine interagit également avec certaines molécules de signalisation, des récepteurs tyrosine kinases, et des facteurs de croissance [315]. Au niveau du cytosquelette, la composition des filaments intermédiaires est modifiée, pilotée par la répression de l'expression de la cytokératine, et l'activation de celle de la vimentine [298]. Le rôle des filaments intermédiaires est important car pour une composition donnée, ce ne sont pas les mêmes molécules qui sont recrutées à la membrane : la cytokératine dirige l'E-cadhérine vers la membrane plasmique, la vimentine, non [299, 316]. La vimentine interagit en revanche avec des protéines motrices, ce qui stimule la motilité [317]. L'expression des intégrines est également impactée par la TEM. En effet, tandis que la TEM progresse, la matrice extra-cellulaire est remodelée, et les cellules, au lieu de communiquer avec une membrane basale, communiquent avec une autre matrice extracellulaire : certaines intégrines sont donc inactivées (notamment $\alpha 6 \beta 4$, qui permet l'interaction avec la membrane basale) tandis que d'autres sont activées (notamment $\alpha 3 \beta 1$, qui permet de stimuler certaines voies de signalisation et participe ainsi à l'avancée de la TEM, $\alpha 5 \beta 1$, qui stimule la migration, $\alpha 1 \beta 1$ et $\alpha 2 \beta 1$, qui permettent de perturber les complexes E-cadhérine en interagissant avec le collagène de type I, ou $\alpha v \beta 6$, qui active le facteur de différenciation TGF β) [318, 319, 320]. Pour stimuler l'invasion, l'expression des métalloprotéinases MMP2 et MMP9 est activée [321]. Les MMPs peuvent également contribuer à la perte du domaine extracellulaire de la E-cadhérine, ce qui conduit à la perte des jonctions adhérentes, et MMP3 stimule l'expression de Rac1, ce qui augmente la quantité intracellulaire de radicaux libres et ainsi stimule l'expression du facteur de transcription SNAIL1) [322]. En plus de SNAIL1, d'autres facteurs de transcription sont associés à l'EMT : TWIST et ZEB1 (« zinc-finger E-box-binding 1 ») [299]. SNAIL1 et SNAIL2 se lient

aux séquences ADN « E-box » pour réprimer l'expression de certains gènes épithéliaux (la E-cadhérine ou l'occludine, notamment), en recrutant le complexe protéique PRC2 (« Polycomb repressive complex 2 ») qui éteint les gènes par méthylation et acétylation. SNAIL1 peut aussi activer l'expression des MMP9 [323]. TWIST1 va lui aussi empêcher l'expression de la E-cadhérine, et augmenter celle de la N-cadhérine, par des mécanismes qui sont indépendants de l'action de SNAIL1 [299]. ZEB1 et ZEB2 agissent comme SNAIL et TWIST, en se liant aux « E-boxes ». Souvent, l'expression de ZEB est consécutive à celle de SNAIL (et SNAIL1 et TWIST1 induisent ensemble l'expression de ZEB) [324].

L'activation de la TEM peut passer par différents mécanismes. Ainsi, la TEM peut être induite par la famille des protéines TGF β , qui ont plusieurs mécanismes d'action possible : soit elles activent le complexe protéique SMAD, qui lui augmente à la fois l'expression et l'activité de SNAIL, soit elle stimule les voies PI3K ou MAPK [325 , 326]. La TEM peut également être induite par les récepteurs tyrosine kinase : cela comprend la voie PI3K/Akt, la voie MAPK, ou bien encore une signalisation passant par les FGFs (Fibroblast Growth Factors), les HGFs (Hepatocyte Growth Factors), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), les EGF (Epidermal Growth Factors) ou les PGF (Platelet Growth Factors). Il est également possible que les voies Wnt, Hedgehog et Notch participent dans certaines conditions à l'initiation de la TEM [299].

b. La TEM dans le cancer

Si la TEM est un processus biologique normal qui se produit à des moments clés de la vie d'une cellule, elle est aussi, en étant un pilier du phénomène de métastase, l'un des marqueurs du phénotype cancéreux. Les voies de signalisation qui pilotent la TEM sont des voies de signalisation qui participent activement au développement du cancer (PI3K, MAPK, Wnt), ce qui constitue déjà en soi un lien logique entre les deux phénomènes.

D'une part, il a été montré que stimuler artificiellement la TEM induit dans la cellule des propriétés oncogéniques. Ainsi, exprimer SNAIL1 suffit à induire la TEM de cellules cancéreuses mammaires, et ainsi à provoquer la récurrence dans un modèle murin. SNAIL1 dont, par ailleurs, l'expression est aussi associée à une faible survie des patients atteints d'un cancer du sein, du côlon ou encore des ovaires, et dont la présence a été retrouvée à l'avant des cellules cancéreuses colorectales [327 , 328 , 329]. Inhiber SNAIL1, au contraire, permet

de stopper l'invasion et la croissance tumorale [330]. D'autre part, dans la plupart des cancers d'origine épithéliale est constatée une perte d'expression de la E-cadhérine, ce qui se traduit par une perte de l'adhésion médiée par l'E-cadhérine au fur et à mesure que les cellules deviennent métastatiques [331]. Moins l'E-cadhérine est exprimée et plus les tumeurs sont de haut grade [332 , 333 , 334]. Enfin, il a été remarqué dans différents types cellulaires, et notamment dans le cas du cancer du sein, des changements d'organisation du cytosquelette qui s'apparentent à ceux de la TEM, et qui sont corrélés à l'agressivité des cellules cancéreuses [335]. C'est le cas par exemple de l'augmentation de l'expression de la vimentine [336].

7) Les apolipoprotéines A-I et E

Les apolipoprotéines constituent une partie protéique essentielle des lipoprotéines circulant dans le sang. Associées à des phospholipides, du cholestérol libre, des esters de cholestérol et des triacylglycérols, elles forment les lipoprotéines. Il existe une douzaine d'apolipoprotéines, classées en cinq types principaux (A, B, C, D, et E) qui peuvent eux-mêmes être découpés en sous-types [337].

a. Généralités sur le métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol est un enchevêtrement de mécanismes complexes, tous en équilibre les uns avec les autres pour maintenir une certaine homéostasie, s'articulant autour de quatre grands axes : la synthèse, l'absorption, le transport et l'élimination.

Le cholestérol peut être synthétisé *de novo*, ou absorbé via l'alimentation. La synthèse *de novo* représente deux tiers du cholestérol total (800 – 1000 mg/jour, contre 300 – 400mg/jour seulement en provenance de l'alimentation). Il est synthétisé par tous les types cellulaires, mais principalement par les hépatocytes et les entérocytes, faisant du foie l'organe majeur et central du métabolisme du cholestérol [338 , 339]. D'autres part, le cerveau contient environ un quart du cholestérol non estérifié dans le corps humain [340]. Dans ce cas, la majorité du cholestérol du cerveau y est synthétisée. Au cœur de la synthèse de cholestérol se trouve un facteur de transcription : SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2),

qui régule la transcription de plusieurs gènes dont les protéines jouent un rôle essentiel dans le métabolisme du cholestérol parmi lesquels la HMG-CoA réductase (HMGCR), la HMG-CoA synthase (HMGCS), la mévalonate kinase (MVK), et le LDLR [341]. SREBP2 est située dans le Réticulum Endoplasmique (RE). Structurellement, c'est une protéine transmembranaire à deux hélices. Le domaine N-terminal constitue le domaine actif, celui qui, une fois transporté dans le noyau, se lie aux séquences Sterol Regulatory Element (SRE) pour activer la transcription, notamment, des gènes cités précédemment. Dans le RE, SREBP2 est associé avec la protéine SCAP (« SREBP cleavage-activating protein ») et la protéine Insig-1 (« Insulin-induced gene protein-1 »). Lorsque les niveaux de cholestérol sont faibles, le complexe SCAP-SREBP2 est dissocié de Insig-1, qui est ubiquitinyllé pour être éliminé [342]. Sar1, une GTPase, enferme alors le complexe SCAP-SREBP2 dans des vésicules recouvertes de la coat protein II (COPII) qui permettent de le transporter du RE jusqu'à l'appareil de Golgi [343]. Là, SREBP2 est clivé par deux protéases (S1P et S2P), ce qui libère son domaine N-terminal [344 , 345]. Activer la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse et l'absorption du cholestérol n'est pas le seul mécanisme par lequel SREBP2 régule le métabolisme du cholestérol : il peut aussi inhiber la transcription du transporteur ABCA1 (en se liant au niveau de la E-box du promoteur du gène codant pour ABCA1), ce qui permet de limiter le phénomène de transport inverse du cholestérol, et miR-33, qui est un micro-ARN situé dans un intron du gène codant pour SREBP2 et qui est co-transcrit avec lui, peut lui aussi bloquer les phénomènes d'exportation du cholestérol en bloquant la transcription du transporteur [346 , 347].

La synthèse de cholestérol est longue et complexe. Elle implique plus de trente réactions enzymatiques, que nous tenterons de résumer brièvement ici, dont l'acétate est le précurseur initial. Au cours de la première réaction, deux molécules d'acétate sont condensées par la thiolase pour former l'acétyl-coA. Ce dernier est ensuite associé à une troisième molécule d'acétate pour donner la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA coenzyme A (HMG-CoA), sous l'action de la HMG-CoA synthase. C'est alors au tour de la HMG-CoA réductase d'intervenir : elle transforme la HMG-CoA en mévalonate, puis ce dernier subit différentes réactions jusqu'à devenir l'isopentenyl pyrophosphate [348]. Six molécules d'isopentenyl pyrophosphate sont par la suite condensées pour former le squalène. Les dernières étapes incluent la cyclisation du squalène, avant sa conversion finale en cholestérol via plusieurs réactions [349 , 350]. De toutes les enzymes impliquées, c'est la HMG-CoA réductase qui est considérée comme l'enzyme limitante. Sans elle, la synthèse s'arrête. Le cholestérol et le

mévalonate régulent son activité de manière allostérique. D'autre part, certains précurseurs et d'autres molécules dérivées du cholestérol sont d'ailleurs capables de réguler cette enzyme : le lanostérol, le 24,25-dehydrolanostérol, le 27-hydroxylanostérol, le 7-céto-cholestérol, le 25-hydroxycholestérol ou le 27-hydroxycholestérol, par exemple, peuvent induire l'ubiquitinylation de cette enzyme afin d'entraîner sa dégradation, tout cela sans nécessiter l'action de SREBP2 [351 , 352]. Certains oxystérols peuvent aussi, parfois, se lier à Insig-1 pour empêcher le transport du complexe SCAP-SREBP2 depuis le RE jusqu'à l'appareil de Golgi [353].

Lorsqu'au contraire, les niveaux de cholestérol sont élevés, Insig-1 reste associée au complexe SCAP-SREBP (car SCAP subit des changements de conformation qui favorisent sa liaison à Insig-1, notamment au niveau de son domaine sensible aux stérols), et ce trio reste piégé au sein du RE. Ainsi stabilisée par SCAP, Insig-1 n'est ni ubiquitinylée, ni dégradée [354]. Le cholestérol (tout comme le 25-hydroxycholestérol), lorsqu'il est présent au niveau de la membrane du RE, inhibe la liaison de protéines coat à SCAP (en se liant à SCAP, il modifie sa structure, ouvrant sa conformation pour faciliter sa liaison à Insig-1, ce qui rend impossible la liaison des protéines coat), ce qui empêche la formation des vésicules recouvertes de COPII, et ainsi bloque le complexe dans le RE [343]. Il existe un autre mécanisme qui peut inhiber la fonction d'activateur transcriptionnel de SREBP2 : Rnfl45, qui est à la fois une ubiquitine E3 ligase et une cible du récepteur LXR, peut provoquer l'ubiquitinylation de SCAP au niveau de deux résidus lysine situés tout près du site de liaison aux vésicules recouvertes de COPII, ce qui, là encore, aboutit à piéger SREBP2 dans le RE [350, 355]. Sans SREBP2, ni les gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol, ni ceux codant pour les protéines impliquées dans l'absorption du cholestérol, ne sont transcrits.

L'organisme dispose de plusieurs façons d'absorber le cholestérol, certaines se servant de ses propriétés de solubilité (relargage des stérols via des micelles), d'autres requérant l'action de certaines protéines [356]. L'absorption du cholestérol est régulée au niveau de l'intestin grêle par la protéine Niemann–Pick-C1-like-1 (NPC1L1) [357]. Lorsqu'il parvient, ensuite, à l'intérieur de l'entérocyte, le cholestérol est tout d'abord estérifié avec un acide gras par l'enzyme SOAT2 (« Stérol O-Acyl Transférase 2 ») dans le RE [358]. Ce réflexe de la cellule vise à éviter une accumulation de cholestérol, qui à terme serait toxique pour elle. Les esters de cholestérol sont ensuite incorporés dans des chylomicrons puis transportés jusqu'au Golgi pour y être modifiés avant d'être en grande partie sécrétés et libérés dans la circulation

par le canal thoracique, et en petite partie transportés vers la lumière intestinale par des transporteurs comme ABCG5 ou ABCG8 [358, 359 , 360]. Cet ensemble de mécanismes est régulé par le récepteur LXR, qui peut à la fois inhiber NPC1L1, activer ABCG5 et ABCG8, stimuler la sortie de cholestérol en augmentant l'expression de ABCA1, tout cela dans le but, *in fine*, d'éviter à tout prix l'accumulation de cholestérol. On distingue deux isoformes pour ce récepteur : LXR α et LXR β , qui sont toutes deux sensibles à la présence de cholestérol et qui semblent jouer des rôles similaires [361 , 362].

Le transport inverse du cholestérol est le principal mécanisme d'élimination de l'excès de cholestérol cellulaire, notamment au niveau des plaques d'athérosclérose où l'on retrouve des macrophages chargés en cholestérol [363]. En réalité, ce dernier peut sortir des macrophages de trois façons différentes : soit via les transporteurs ABCA1 et ABCG1 (« ATP-binding cassette transporter G1 », dans un seul sens, et selon un mécanisme ATP-dépendant), soit via le récepteur SRB1 (dans les deux sens, selon un mécanisme ATP-indépendant), soit sans intervention du moindre récepteur, mais par simple diffusion. Ce dernier cas représente 30% du flux sortant total de cholestérol [364]. Lorsqu'une grande quantité de cholestérol est absorbée, ou lorsque commencent à s'accumuler de nombreux métabolites du cholestérol, les gènes des protéines impliquées dans le transport inverse du cholestérol sont suractivés. Cela passe notamment par la liaison de certains oxystérols au récepteur LXR, qui va alors s'hétérodimériser avec le récepteur RXR (Retinoid X Receptors) pour aller activer la transcription de *ABCA1* et de *ABCG1* [365]. Les principaux acteurs du transport inverse du cholestérol sont le transporteur ABCA1 et l'apolipoprotéine A-I, et leurs mécanismes d'action seront décrits dans la partie suivante.

b. L'apolipoprotéine A-I

i. Rôles in vivo

En comptant pour 70% de sa composition totale, l'apoA-I est la principale protéine des HDL. On la retrouve dans l'organisme de la plupart des vertébrés, y compris les moins complexes d'entre eux, signe de son importance. Sa synthèse commence dans le foie et l'intestin sous la forme d'un polypeptide de 267 acides aminés, puis elle est sécrétée dans le plasma et clivée pour atteindre sa taille finale de 243 acides aminés. D'un point de vue structural, l'apoA-I est une succession de segments de 22 acides aminés séparés par des

domaines en hélice α . S'adaptant aux besoins de la cellule, l'apoA-I peut se présenter sous trois formes : une forme appauvrie en lipides, une forme discoïdale aplatie pouvant seulement contenir des lipides polaires (phospholipides et cholestérol), et une forme sphéroïde pouvant contenir toutes sortes de lipides [366]. Ce sont les domaines en hélices α qui servent à la liaison aux phospholipides : on sait en effet que l'apoA-I dans sa forme appauvrie en lipides n'est constituée que de 40 à 50% d'hélices α , tandis que sa forme enrichie en lipides en contient environ 75% [367, 368]. La genèse de la particule HDL se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, elle est sous forme de « pre β -1 HDL », qui est en fait principalement constituée de l'apoA-I sous sa forme appauvrie en lipides (10 à 40% seulement), et qui est de 60 à 70 kDa. La forme issue de l'étape suivante de la maturation des HDL, appelée « pre β -2 HDL », est riche en lécithine et contient également de la sphingomyéline et du cholestérol, mais en moindres quantités [366]. La pre β -2 HDL peut ensuite interagir avec le transporteur ABCA1 et le récepteur SRB1 pour s'enrichir en cholestérol et ainsi former la version mature de la particule HDL (α -HDL), tout cela étant catalysé par la Lecithin-cholestérol acyltransférase (LCAT) [369]. Cette dernière estérifie le cholestérol libre en esters de cholestérol, ce qui permet de créer un cœur hydrophobe nécessaire pour conférer aux particules α -HDL leur forme sphérique [370].

La principale fonction de l'apoA-I est de stimuler la sortie de cholestérol. Elle se lie pour cela directement au transporteur ABCA1, dans sa forme pauvre en lipides, pour former un complexe possédant un tunnel hydrophobe qui permet d'accueillir les lipides [371]. ABCA1 se retrouve dans les macrophages, les hépatocytes et les entérocytes. Chambenoit et al. [372] ont montré qu'en utilisant une version mutante déficiente de ABCA1, l'apoA-I ne s'y fixait plus, ce qui signifie que pour que le complexe puisse se former, il est nécessaire que ABCA1 soit fonctionnel. C'est au niveau de l'hélice 10 de l'apoA-I, du côté C-terminal, qu'a lieu la liaison à ABCA1 [373]. En s'y liant, l'apoA-I augmente la demi-vie de ABCA1 (en stimulant la déphosphorylation d'une séquence PEST de ABCA1, ce qui empêche sa dégradation par les calpaines) [374]. En une phrase, l'ABCA1 extrahépatique stimule la sortie de cholestérol depuis les tissus périphériques vers les apolipoprotéines pauvres en lipides, qui sont ensuite en charge de le distribuer au foie où il sera éliminé [375]. Ce processus passe par le récepteur SRB1, qui a une forte affinité pour les HDL riches en lipides, mais une faible affinité pour les apolipoprotéines pauvres en lipides [376]. Ce phénomène, qui a été décrit pour la première fois par Glomset en 1968 [377], se nomme le transport inverse du cholestérol (« Reverse Cholesterol Transport », RCT). Le cholestérol peut en réalité être distribué au foie

de deux façons différentes : soit directement, soit indirectement. Dans le cas d'une distribution directe, ce sont les HDL matures qui interagissent avec SRB1 au niveau du foie pour y transférer leur contenu en cholestérol, avant de retourner dans la circulation plasmatique pour recommencer le processus. Dans le cas d'une distribution indirecte, les HDL matures transfèrent leur cholestérol aux apolipoprotéines B-100 (apo B-100), notamment celles qui sont à la surface des LDL, en échange de molécules de triacylglycérols, ce processus étant catalysé dans un sens comme dans l'autre par la cholesteryl-ester-transfer protein (CETP). Puis ce sont les LDL qui délivrent le cholestérol au foie via le récepteur LDLR [369 , 378 , 379]. Dans le foie, deux devenir possibles pour le cholestérol : soit il est recyclé pour former de nouvelles lipoprotéines, soit il atterrit dans la bile sous forme de cholestérol libre ou sous sa forme dégradée d'acide biliaire. Le cholestérol ainsi présent dans la bile sera réabsorbé par l'intestin puis sécrété avec le cholestérol exogène provenant de l'alimentation dans la lymphe intestinale. Il reviendra ensuite dans le plasma sous une forme de chylomicrons. Les vestiges de chylomicrons sont par la suite éliminés par le foie, et le cholestérol est de nouveau utilisable à des fins métaboliques, ou recyclés sous forme de lipoprotéines plasmatiques [366].

A l'intérieur de la cellule, le métabolisme du cholestérol est très régulé. C'est ce que l'on appelle l'homéostasie du cholestérol, et c'est un phénomène qui est à la fois métastable et dynamique [366]. D'un côté de la balance, l'apport en cholestérol via l'alimentation ou la synthèse *de novo*, et de l'autre, son élimination. La cellule s'adapte en permanence aux changements de ses besoins ou à l'état de son environnement, et le système mis en place est très sensible aux petites variations de concentrations de substrat [366]. Ainsi, quand l'expression de ABCA1 augmente, le flux sortant de cholestérol médié par l'apoA-I est stimulé, ce qui aboutit à une diminution des niveaux de cholestérol cellulaire [380]. Si l'équilibre doit d'autant plus être assuré, c'est également pour se préserver de l'accumulation de cholestérol libre, qui comme nous l'avons déjà mentionné, est toxique. Un exemple de ce phénomène est le suivant : lorsque les macrophages se chargent en cholestérol, le contenu cellulaire en cholestérol augmente, ce qui pousse les macrophages à stimuler la synthèse de phospholipides afin d'augmenter en parallèle le contenu cellulaire en phospholipides et ainsi de maintenir un ratio cholestérol libre/phospholipides au-dessus du seuil de toxicité [381]. En matière de régulation, l'apoA-I n'est pas non plus en reste. Elle est capable de réguler les quantités d'ABCA1 au niveau protéique, sans provoquer de changement au niveau de l'ARNm. En effet, Wang et al. [382] ont montré qu'il existait dans ABCA1 une « séquence

PEST », riche en proline, acide glutamique, sérine, et thréonine, qui provoque la dégradation de cette protéine par la protéase calpain, et que la liaison de l'apoA-I à ABCA1 empêchait cette dégradation (ce qui conduit à une augmentation des niveaux d'ABCA1).

Il a été montré *in vivo* avec des modèles de souris ou de lapins que la surexpression de l'apoA-I diminue le risque d'athérosclérose ([383 , 384 , 385 , 386]), et que cela stimule le transport inverse du cholestérol (ce qui est l'hypothèse principale pour expliquer le premier constat) [387]. Son rôle dans le cancer, en revanche, est encore à établir.

ii. ApoA-I et cancer

Nous avons déjà évoqué les études portant sur le lien entre HDL-cholestérol et le cancer, et l'apoA-I étant la principale protéine des HDL, il serait possible d'extrapoler les conclusions. Cependant, certaines études portent spécifiquement sur l'apoA-I. Sirniö et al. [388], par exemple, ont étudié la corrélation entre les niveaux d'apoA-I et d'apoB dans le sérum et le risque de cancer colorectal en utilisant les données de 144 patients atteints, et ont montré que des niveaux faibles d'apoA-I étaient associés avec des cancers à des stades plus avancés, et que des niveaux élevés d'apoA-I (tout comme un faible ratio apoB/apoA-I) étaient associés à une amélioration de la survie (liée au cancer et globale). Lin et al. [389] ont étudié les niveaux de lipides et de lipoprotéines de 299 patientes atteintes d'un cancer du sein ductal invasif, et de 200 témoins, et ont montré d'une part sur un plan descriptif que les niveaux de HDL et d'apoA-I étaient plus faibles pour les malades que pour les contrôles, et d'autre part sur un plan analytique que des niveaux élevés d'apoA-I étaient associés à une diminution du risque de ce type de cancer du sein (régression multivariée), et que les tumeurs des patientes malades avec des niveaux d'apoA-I plus faibles au moment du diagnostic étaient plus grosses que celles des patientes avec des niveaux élevés (régression univariée). Lin et al. ont également rapporté que les malades avec des niveaux faibles en apoA-I étaient diagnostiquées à des stades plus avancés de la maladie, et étaient associées à une faible survie (sans maladie et globale). Liu et al. [390] se sont interrogés sur le rôle de l'apoA-I comme facteur de risque de la métastase intraoculaire chez les patients souffrant d'un cancer du sein, et ont conclu que l'apoA-I et l'apoB étaient des facteurs de risque de ce phénomène, et que l'apoA-I en était un meilleur prédicteur (en se basant sur les valeurs de l'Area Under the ROC curve).

c. L'apolipoprotéine E

L'apoE a été découverte dans les années 1970. C'est l'une des apolipoprotéines associées aux Very Low Density Lipoprotéines (VLDL), aux Intermediate-Density Lipoprotéines (IDL), aux vestiges de chylomicrons, et à certaines HDL. Il existe trois isoformes de l'apoE, l'apoE3 étant la plus courante, donc considérée comme la forme normale. L'apoE2 ne permet pas de lier les lipoprotéines à leurs récepteurs (car contrairement à l'isoforme normale, elle n'a qu'une très faible affinité pour ces récepteurs) et est par conséquent associée à une hyperlipidémie génétique de type III [391]. Lorsqu'une telle maladie se développe, des lipoprotéines β -VLDL constituées d'apoE riches en triglycérides et en cholestérol s'accumulent dans le plasma, ce qui pourrait contribuer au développement de athérosclérose [392]. L'isoforme apoE4, quant à elle, est un facteur de risque connu de la maladie d'Alzheimer [393], mais il a aussi été montré qu'elle était associée à une augmentation des niveaux de cholestérol dans le sérum et à une augmentation du risque de maladie coronarienne [394 , 395 , 396]. Par rapport à la référence (une homozygotie $\epsilon 3/3$), le fait de posséder l'isoforme apoE2 a tendance à diminuer les niveaux de cholestérol (en moyenne de 14 mg/dl), et l'isoforme apoE4 a tendance à les augmenter (en moyenne de 8mg/dl) [397].

L'apoE est une protéine que l'on retrouve dans différents types cellulaires et au niveau de différents organes (glandes surrénales, reins, adipocytes, rate, macrophages) mais elle est principalement synthétisée par les hépatocytes, puis en second lieu, retrouvée de façon importante au niveau du système nerveux central (où ce sont les astrocytes qui sont majoritairement en charge de sa synthèse). Sous sa forme sécrétée, elle est présente dans le plasma, dans le fluide intestinal, et dans la lymphe. Lorsqu'elle est sécrétée, l'apoE est pauvre en lipides, mais elle en acquiert par la suite, soit au niveau de la surface cellulaire, soit par l'intermédiaire de vésicules sécrétoires [398]. L'une de ses principales fonctions consiste à éliminer les lipoprotéines dont elle est à la surface du plasma en permettant leur liaison à certains types cellulaires via des récepteurs de la famille des LDLR, des VLDLR ou des heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), à l'apoE receptor-2, ou au récepteur gp330 [391], et ainsi à distribuer le cholestérol aux différentes cellules via un phénomène d'endocytose [399 , 400]. L'isoforme apoE4 est principalement retrouvée au niveau de VLDL de grandes tailles et riches en triglycérides, tandis que les isoformes apoE3 et apoE2 se trouvent plutôt au niveau de HDL de petites tailles et riches en phospholipides. C'est au niveau C-terminal de l'apoE que se situe le domaine nécessaire à la liaison des phospholipides [391], qui se présente

comme pour l'apoA-I sous la forme d'hélices α amphipathiques au niveaux desquelles peuvent se lier les lipoprotéines [401]. L'autre fonction majeure de l'apoE concerne le système nerveux central : produite en grande quantité dans le cerveau, l'apoE y est le principal transporteur de lipides. En cas de neuropathie périphérique, par exemple, c'est l'apoE qui est en charge de redistribuer les lipides aux axones en cours de régénération, et aux cellules de Schwann en cours de remyélination [398]. Les autres rôles de l'apoE sont les suivants : maintenir intacte l'intégrité des lipoprotéines, servir de cofacteurs pour certaines réactions enzymatiques, opérer comme ligands pour les récepteurs à lipoprotéines, participer au transport inverse du cholestérol (sous sa forme associée aux HDL) [337 , 400].

Il est établi que des niveaux élevés en LDL-cholestérol sont associés à une augmentation du risque de maladie coronarienne, or il a été montré par Sing et al. [400] que l'apoE est responsable de 8,3% de la variance totale de LDL-cholestérol (bien que certaines études aient calculé des estimations beaucoup plus basses, [402]). Sing et al. ont également rapporté que de tous les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (connus en 1985, année de leur étude), l'apoE était celui qui contribuait le plus à la variabilité des niveaux de cholestérol [400]. Par ailleurs, le transporteur ABCA1 ne se lie pas qu'à l'apoA-I, il se lie aussi à l'apoE [403]. Par conséquent, tout comme l'apoA-I, l'apoE peut elle aussi réguler les niveaux de ABCA1 en empêchant sa dégradation [382].

L'apoE n'est cependant pas seulement impliquée dans la distribution du cholestérol. Dans certains types de cellules, elle participe, tout comme l'apoA-I, à la sortie de cholestérol. Ainsi, dans les macrophages, l'apoE peut stimuler la sortie de cholestérol de deux façons : soit dans sa forme intracellulaire, par un mécanisme indépendant du transporteur ABCA1, soit dans sa forme sécrétée, par un mécanisme dépendant d'ABCA1 et d'ABCG1 [404 , 405]. Plus particulièrement, ce serait l'isoforme apoE3 qui pourrait être impliquée dans ces phénomènes [406]. L'apoE serait si importante pour la sortie de cholestérol qu'une déficience en apoE dans des modèles murins conduit à de sévères hyperlipidémies et à des phénomènes d'athérosclérose [407]. Dans les neurones et les astrocytes, l'apoE (et là encore, plus particulièrement la forme apoE3) participe aussi au transport inverse du cholestérol, par un processus qui implique à la fois une interaction avec ABCA1, et une dimérisation de l'apoE [408].

Chapitre II : Objectifs

Comme nous l'avons vu, le cancer du sein, bien qu'il bénéficie généralement de pronostics de survie favorables lorsqu'il est diagnostiqué tôt, reste le premier cancer chez la femme, et il est toujours, aujourd'hui, la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes aux Etats-Unis. Bien qu'il existe des facteurs de risque génétiques, la part de l'environnement dans l'initiation et le développement du cancer du sein est considérable. Identifier de nouveaux facteurs de risque environnementaux, ou confirmer l'existence de ceux que l'on se contente pour l'instant de suspecter, demeure par conséquent pertinent. Si les habitudes de vie dites « occidentales » ont souvent été pointées du doigt, c'est parce que l'incidence du cancer du sein est plus élevée dans les pays occidentaux que dans le reste du monde. Parmi elles, une ménarche plus précoce, une ménopause plus tardive, le fait de ne pas avoir d'enfant ou d'en avoir peu, un âge plus avancé lors de la naissance du premier enfant, la prise de traitements hormonaux (pilule contraceptive), certaines habitudes alimentaires (notamment la consommation d'alcool, ou une haute teneur du régime en graisses saturées), ou encore le surpoids ou l'obésité (ainsi qu'une plus grande prise de poids à l'âge adulte et une certaine distribution de la masse corporelle grasseuse) sont tout autant de facteurs de risque établis de la maladie.

Pourquoi cibler en particulier le cholestérol dans le cadre de nos travaux ? Son implication dans le développement des maladies cardio-vasculaires est établie depuis longtemps, si bien que réduire la part de cholestérol dans son alimentation est une recommandation déjà relayée par le corps médical et les politiques de santé publique. Le cholestérol pourrait aussi être un facteur de risque de certains types de cancer, et parmi eux des cancers majeurs comme celui du sein (premier cancer chez la femme) ou de la prostate (premier cancer chez l'homme). Les études divergent à son sujet, rendant difficile de conclure de façon certaine et résolue. L'intérêt de mener des recherches à ce sujet est double : prévenir (éduquer les populations quant au risque de certaines habitudes alimentaires, et peut-être réduire, ainsi, le nombre de nouveaux cas), et guérir (identifier des mécanismes d'action du cholestérol dans le développement du phénotype cancéreux, de manière à pouvoir, peut-être, mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées).

Nous avons décidé de travailler avec deux lignées cellulaires différentes : la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 et la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231. La première

est ER-positive et PR-positive avec un phénotype Luminal A. Elle représente un type de cancer du sein moins agressif, moins invasif, et plus facile à traiter car réagissant aux thérapies ciblant les récepteurs aux œstrogènes. La deuxième est une lignée Triple-Négative, qui représente le type de cancer du sein qui demeure encore à ce jour le plus grand défi pour les médecins. Particulièrement agressif, il évolue rapidement en métastases, ne peut par définition pas être éliminé par les thérapies ciblées, et est assorti de mauvais pronostics de survie. Dans ces deux lignées, nous avons exprimé deux protéines qui d'ordinaire ne le sont pas : l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) ou l'apolipoprotéine E (apoE). Le but premier était de provoquer dans ces cellules un changement de métabolisme du cholestérol, et de vérifier si cela impactait le phénotype cancéreux (en termes de prolifération, de migration, et d'invasion), et si oui, par quels mécanismes. *In vivo*, l'apoA-I participe au transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire sa sortie de la cellule vers le foie pour élimination. En l'exprimant dans des cellules cancéreuses, nous espérions pouvoir mimer ce phénomène pour favoriser là-aussi une sortie de cholestérol et donc diminuer les niveaux de cholestérol intracellulaires. L'effet de l'apoE sur les cellules cancéreuses, en revanche, était plus difficile à prévoir. En étant associée aux VLDL, l'apoE participe à la distribution du cholestérol dans l'organisme. Au niveau du foie, l'apoE permet l'élimination des VLDL par le foie via le récepteur LDLR, et également des chylomicrons remnants via LRP1 ou via les protéoglycanes à héparane-sulfate [409]. Cependant, selon le type cellulaire considéré, elle peut aussi être à l'origine d'un flux sortant de cholestérol (notamment dans les macrophages, et ce de façon assez conséquente pour qu'une déficience en apoE soit à l'origine de l'athérosclérose *in vivo* dans des modèles de souris). L'exprimer dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 pourrait donc aussi bien augmenter que diminuer les niveaux de cholestérol.

Notre hypothèse de travail était la suivante : augmenter la quantité de cholestérol (potentiellement avec l'apoE) pourrait stimuler la croissance tumorale, tandis que réduire les niveaux de cholestérol (avec l'apoA-I et peut-être aussi l'apoE) pourrait au contraire ralentir les cellules cancéreuses. Nos objectifs étaient les suivants :

- 1) Confirmer ou infirmer l'implication du cholestérol dans le développement du cancer du sein, en vérifiant si une perturbation du métabolisme du cholestérol impactait le phénotype ou les capacités pro-tumorales des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231.

- 2) Si implication il y avait réellement, découvrir par quels mécanismes le cholestérol pouvait stimuler ou au contraire inhiber la croissance tumorale, en identifiant les voies de signalisation impliquées ainsi que les partenaires de l'apoA-I et de l'apoE.
- 3) Elucider d'autres mécanismes, indépendants du cholestérol, par lesquels l'apoA-I et l'apoE pourraient éventuellement impacter les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231.
- 4) Mettre en lumière de nouvelles pistes de stratégies thérapeutiques reposant sur l'apoA-I ou l'apoE.

Nos travaux ont été menés sur deux fronts : *in vitro* et *in vivo*. Dans le premier cas, il s'agissait de vérifier tout d'abord que l'apoA-I et l'apoE étaient bien exprimées par nos cellules (Western-Blot, PCR quantitative), et que cela impactait le métabolisme du cholestérol (mesure du contenu de cholestérol par HPTLC ou GC, mesure de la fluidité membranaire, mesure de l'expression de la cavéoline-1). Nous souhaitions ensuite étudier l'impact de ces changements éventuels sur le phénotype cancéreux : mesurer la prolifération cellulaire (comptage, coloration au cristal violet, mesure de l'impédance), la migration cellulaire (migration en insert, cicatrization), et l'invasion cellulaire (insert). Les mécanismes d'action de l'apoA-I et de l'apoE devaient ensuite être compris : identification de leurs partenaires protéiques (Western-Blot, PCR quantitative, utilisation de siARN pour éteindre certains gènes et ainsi vérifier si cela supprimait ou non les effets de l'apoA-I ou de l'apoE) et évaluation de l'activation de certaines voies de signalisation qui sont au cœur du cancer du sein, notamment la voie PI3K/Akt et MAPK/ERK (vérification de l'activation par Western-Blot, recours à des inhibiteurs spécifiques). *In vivo*, il s'agissait d'injecter les cellules exprimant l'apoA-I ou l'apoE dans des souris immunodéficientes athymiques, et de suivre l'évolution de la croissance tumorale au cours du temps. Idéalement, nous voulions avoir une idée de la vitesse à laquelle grossissaient les tumeurs, vérifier la présence ou non de métastases, mais aussi mesurer les niveaux de cholestérol au sein de la tumeur et dans le plasma, analyser les tumeurs par immunohistochimie à la recherche de marqueurs de l'agressivité tumorale (notamment Ki-67), et confirmer par Western-Blot l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE.

Chapitre III : Partie Expérimentale

I. Méthodes

1) Lignées cellulaires

Les lignées cancéreuses ER-positive/PR-positive MCF-7 et Triples-Négative MDA-MB-231 ont été obtenues de l'ATCC (American Tissue Culture Collection, LGC Promochem, Molsheim, France). Ces lignées ont été isolées de patientes atteintes de cancer du sein. Elles ont été utilisées dans leur forme transfectée avec un vecteur contenant l'ADNc de la luciférase de luciole (LUC) [410]. Elles étaient cultivées dans le milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM, High Glucose, L-Glutamine, Lonza Bioscience, Levallois, France) supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF, Life Technologies, Saint Aubin, France) à hauteur de 10% et de pénicilline/streptomycine (P/S, Life Technologies, Saint-Aubin, France) à une concentration finale de 100U/mL, sauf indication contraire.

2) Transfection

Des plaques de six puits ont étéensemencées à une concentration de 10 000 cellules/cm² jusqu'à atteindre une confluence avoisinant les 80%. Avant de procéder à la transfection, le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM sans sérum. Les cellules ont ensuite été transfectées avec les plasmides (tous obtenus de GeneCopoeia, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France, **Figure 4**) contenant l'ADN_C codant soit pour la Green Fluorescent Protein (GFP), soit pour l'apolipoprotéine A-I (apoA-I), soit pour l'apolipoprotéine E (isoforme apoE3), à raison d'un puits par condition en plus d'un puits contrôle sans transfection, en respectant les ratios suivants : 0,5µg d'ADN pour 40 000 cellules et 2µL du réactif de transfection Endofectin (GeneCopoeia) pour 1µg d'ADN. Il est important de noter que les séquences codantes de l'apoA-I et de l'apoE contiennent une région codant pour une pré- et une pro-séquence, permettant la sécrétion de la protéine et son assemblage correct, respectivement. 3 heures et 30 minutes après transfection, le milieu a été changé par du milieu DMEM frais avec sérum, et les cellules ont été observées à la lumière fluorescente pour vérifier que les lignées contrôles (MCF-7-GFP et MDA-MB-231-GFP) avaient bien été correctement transfectées et apparaissaient vertes (cela permet de se rendre compte de l'efficacité globale de la transfection, bien qu'il soit impossible à ce stade de vérifier que les

lignées transfectées avec l'ADNc codant pour l'apoA-I ou l'apoE expriment bien ces dites protéines). 48 heures plus tard, le milieu a de nouveau été remplacé, cette fois supplémenté en puromycine à une concentration égale à 1,5 µg/mL. Cette sélection à l'antibiotique a été réalisée pendant au moins une semaine (jusqu'à ce que toutes les cellules non transfectées soient mortes), avec changement de milieu tous les deux jours. A l'issue de cette étape, le milieu a été remplacé par du milieu frais sans puromycine, et lorsque les cellules ont atteint 80 à 90% de confluence, elles ont été transférées, par étape, dans des flasques de plus en plus grandes. Une fois ensemencées dans une flasque T75, les cellules ont de nouveau été sélectionnées quelques jours avec la même concentration de puromycine pour constituer, à la fin de cette dernière étape de sélection, les lignées transfectées stables. Pour finir, l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE a été vérifiée par RT-qPCR ou par épifluorescence.

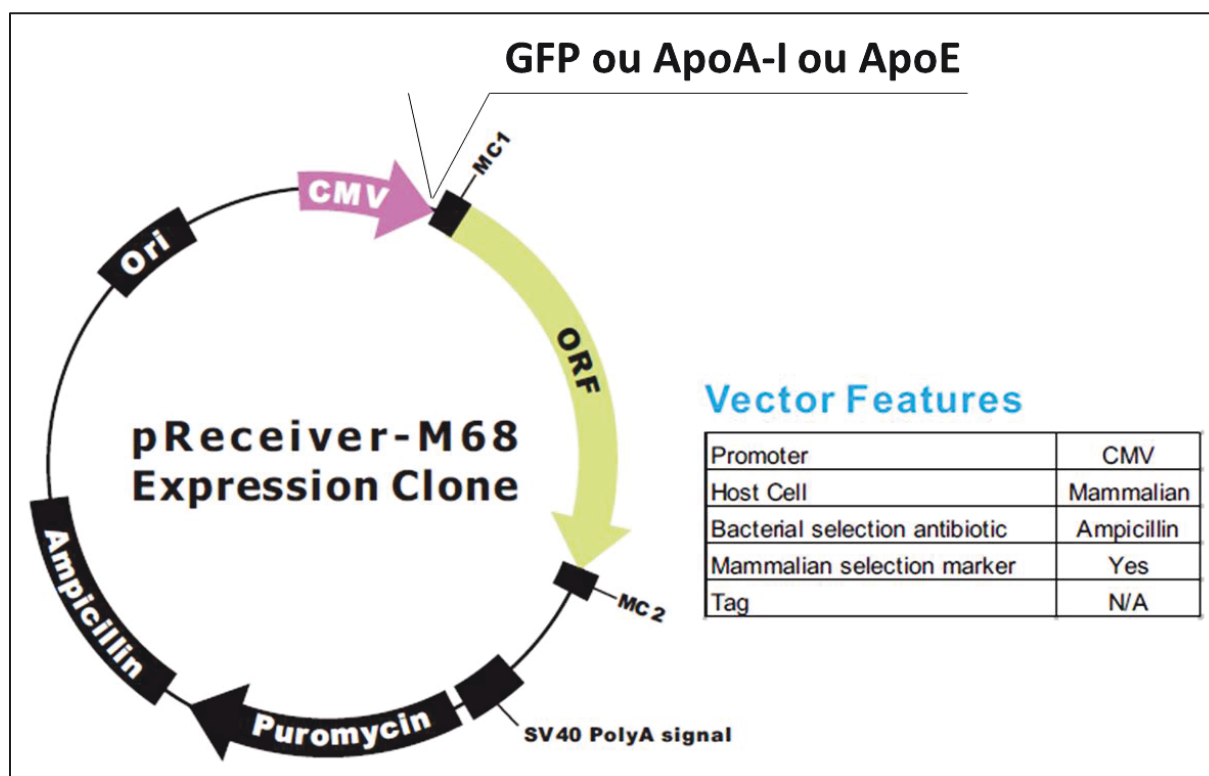


Figure 4 : Plasmides utilisés pour la transfection des ADN codants pour les protéines apoA-I, apoE et GFP. Les plasmides (GeneCopoeia, Tetu-bio) contiennent un gène de résistance à l'ampicilline (utilisée pour l'étape de sélection bactérienne lors de l'amplification des plasmides) ainsi qu'un gène de résistance à la puromycine (utilisée pour l'étape de sélection des cellules transfectées, de façon à obtenir des lignées cellulaires transfectées stables).

3) Dosage des protéines

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. Au moment de la collecte, les cellules ont été lavées deux fois avec du Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) froid sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} et resuspendues dans du tampon de lyse (50mM Tris pH 7.4, 1% NP40, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1% SDS, 0.5% Désoxycholate de sodium, 10% Glycérol) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Toutes les étapes de collecte des protéines ont été réalisées sur glace. Après collecte, les échantillons ont été maintenus à 4°C pendant 30 minutes, puis stockés à -80°C jusqu'au dosage.

Avant dosage, les échantillons ont été soniqués (10 tours à une amplitude de 20%, VibraCell 75022), puis centrifugés à 10 000g pendant 2 minutes à 4°C. Seul le surnageant a ensuite été utilisé pour la quantification. Les protéines ont été dosées grâce au BCA Protein Assay Reagent Kit (Life Technologies) dont le principe repose sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique (BCA), à l'aide d'une gamme étalon constituée d'échantillons de BSA de concentration connue.

4) Dosage du cholestérol

a. Par HPTLC (« High-Performance Thin-Layer Chromatography »)

Les cellules ont étéensemencées dans des flasques T175. Dès que les cellules atteignaient 80 à 90% de confluence, elles étaient lavées avec du DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et collectées avec de l'EDTA. Elles ont ensuite été centrifugées 10 minutes à 2 000 tours/minute, puis le culot a été resuspendu dans 10mL de DPBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} et les cellules ont été comptées (la technique de l'HPTLC requiert au moins 10 000 000 de cellules). De cette suspension ont été prélevés 20µL. Cette suspension de 20µL a ensuite été centrifugée 10 minutes à 2 000 tours/minute, puis le culot a été resuspendu dans 80µL de tampon de lyse pour servir au dosage de protéines. Le reste de la suspension cellulaire a quant à lui été transféré dans un tube en verre, puis centrifugé de la même manière. Le culot de cellules a été analysé par chromatographie haute performance sur couche mince HPTLC après extraction

des lipides par la méthode de Pinault et al. [411], inspirée de la méthode Bligh and Dyer [412]. Pour cette méthode, le culot de cellules a subi une première extraction avec un mélange de chloroforme (2mL), méthanol (4mL), et eau (1,6mL), avant d'être centrifugé. A l'issue de cette centrifugation, une deuxième extraction a été effectuée avec le culot, tandis qu'a été ajouté au surnageant un mélange de chloroforme (2mL) et d'eau (2mL). Une deuxième centrifugation a alors eu lieu. La phase organique inférieure (obtenue des deux extractions poolées, et qui contient le chloroforme et les lipides) a ensuite été filtrée sur laine de verre, puis évaporée. Les lipides totaux ainsi obtenus ont été pesés et dilués dans du chloroforme à une concentration de 10mg/mL. Les échantillons (et une gamme d'étalonnage préparée à partir d'un standard de cholestérol à 1 mg/mL) ont ensuite pu être déposés sur des plaques HPTLC en phase normale (SiOH) qui ont en premier lieu subi une étape de pré-migration ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, V/V) et d'activation (120°C pendant 30 minutes). La migration a été effectuée dans un mélange hexane/ $\text{Et}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (70:30:1, V/V), puis la révélation a été opérée dans de l' HClO_4 à 70% pendant 2 minutes. La plaque a ensuite été séchée sous hotte pendant deux heures et chauffée 16 minutes à 160°C. Enfin, la plaque a été photographiée (lumière visible ou UV), les données ont été converties (logiciel Winkats.Inc), et les pics ont été quantifiés (logiciel VideoScan.Ink).

Les concentrations obtenues (cholestérol total, cholestérol libre, esters de cholestérol) ont été ramenées à la quantité de protéines totale contenue dans l'échantillon.

b. Quantification des stérols par chromatographie en phase gazeuse (GC)

La quantification des stérols et oxystérols (qui sont structuellement proches), a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC). A partir de l'extrait lipidique saponifié (préparé comme pour la quantification du cholestérol par HPTLC), les composés sont acétylés sur les groupements alcools par le chlorure d'éthanoyle à chaud pour permettre leur analyse en GC sur colonne moyennement polaire ZB5 (0,25mm de diamètre, 30m de longueur, Phenomenex). Actuellement, les standards de stérols (cholestérol, desmostérol, 22-hydroxycholestérol, 24-hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol) et de phytostérols (β -sitostérol, campestérol, stigmastérol) sont acétylés, non deutérés, et sont utilisés comme standards de référence.

c. Coloration à la filipine

Les cellules ont étéensemencées à raison de 10 000 cellules par puit dans des plaques de 12 puits contenant des lamelles (Fischer Scientific). Après 24 heures, les cellules ont été lavées trois fois avec du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ puis fixées en présence d'une solution à 2% de paraformaldehyde (ThermoFischer) dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Après lavage avec du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, les cellules ont été colorées avec une solution de filipine (Sigma-Aldrich) à 0,05mg/mL dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pendant 30 minutes. Après lavage avec DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, les lamelles ont été montées sur des lames en présence d'une solution d'antifade (Fischer scientifique). Les cellules ont ensuite été observées au microscope avec un filtre de type DAPI (longueur d'onde d'excitation : 352-402 nm ; longueur d'onde d'émission : 417-477 nm).

5) Mesure de la fluidité membranaire

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits noire à fond clair à une densité de 10 000 cellules par puits. Le lendemain, les puits ont été rincés deux fois avec du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, puis remplis avec 150µL de solution contenant la sonde Di-4-ANEPPDHQ (0,88µM, diluée dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) ou le même volume de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (blanc). La plaque a été incubée à 37°C pendant 20 minutes, puis lue à l'aide de la Flexstation (longueur d'onde d'excitation : 400nm ; spectre d'émission : 480 à 750nm ; pas : 2 à 5 nm ; Molecular Devices) à une température de 37°C.

Pour l'analyse, pour chaque condition, la valeur contrôle (blanc) a été soustraite à la valeur obtenue. Ensuite, l'aire sous la courbe a été mesurée entre 500 et 580nm (A_{verte}), et entre 620 et 750nm (A_{rouge}). Pour chaque puits, la GP value (« Generalized Polarisation ») a alors pu être calculée comme suit :

$$GP_{value} = \frac{A_{verte} - 0,2 * A_{rouge}}{A_{verte} + 0,2 * A_{rouge}}$$

Plus la GP value augmente (en d'autres termes, plus il s'opère une transition vers le vert), et plus la membrane est rigide en comparaison à une condition contrôle.

6) Mesure de la prolifération cellulaire

a. Etude de la prolifération par coloration au cristal violet

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à raison de 2 000 cellules/puits. Au moment de la mesure, le milieu a été aspiré délicatement (sans lavage), et 80µL de solution de fixation/coloration (0,05% poids/volume de poudre de cristal violet, 1% de formaldéhyde, 1X DPBS, 1% de méthanol, 1x de DPBS, 1% de méthanol, le tout dilué dans de l'eau distillée purifiée) ont été ajoutés par puits. La coloration a été effectuée pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis la solution de coloration a été retirée et les puits ont été lavés quatre fois avec 200µL d'eau distillée. La plaque a ensuite été séchée ouverte dans une étuve à 37°C pendant 3 heures. Le cristal violet a ensuite été dissous avec 100µL de solution d'acide acétique à 10% (dilué dans de l'eau distillée) et la plaque a été placée sous une légère agitation, protégée de la lumière, jusqu'à dissolution complète du colorant et obtention d'une couleur homogène. L'absorbance a ensuite été lue à deux longueurs d'onde différentes : 590nm et 690nm (blanc). Pour les analyses, l'absorbance à 690nm a été soustraite de celle à 590nm.

Les mesures ont généralement été effectuées 6, 24, 48, 72 et 96 heures après ensemencement, et les traitements (si nécessaires en fonction de l'expérience) ont été réalisés 24 heures après ensemencement. Sauf indication contraire, le résultat présenté est un ratio de la valeur pour la condition considérée à la mesure effectuée 6 ou 24 heures après ensemencement (temps qui correspond à une phase d'adhésion cellulaire uniquement).

b. Etude de la prolifération par comptage

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 50 000 cellules par puits. Au moment de la mesure, le milieu est retiré et les cellules sont lavées deux fois avec du DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ avant d'être décollées à 37°C pendant 5 à 10 minutes avec 200µL de trypsine concentrée (Lonza) par puits. Les cellules ont ensuite été collectées avec 200µL de milieu, et 20µL de la suspension cellulaire sont déposés dans une lame de comptage (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) qui est lue par un compteur automatique (Cellometer Auto, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Le volume de la suspension cellulaire est mesuré et consigné, et le nombre total de cellules estimé.

Sauf mention contraire, les mesures ont été effectuées 6, 24, 48, 72 et 96 heures après ensemencement, et les traitements (si nécessaires en fonction de l'expérience) ont été réalisées 24 heures après ensemencement.

c. Etude de la prolifération par mesure de l'impédance (système xCELLigence)

Le système xCELLigence (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) repose sur l'utilisation de plaques dont les puits sont quasi-intégralement recouverts d'électrodes en or (**Figure 5**). Lorsque les cellules adhèrent au fond du puits, elles vont se déposer sur ces électrodes, entre lesquelles circule un courant alternatif sinusoïdal d'environ 20mV grâce au milieu de culture qui sert d'électrolyte. Ce qui est mesuré par le système, c'est l'impédance électrique, qui est en fait la traduction de la résistance du système au passage du courant. Plus les cellules sont présentes sur les électrodes, et plus l'impédance augmente. La mesure de l'impédance est donc directement proportionnelle au nombre de cellules. Ainsi, le système xCELLigence permet d'obtenir des informations quantitatives sur l'état biologique cellulaire (adhésion, prolifération, viabilité, morphologie) en continu, en temps réel et sans marquage [413].

Les puits de la plaque de prolifération xCELLigence ont été remplis avec 100µL de milieu DMEM sans sérum et la plaque a été conservée ainsi à température ambiante pendant 20 minutes. La plaque a ensuite été placée dans la machine pour l'étape de scan. Puis dans chaque puits ont été ajoutés 100µL de milieu DMEM 10% SVF 1% P/S contenant 2 000 cellules et la plaque a été conservée ainsi à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être placée dans la machine. L'expérience a été lancée sur une durée totale de 96 heures.

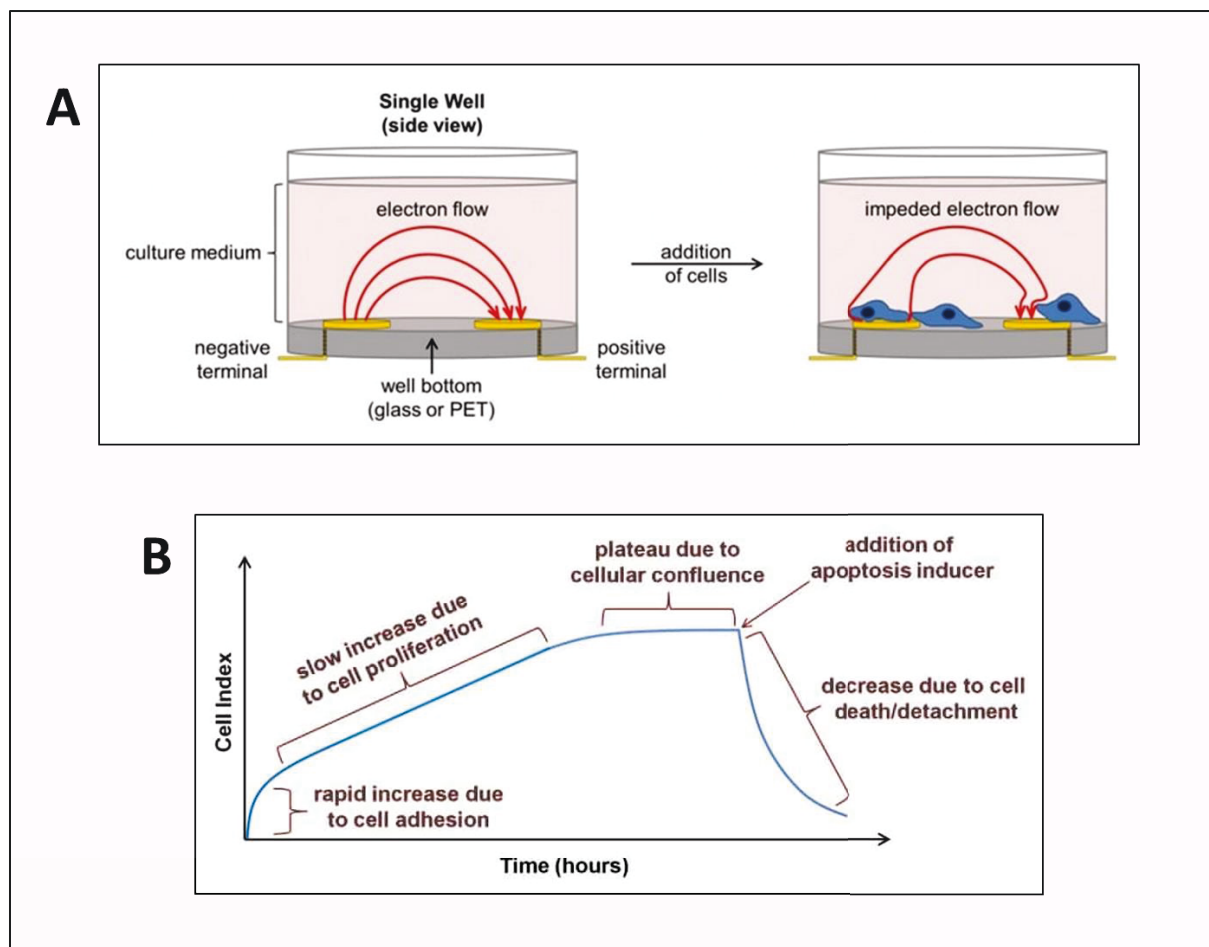


Figure 5 : Principe du système xCELLigence pour la quantification de la prolifération cellulaire en temps réel et sans marquage. 5A : Schéma d'un puits de prolifération. Les puits sont recouverts d'électrodes en or. Le courant circule entre deux électrodes grâce au milieu de culture qui fait état d'électrolyte. Lorsque les cellules adhèrent aux électrodes, cela crée une résistance au passage du courant alternatif (impédance électrique). Plus les cellules prolifèrent, plus la résistance est importante, plus l'impédance augmente. **5B :** Exemple d'une expérience de prolifération/apoptose. La première partie de la courbe correspond toujours à une phase d'adhésion. Elle est ensuite suivie d'une phase de prolifération linéaire (l'impédance électrique augmente proportionnellement au temps), qui s'achève par une phase plateau lorsque la confluence maximale est atteinte (toutes les électrodes sont alors tapissées de cellules, l'impédance stagne). Dans cet exemple, un stimulant de l'apoptose est ajouté, et lorsque les cellules meurent, elles se détachent des électrodes, ce qui provoque une diminution de l'impédance [414].

7) Mesure de la migration cellulaire

a. Etude de la migration cellulaire en inserts de migration (« transwell »)

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 400 000 (MCF-7) ou 150 000 (MDA-MB-231) cellules par puits, dans un ou plusieurs puits en fonction de l'ampleur de l'expérience. 24 heures plus tard, le milieu a été remplacé par un milieu de sevrage contenant uniquement 1% de SVF et 1% de P/S. Le lendemain, les cellules ont été lavées deux fois avec du DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, décollées avec 200µL d'accutase

(Sigma-Aldrich) et comptées. En parallèle, les milieux de culture destinés à la migration (DMEM 1%SVF, 1% P/S et DMEM 10%SVF, 1% P/S) ont été placés dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ pendant une heure (étape d'équilibration). Les cellules ont été décollées avec 200µL d'acutase par puits, isolées, resuspendues avec 200µL de milieu DMEM 1% SVF 1% P/S, puis comptées. Une suspension cellulaire de concentration égale à 1 000 000 cellules/mL (MCF-7) ou 200 000 cellules/mL (MDA-MB-231) a ensuite été préparée dans du milieu DMEM 1% SVF 1% P/S. A l'issue de l'étape d'équilibration, les puits de la plaque de migration (plaque de 24 puits) ont ensuite été remplis avec 700µL de milieu DMEM 10% SVF 1% P/S et les inserts de migration (Corning, Boulogne-Billancourt, France) ont été placés au centre des puits avant d'être eux-mêmes remplis de 200µL de milieu DMEM 1% SVF 1% P/S. Enfin, 50 µl de la suspension cellulaire a été ajoutée aux inserts (soit 50 000 cellules par insert pour les cellules MCF-7 et 10 000 cellules par insert pour les cellules MDA-MB-231) (**Figure 6A**).

La migration a été effectuée pendant 24 heures. Une fois écoulé ce laps de temps, les inserts de migration sont vidés, nettoyés délicatement à l'aide d'un coton-tige, lavés avec 100µL de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺, et colorés avec une suspension de cristal violet (600µL dans le puits d'une plaque de 24 puits et 200µL à l'intérieur de l'insert, que l'on dépose dans le puits). Cette coloration a été effectuée pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Les inserts ont ensuite été lavés avec de l'eau distillée et séchés pendant 3 heures dans une étuve à 37°C avant de procéder aux photographies (cinq photographies par insert).

b. Etude de la migration cellulaire par mesure de l'impédance (système xCELLigence)

Les cellules ont étéensemencées et sevrées de la même façon que pour la migration cellulaire en insert de migration. 24 heures après le sevrage, la migration a été lancée comme suit : la partie inférieure des inserts de migration xCELLigence a été remplie avec 160µL de milieu DMEM 10% FBS 1% P/S, puis la partie supérieure de l'insert a été attachée à la partie inférieure avant d'être remplie avec 25µL de milieu DMEM sans sérum, et le tout a été refermé complètement et placé 1 heure dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ (**Figure 6B**). Pendant ce temps, les cellules ont été décollées avec 200µL d'acutase par puits, isolées, resuspendues avec 200µL de milieu DMEM 1% SVF 1% P/S, puis comptées. Une suspension cellulaire de concentration égale à 400 000 cellules/mL a ensuite été préparée dans du DMEM 1% SVF 1% P/S. A la fin de l'étape d'équilibration (et après mesure du blanc par le système), la partie supérieure des inserts a été remplie avec 100µL de la suspension cellulaire (soit 40

000 de cellules par insert), puis la plaque de migration a été placée dans l'appareil xCELLigence, scannée, et la migration a été lancée (mesure de l'impédance toutes les 15 minutes pendant 24 heures).

A la fin de la migration, les courbes ont été analysées en calculant la pente de la partie linéaire située entre la phase initiale d'adhésion et la phase finale de plateau.

c. Etude de la migration cellulaire en cicatrisation (« wound healing »)

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits dans du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S (200µL/puits), à raison de 300 000 cellules/puits pour les cellules MCF-7 et 150 000 cellules/puits pour les cellules MDA-MB-231. Le lendemain (les cellules doivent avoir atteint 100% de confluence), une fois le milieu retiré, les cellules ont été lavées deux fois avec du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ puis du milieu DMEM 0,1% BSA (Fatty Acid Free) a été ajouté dans les puits pour réaliser l'étape de sevrage. 24 heures plus tard, le milieu a été retiré, les cellules lavées deux fois avec du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, une cicatrice a été réalisée manuellement au milieu de chaque puits (ligne droite tracée délicatement avec l'embout d'un cône de pipette P200), puis les puits ont été lavés deux fois avec du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de façon à retirer tous les débris cellulaires. Les puits ont ensuite été remplis de milieu (selon l'expérience et la condition : milieu DMEM 10% SVF 1% P/S, ou milieu contenant un inhibiteur, etc), et la plaque contenant les cellules a ensuite été placée dans une chambre maintenue à 37°C, 5% de CO_2 , reliée à une caméra de manière à pouvoir prendre des photographies de la cicatrice à intervalles réguliers pendant 24 heures (Okolab Cage Incubator, Okolab, Pozzuoli, Italie). A l'issue de la migration, l'aire de la cicatrice non recouverte de cellules a été mesurée grâce au logiciel ImageJ, le pourcentage de recouvrement a été calculé en prenant pour référence la valeur de l'aire au temps 0, puis la valeur 1 – *%age de recouvrement* a été représentée au cours du temps pour visualiser la vitesse de cicatrisation.

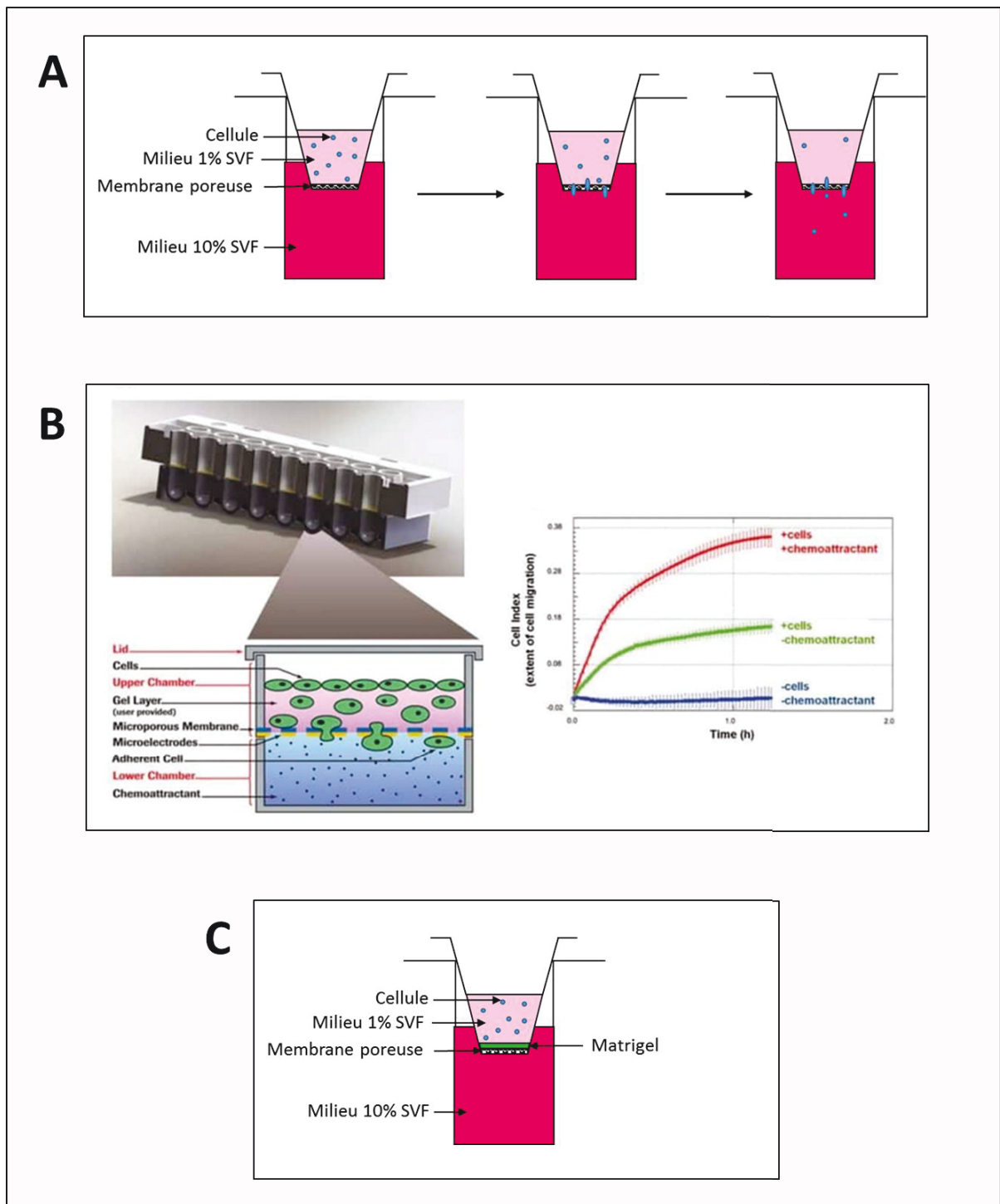


Figure 6 : Techniques de quantification de la migration et de l'invasion cellulaires. 6A : Migration individuelle en insert de migration. L'insert de migration est rempli de milieu DMEM 1% SVF 1% P/S contenant la suspension cellulaire, et déposé dans un puits contenant du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S (chimioattractant). Il possède une membrane poreuse que les cellules traversent, attirées par le sérum du milieu servant de chimioattractant. Les cellules se rapprochent de la membrane, se déforment, traversent la membrane, avant de se retrouver de l'autre côté. Lorsque la migration est arrêtée, les cellules se situant sur l'insert, côté milieu chimioattractant, sont fixées et colorées au cristal violet. **6B :** Migration individuelle en insert de migration xCELLigence. La membrane poreuse est recouverte d'électrodes en or. Au passage des cellules, la résistance au passage du courant est mesurée par le système. Plus les cellules traversent la membrane et plus l'impédance électrique augmente [415]. **6C :** Inserts d'invasion. Les inserts sont similaires à ceux utilisés pour la migration cellulaire, à ceci près qu'ils sont équipés d'un matrigel, que les cellules doivent envahir avant de pouvoir traverser la membrane poreuse.

8) Stimulation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse

Le TGF- β a été reconstitué dans 20mM de citrate à pH = 3, puis dilué dans du DPBS sans Ca^{2+} / Mg^{2+} . Les cellules MCF-7 ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits à hauteur de 200 000 cellules par puits, avec trois puits par condition, dans du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du DMEM 10% SVF 1% P/S supplémenté en TGF- β à une concentration de 10nM ou en un même volume de solution contrôle (citrate dilué dans du DPBS sans Ca^{2+} / Mg^{2+}). 24 heures plus tard, les cellules ont été collectées pour RT-qPCR.

9) Mesure de l'invasion cellulaire en inserts d'invasion

Les cellules ont étéensemencées de la même manière que pour la migration en inserts de migration, mais les inserts utilisés ici sont recouverts d'un matrigel (Corning, **Figure 6C**). La suspension cellulaire contenait 50 000 cellules dans 500 μ L pour les cellules MCF-7 et 10 000 cellules dans 500 μ L pour les cellules MDA-MB-231.

10) Mesure de la résistance à la doxorobucine

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (3 500 cellules/puits pour les cellules MDA-MB-231, 7 000 cellules/puits pour les cellulesMCF-7) dans du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S supplémenté en doxorobucine (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France), diluée dans une solution saline NaCl 0,9%) à différentes doses (0.1nM, 10nM, 1 μ M, 40 μ M), ou avec le même volume de solution saline. Les cellules ont été gardées ainsi en culture pendant 48 heures ou 7 jours, avant d'être colorées au cristal violet à l'issue du traitement pour évaluer la mortalité cellulaire (par mesure de l'absorbance $A_{590\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$).

Pour l'analyse, deux ratios ont été calculés : d'abord le ratio à l'absorbance mesurée 24 heures après ensemencement, puis le ratio à la condition contrôle sans doxorobucine. Une concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) a été calculée en prenant comme référence la concentration de doxorobucine pour laquelle ce ratio était divisé par deux.

11) Western-Blot

Les protéines ont été dosées comme décrit précédemment, puis les échantillons protéiques ont été dilués dans du tampon de charge SDS 4X (4x Laemmli Sample Buffer, Biorad, composition : 277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4,4% LDS, 44,4% p/v glycérol, 0,02% bleu de bromophénol, 355 mM β -mercaptoéthanol) et du tampon de lyse supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases. Les échantillons ont ensuite été déposés dans un gel d'électrophorèse (gel de séparation à 12% d'acrylamide, gel de concentration à 5% d'acrylamide). A la fin de la migration, le transfert a été réalisé en conditions semi-sèches (machine Biorad) pendant 45 minutes à 25V en utilisant une membrane PVDF. Après vérification de l'efficacité du transfert par coloration au rouge Ponceau, les membranes ont été saturées en protéines en présence de TBS-Tween 0,1% contenant 5% de poudre de lait pendant 1 heure à température ambiante, ou pendant une nuit à 4°C, sous agitation. Elles ont ensuite été lavées avec du TBS 0,1% Tween, incubées sous agitation avec l'anticorps primaire pendant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C, lavées trois fois 5 minutes avec du TBS 0,1% Tween, puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante, toujours sous agitation. Les solutions d'anticorps primaire ont été diluées dans du TBS-Tween contenant 0,3% de BSA ou 5% de lait et 0.02% de sodium azide, et celles d'anticorps secondaire dans du TBS-Tween contenant 5% de lait. Enfin, les membranes ont été lavées trois fois 5 minutes avec du TBS 0,1% Tween et révélées grâce au kit ECL de GE Healthcare.

Les anticorps primaires utilisés étaient les suivants : souris anti-apoE (Obtenu du Dr. Yves L. Marcel, Atherosclerosis, genetics and cell biology group, Université d'Ottawa, Canada) dilué au 1 : 1000, souris anti-apoA-I (Obtenu du Dr. Yves L. Marcel, Atherosclerosis, genetics and cell biology group, Université d'Ottawa, Canada) dilué au 1 : 1 000, lapin anti-LDLR (Biorbyt, Cambridge, Royaume-Uni), souris anti-ABCA1 (Novus Biologicals, Centennial, Etats-Unis), lapin anti-ABCG1 (Novus Biologicals), souris anti-CLA1 (SRB1) (BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis), lapin anti-cavéoline 1 (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, Etats-Unis) dilué au 1 : 1000, lapin anti-E-cadhérine (Cell Signaling Technologies, Danvers, Etats-Unis) dilué au 1 : 1000, lapin anti-N-cadhérine (Cell Signaling Technologies) dilué au 1 : 1000, lapin anti-p44/p42 (MAPK) (Cell Signaling Technologies) dilué au 1 : 2000, souris anti-phospho-p44/p42 (T202/Y204) (Cell Signaling Technologies) dilué au 1 : 2000, souris anti-Akt pan (Cell Signaling Technologies) dilué au 1 : 2000, lapin anti-phospho-Akt (S473) (Cell Signaling Technologies) dilué au 1 : 3000. Les anticorps

secondaires utilisés étaient les suivants : chèvre anti-souris conjugué à HRP (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1 : 20 000 et chèvre anti-lapin conjugué à HRP (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1 : 10 000.

Le contrôle du dépôt a été effectué grâce à la β -actine : souris anti- β -actine (Sigma-Aldrich) dilué au 1 : 10000.

12) Microcopie d'immunofluorescence

Pour l'imagerie par microscopie en épifluorescence, les cellules ont étéensemencées pour 24 heures sur des lamelles, puis fixées avec une solution à 2% de formaldéhyde (dans DPBS/CM, Fischer Scientific) pendant 30 minutes. Après lavage avec une solution de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de 0,1% Triton X-100 dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 0,2%BSA (solution A) pendant 10 minutes. Puis les cellules ont été incubées en présence d'une solution 50 mM NH_4Cl dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pendant dix minutes afin de limiter l'autofluorescence. La détection de l'apoA-I (anticorps 5F6) ou de l'apoE (anticorps 1D7) a été réalisée dans la solution A. Après lavage avec la solution A, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire (Fragment Rhodamine Red-X-AffiniPure F(ab')₂) ; Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK). Après lavage dans la solution A, les lamelles ont été scellées sur des lames de microscope en présence de Slowfade diamond antifade contenant du DAPI (Fischer Scientific). Les cellules ont été observées sur un microscope Nikon TI-S et analysées avec le logiciel NIS-BR (Nikon, France).

Pour l'imagerie par microscopie confocale, les cellules ont étéensemencées pour 24 heures sur des lamelles, puis fixées avec une solution à 2% de formaldéhyde (dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Fischer Scientific) pendant 30 minutes. Après lavage avec une solution de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de 0,1% Triton X-100 dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 0,2%BSA (solution A) pendant 10 minutes. Puis les cellules ont été incubées en présence d'une solution 50 mM NH_4Cl dans du DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pendant 10 minutes afin de limiter l'autofluorescence. La détection de la caveoline-1 (anticorps N20) a été réalisée dans la solution A. Après lavage avec la solution A, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire (Fragment Rhodamine Red-X-AffiniPure F(ab')₂) ; Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK). Après lavage dans la solution A, les lamelles ont été scellées sur des lames de microscope en présence de Slowfade diamond antifade contenant du DAPI (Fischer Scientific). Les cellules ont été

observées sur un microscope confocal à Balayage Laser Haute Résolution Leica SP8 gSTED (Leica) en utilisant le logiciel LAS-X v2.0 (Leica).

13) RT-qPCR (« Reverse Transcription-quantitative PCR »)

Pour l'extraction d'ARN, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à hauteur de 500 000 cellules par puits, dans du milieu DMEM 10% FBS 1%P/S. Le lendemain, les ARNm ont été extraits avec un kit (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), élués dans 45µL d'eau sans RNase, et dosés.

La transcription inverse (RT) a été réalisée avec le kit PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (TAKARA BIO, Saint-Germain-en-Laye, France). Pour cela, 500ng d'ARN ont été dilués dans un volume total de réaction de 10µL (ARN + H₂O = 6,5µL, tampon = 2µL, oligodT = 0,5µL, Random Primers = 0,5 µL, Reverse Transcriptase = 0,5µL). Le programme RT était constitué d'une étape de 15 minutes à 37°C suivie d'une étape de 5 minutes à 85°C à l'aide du thermocycleur LabCycler48 (SensoQuest GmbH, Göttingen, Allemagne). Le produit final obtenu à l'issue du programme constituait le « mix RT ».

La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée avec le kit SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus, Takara Bio). Pour cela, des plaques de 96 puits ont été remplis avec 50ng d'ADNc (soit 1µL du « mix RT ») et 2µL d'H₂O sans RNase, auxquels ont été ajoutés le mix enzymatique (5µL SYBR, 1µL d'un mix d'amorces Forward + Reverse à 12,5µM chacune, 1µL d'H₂O sans RNase). Les étapes du programme de qPCR, réalisées avec le thermocycleur LightCycle® 480 II (Roche, Bâle, Suisse), étaient les suivantes : un cycle de préincubation (50°C pendant 5 minutes puis 95°C pendant 10 minutes), 45 cycles d'amplification (95°C pendant 10 secondes, 60°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 20 secondes), et un cycle de refroidissement (40°C pendant 30 secondes).

Les amorces utilisées étaient les suivantes : GAPDH, apoA-I, apoE, cav-1, SRB1, VLDLR, LDLR, ABCA1, ABCG1, HMGCR, LXR, Erα, Erβ, E-cadhérine, Vimentine, Fibronectine, SNAIL2, ZEB1, EGFR, HER2, MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, TIMP2, LXR, FASN (Sigma-Aldrich, séquences retranscrites dans le **Tableau 2**). Le gène GAPDH servait de référence (l'expression des gènes cibles testés est donc une

quantification relative à celle du gène GAPDH). Les calculs sont effectués selon la méthode du 2- $\Delta\Delta C_t$ (avec $\Delta C_t = C_{t_{\text{gène cible}}} - C_{t_{\text{gène de référence}}}$, [416]).

Gène	Séquence « Forward » (5' - 3')	Séquence « Reverse » (5' - 3')
ABCA1	ACCCACCCTATGAACAACATG A	GAGTCGGGTAAACGGAAACAGG
ABCG1	CAGGAAGATTAGACACTGTGG	GAAAGGGGAATGGAGAGAAGA
ApoA-I	AGCTTGCTGAAGGTGGAGGT	ATCGAGTGAAGGACCTGGC
ApoE	GGTCGCTTTTGGGATTACCT	CATGGTCTCGTCCATCAGC
Cav1	ACCCACTCTTTGAAGCTGTTG	GAACCTGAAATTGGCACCAGG
E-cadhérine	TACGCCTGGGACTCCACCTA	CCAGAAACGGAGGCCTGAT
ERα	TGATGAAAGGTGGGATACGA	AAGGTTGGCAGCTCTCATGT
ERβ	TCCATGCGCCTGGCTAAC	CAGATGTTCCATGCCCTTGTTA
Fibronectine	CATCGAGCGGATCTGGCCC	GCAGCTGACTCCGTTGCCCA
GAPDH	TGGTCTCCTCTGACTTCAACA	AGCCAAATTCGTTGTCATACC
Her2	CTGCACCCACTCCTGTGTGCAC CTG	CTGCCGTCGCTTGATGAGGATC
HMGCR	GTTCGGTGGCCTCTAGTGAG	GCATTCGAAAAAGTCTTGACAAC
LDLR	GATAGTGACAATGTCTCACCA AG	CCTCACGCTACTGGGCTTC
LXRα	AGGGCTGCAAGGGATTCTTCC	TCTGACAGCACACACTCCTCCC
MMP1	CCTCGCTGGGAGCAAACA	TTGGCAAATCTGGCGTGTA
MMP2	CGTCTGTCCCAGGATGACATC	ATGTCAGGAGAGGCCCCATA
MMP7	GCTGGCTCATGCCTTTGC	TCCTCATCGAAGTGAGCATCTC
MMP9	TTCCAGTACCGAGAGAAAGCC TAT	GGTCACGTAGCCCACTTGGT
MT1-MMP	CATGGGCAGCGATGAAGTCT	CCAGTATTTGTTCCCCTTGTA GTA
N-cadhérine	GGCGTTATGTGTGTATCTTCAC TG	GCAGGCTCACTGCTCTCATA
SNAIL2	AGACCCTGGTTGCTTCAAGGA	CTCAGATTTGACCTGTCTGCAAA
SRB1	CGGCTCGGAGAGCGACTAC	GGGCTTATTCTCCATGATCACC
TIMP1	CGCTGACATCCGGTTCGT	TGTGGAAGTATCCGCAGACACT
TIMP2	GGGCACCAGGCCAAGTT	CGCACAGGAGCCATCACT
Vimentine	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT	GAGAAATCCTGCTCTCCTCGC
VLDLR	GGAGAAGATGAAGAAAACCTGT GG	CATCCTGGCCATTGCATAC
ZEB1	GAAAATGAGCAAAACCATGAT CCT	CCCTGCCTCTGGTCCTCTTC

Tableau 3 : Séquences des amorces ADN utilisées pour les expériences de RT-qPCR.

14) Extinction de l'expression de la cavéoline-1

Les cellules MCF-7 ont étéensemencées dans du milieu DMEM 10% SVF 1% P/S dans des plaques de 6 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec un siARN dirigé contre la cavéoline-1 (Sigma-Aldrich, #EHU031251) ou un siARN contrôle (Sigma-Aldrich, #SIC001) dilués une première fois dans du milieu Optimem sans sérum et du réactif de transfection (Sigma-Aldrich), puis une seconde fois dans le milieu de culture (DMEM 10% SVF, 1% P/S dans le cas des expériences de RT-qPCR, DMEM 1% SVF, 1% P/S dans le cas des expériences de migration) à une concentration finale de 30nM. 24 heures plus tard, les cellules ont été collectées, comptées, etensemencées pour des expériences de RT-qPCR ou de migration.

15) Evaluation de l'impact de la transfection de l'apoA-I ou de l'apoE sur les voies de signalisation PI3K et MAPK

Pour vérifier l'état d'activation des voies de signalisation PI3K et MAPK en réponse à un stimulus de prolifération, les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits à raison de 100 000 cellules par puit (cellules MCF-7) ou 50 000 cellules par puits (cellules MDA-MB-231) dans du milieu DMEM 10% SVF. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM sans sérum contenant 0,1% de BSA. 24 heures plus tard, la prolifération a été stimulée avec du milieu DMEM 10% SVF et les cellules ont été collectées après 0, 30 et 60 minutes dans 80µL de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de phosphatase (Phosphatase Inhibitor Cocktail « 2 » et « 3 », Sigma-Aldrich) en plus des inhibiteurs de protéases. Les échantillons protéiques obtenus ont ensuite été soniqués, dosés, et analysés par Western-Blot.

Pour vérifier si les voies MAPK et PI3K étaient impliquées dans les effets médiés par l'apoA-I et l'apoE, des expériences de migration ont été effectuées en présence de 15µM de LY294002 (Selleckchem, Houston, Etats-Unis), inhibiteur de la voie PI3K, ou de 10µM de U0126 (Abcam), inhibiteur de MEK1 et MEK2 (voie MAPK), dans la partie inférieure et supérieure de l'insert, et des expériences de prolifération ont également été réalisées avec les mêmes concentrations.

16) Suivi de la croissance tumorale *in vivo*

Les souris utilisées étaient des souris femelles « nude » immunodéficientes athymiques non ovariectomisées (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) à raison de six souris par groupe (et par expérience). Cette étude a été évaluée et approuvée par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire.

Le premier jour, les souris ont été pucées. Une pilule d'œstrogène (0,36mg, durée de 60 jours, Innovative Research of America, Sarasota, Etats-Unis, [417]) a été implantée sous la peau au niveau du cou le même jour sous anesthésie (isoflurane, 2-4 % par inhalation). Les cellules ont été injectées le lendemain en sous-cutané et sous anesthésie (isoflurane, 2-4 % par inhalation), au niveau de la glande mammaire inguinale droite, diluées dans du DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ à une concentration de 100 000 000 cellules/mL, dans un volume de 50µL par souris (pour les cellules MCF-7, soit 5 000 000 de cellules/souris).

La croissance tumorale a été surveillée par imagerie, deux fois par semaine. Pour cela, les souris ont subi une injection intrapéritonéale de luciférine (Interchim, Montluçon, France) deux fois par semaine (150mg/kg, soit environ 4,5mg/souris, dans un volume maximal de 100µL), sous anesthésie. Lors d'une session d'imagerie, les souris endormies étaient transférées dans un imageur IVIS Lumina XRMS In Vivo Imaging System (PerkinElmer, Waltham, Etat-Unis) et étaient placées sur une plaque chauffante maintenant la température corporelle de la souris.

L'expérience a été interrompue au bout de deux mois (durée de relargage des pilules d'œstrogène), moment où les souris ont été sacrifiées. Au moment du sacrifice, les tumeurs ont été collectées, mesurées, pesées, et si la taille le permettait, sectionnées en trois. Le foie et le rein ont été prélevés. Les poumons ont été retirés et observés dans l'imageur placées dans solution de luciférine afin de rechercher la présence éventuelle de traces de métastase. Un tube de sang d'environ 0,6 mL a été prélevé et centrifugé 5 minutes à 5 000 tours/minute et le plasma a été récupéré. Les tumeurs et les organes ont été conservés 24 heures dans une solution de formol à 10 % (formaldéhyde à 4 %) puis ont été transférés dès le lendemain dans une solution à 70% d'éthanol. Les analyses prévues initialement étaient les suivantes : mesure de la quantité de stéroïdes dans le sang, immunohistochimie des tumeurs (à la recherche, notamment, de marqueurs tumoraux tels que Ki-67), dosage du cholestérol intra-tumoral par HPTLC, Western-Blot).

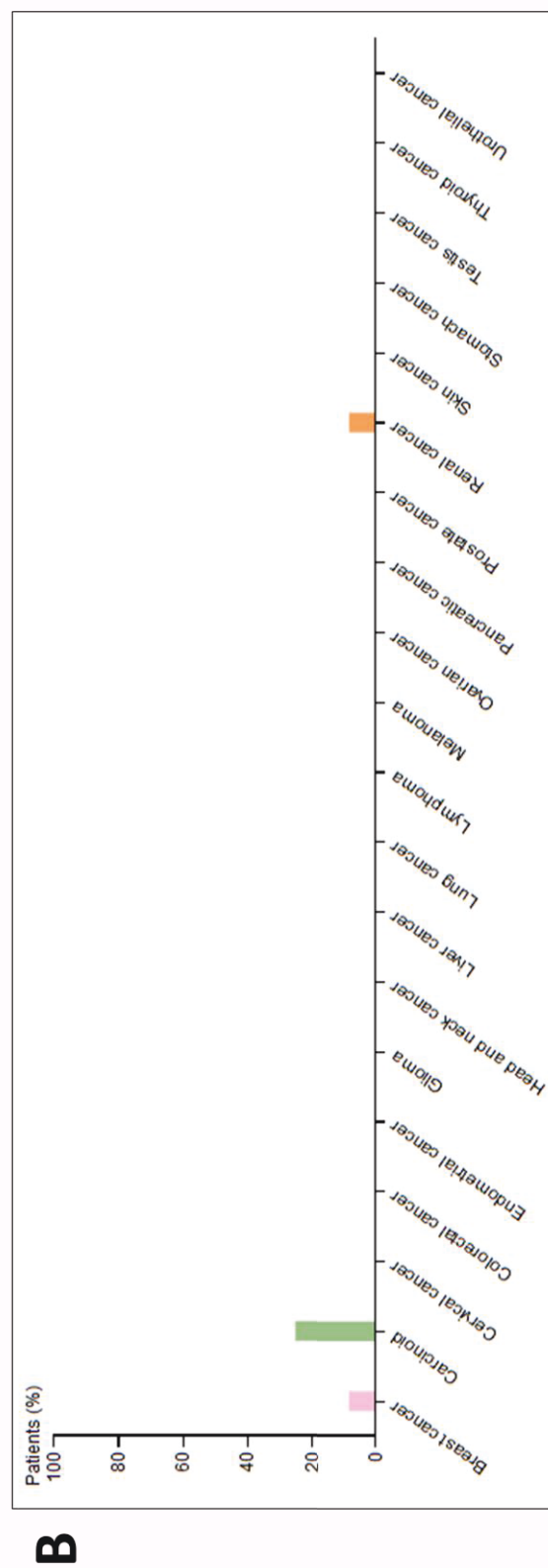
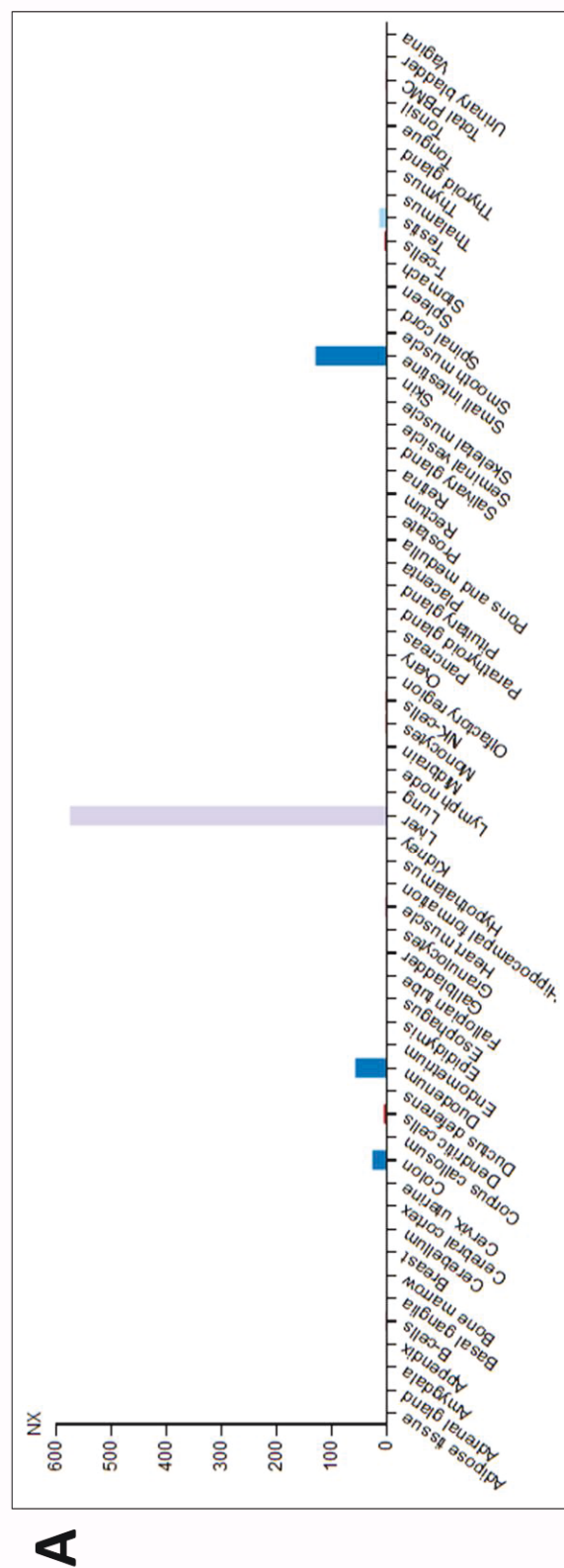
17) Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism. Lorsque les conditions de validité étaient vérifiées, les tests paramétriques adéquats étaient effectués (test de Student avec correction de Welch si besoin pour les comparaisons deux à deux, ANOVA suivie de tests de Holm-Sidak's ajustés pour comparaisons multiples pour les analyses groupées). Sinon, les tests non paramétriques équivalents étaient réalisés (test de comparaison des rangs de Mann-Whitney pour les comparaisons deux à deux, test de Kruskal-Wallis suivi de tests de Dunn ajustés pour comparaisons multiples pour les analyses groupées). Sauf mention contraire, tous les résultats présentés sont exprimés en moyenne plus ou moins écart-type. A moins que le contraire ne soit précisé, toutes les expériences ont été réalisées en triplicatas et répétées au moins trois fois.

II. Résultats

1) L'apoA-I et l'apoE sont correctement exprimées dans nos lignées MCF-7 et MDA-MB-231

L'apoA-I n'est pas naturellement exprimée dans le sein (ni dans le tissu sain, ni dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231), et n'est retrouvée exprimée chez des patients atteints de cancers du sein et ceux à de très faible niveaux (**Figure 7**). Les niveaux d'expression de l'apoE, quoiqu'un peu plus élevés, restent eux aussi très faibles dans les tissus sains et cancéreux et les lignées cellulaires (**Figure 8**). En exprimant l'une ou l'autre de ces apolipoprotéines, nous espérons impacter le métabolisme du cholestérol dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 : favoriser l'entrée de cholestérol avec l'apoE (principalement via les récepteurs LDLR et LRP présents à la surface des cellules) ou promouvoir au contraire la sortie de cholestérol avec l'apoA-I (qui en interagissant avec le transporteur ABCA1 permet l'efflux du cholestérol des cellules) ou avec l'apoE (qui, comme nous l'avons déjà fait remarquer, participe aussi à la sortie de cholestérol dans certains types cellulaires). Selon notre hypothèse de travail, qui consiste à envisager que le cholestérol est nécessaire à la prolifération des cellules cancéreuses, est impliqué dans des voies de signalisation pro-migratoires, pro-invasives ou anti-apoptotiques, et est important pour la croissance tumorale, l'entrée de cholestérol devait stimuler le développement d'un phénotype cancéreux agressif, tandis que la sortie de cholestérol devait au contraire freiner ce développement, voire rétablir un phénotype normal (**Figure 9A**).



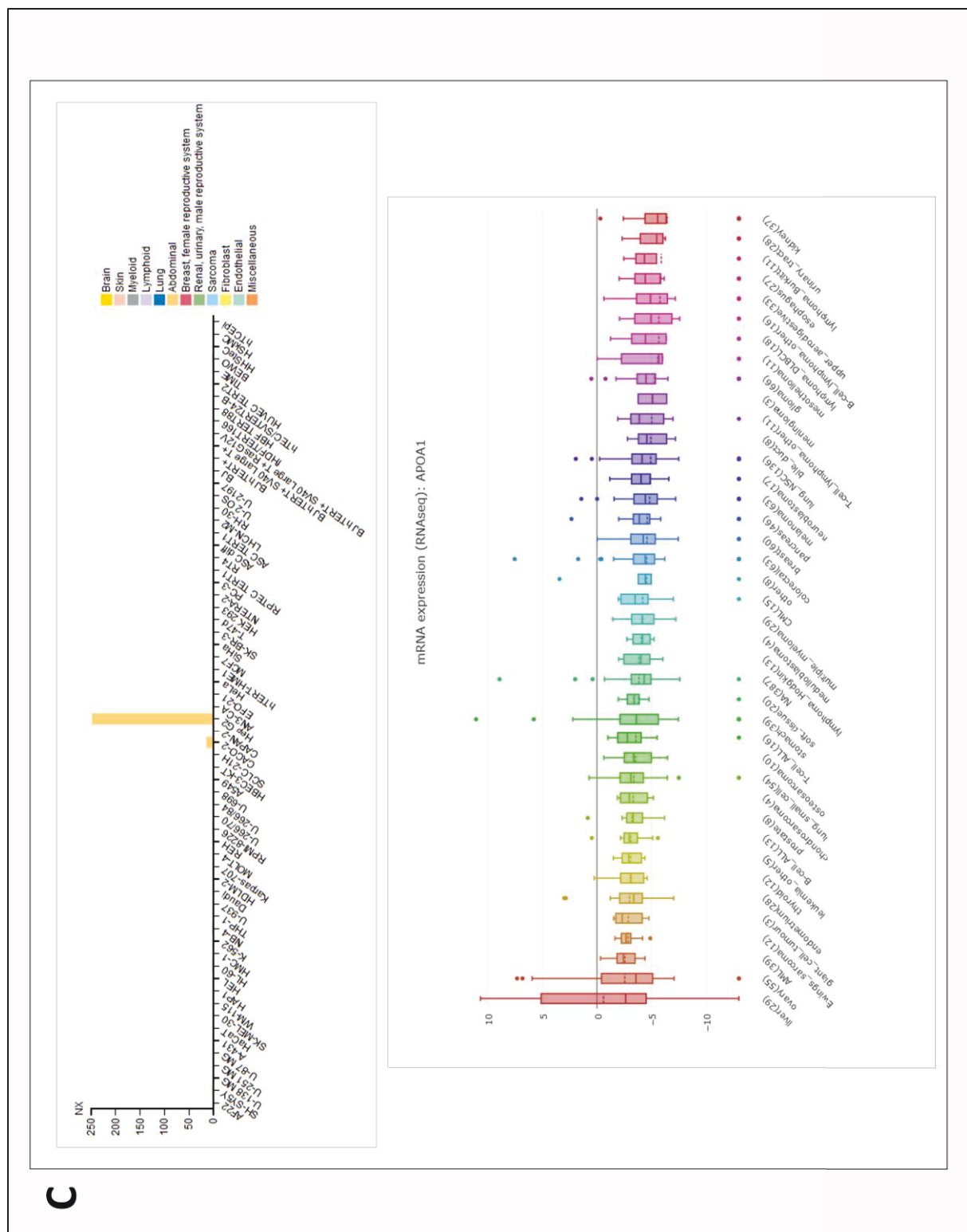
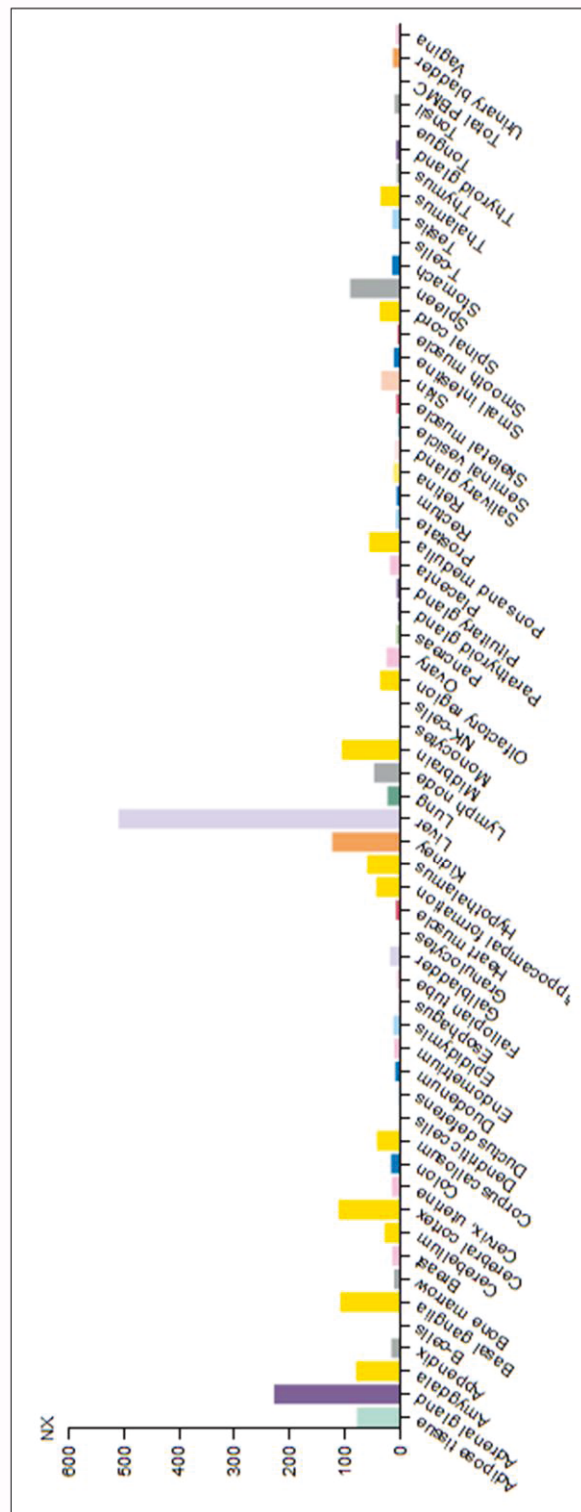


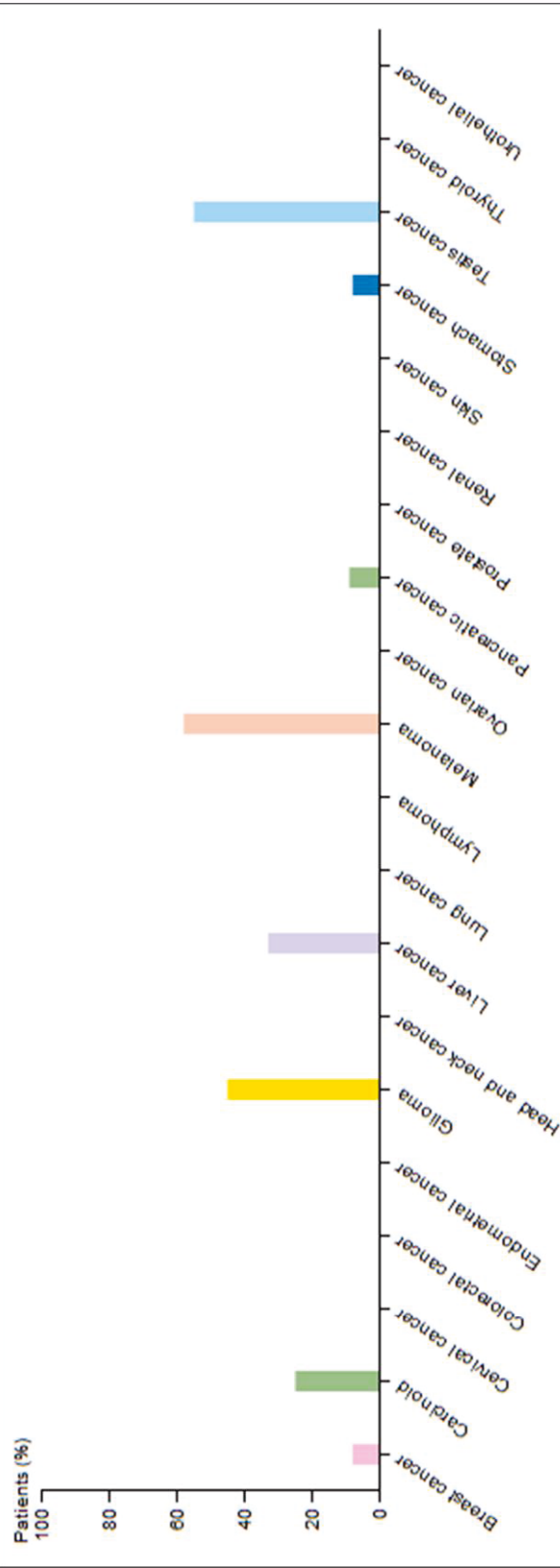
Figure 7 : Expression de l'apoA-I *in vivo* et *in vitro*. **7A :** Expression de l'apoA-I au niveau de l'ARNm dans les tissus sains (NX : Normalized eXpression). Les données présentées ici sont issues de la combinaison de trois sources différentes : le Human Protein Atlas (HPA), le projet Genotype-Tissue Expression (GTEx), et le projet FANTOM5 [418]. **7B :** Expression de l'apoA-I aux niveaux protéiques dans les différents types de cancer [418]. Les données protéiques pour tissus sains ne semblent pas être disponibles. **7C :** Expression de l'apoA-I dans différentes lignées cellulaires (en haut : l'expression dans chacune des lignées considérées individuellement, en bas : l'expression dans les lignées moyennée et regroupée par organe) [418].



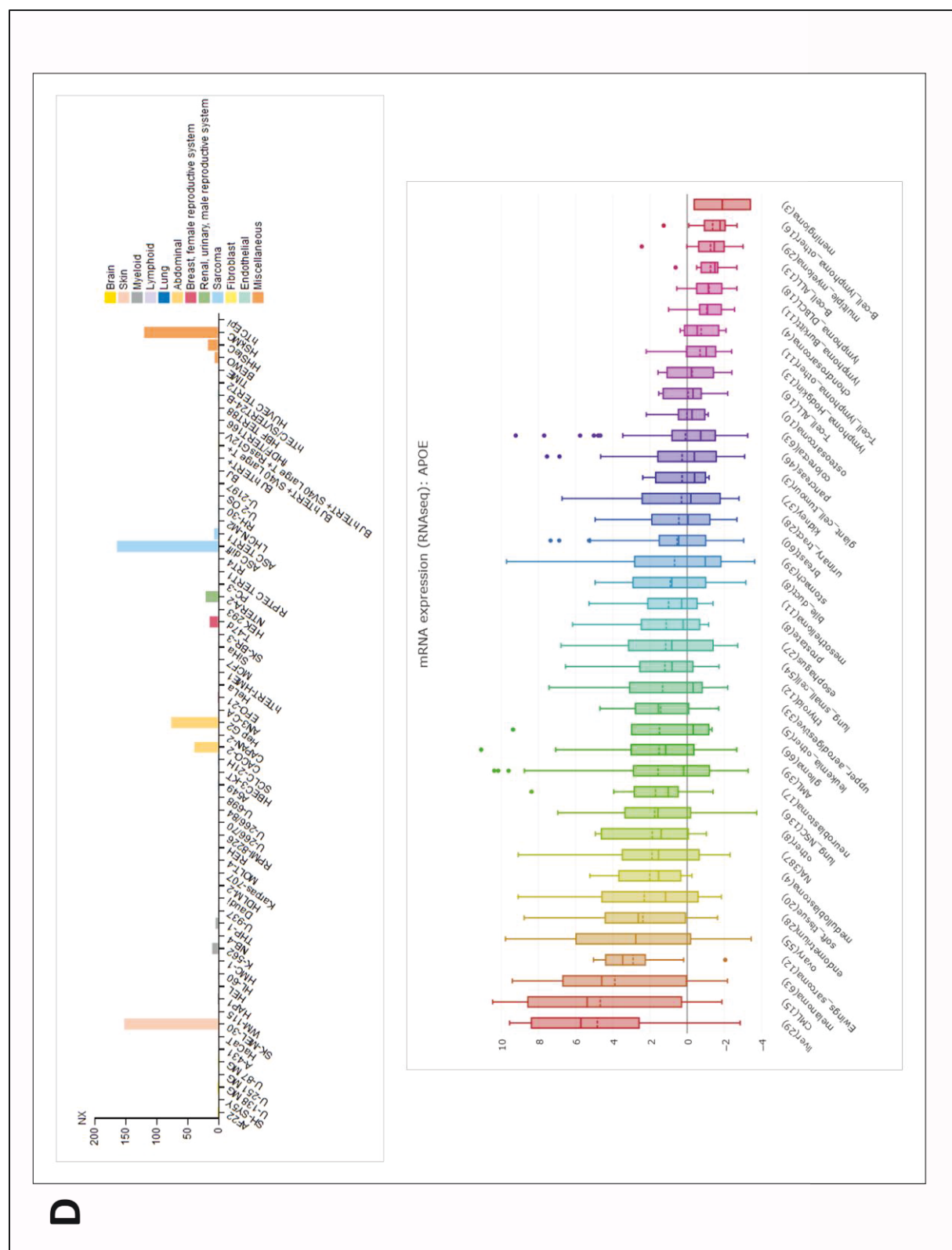
A



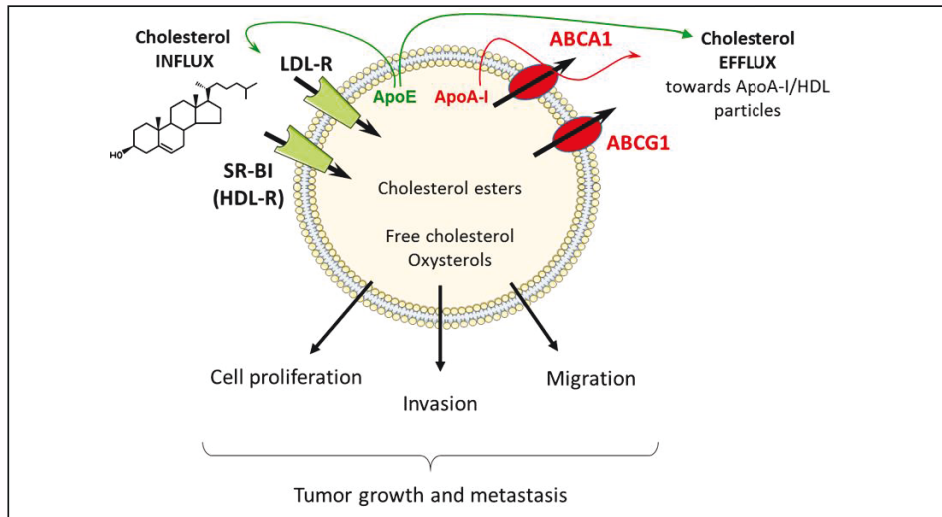
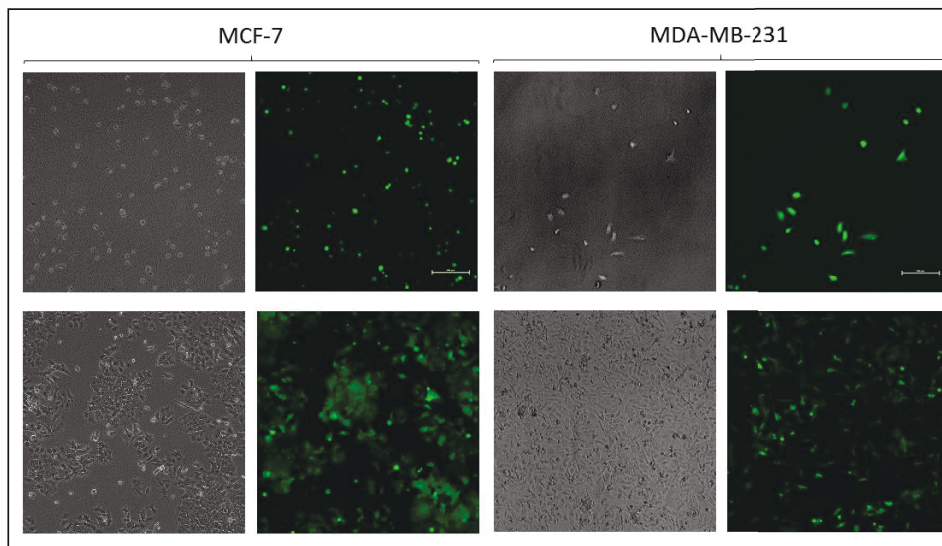
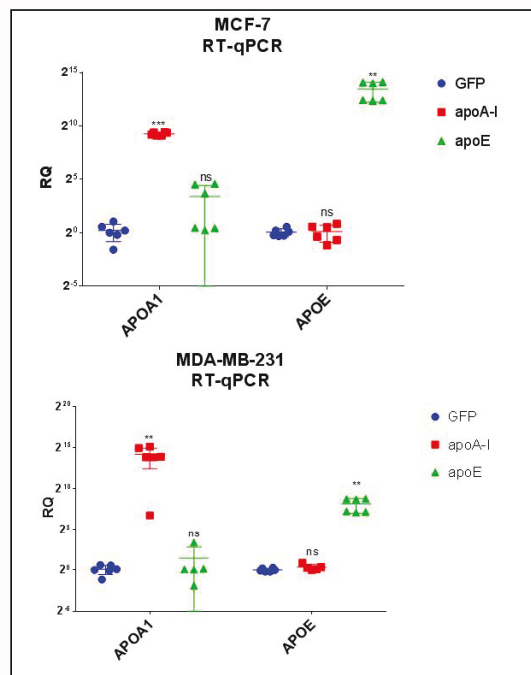
B



C



Pour avoir une idée de l'efficacité de la transfection, nous avons tout d'abord observé les cellules contrôles (c'est-à-dire les cellules transfectées uniquement avec l'ADN codant pour la GFP) au microscope pour vérifier leur niveau de fluorescence. La **Figure 9B** montre les cellules MCF-7 exprimant la GFP (à gauche) et les cellules MDA-MB-231 exprimant la GFP (à droite). A chaque fois, la première photographie (celle située au-dessus) a été prise quelques jours après la première sélection, et la seconde (celle située au-dessous) quelques semaines plus tard. Les cellules MCF-7-GFP sont fluorescentes dans leur globalité, la transfection a donc été efficace. En ce qui concerne les cellules MDA-MB-231-GFP, bien que la fluorescence ait tendance à être perdue avec le temps, une majorité d'entre elles est bien fluorescente quelques semaines après la transfection. L'expression de l'apoA-I et de l'apoE a ensuite été vérifiée à deux niveaux : au niveau de l'ARNm par RT-qPCR, et au niveau protéique par immunofluorescence. Comme attendu, aucune trace de l'apoA-I ou de l'apoE n'a été retrouvée dans les cellules contrôles n'exprimant que la GFP. En revanche, les MCF-7-apoA-I et les MDA-MB-231-apoA-I expriment bien l'apoA-I, et les MCF-7-apoE et les MDA-MB-231-apoE expriment bien l'apoE, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique.

A**B****C**

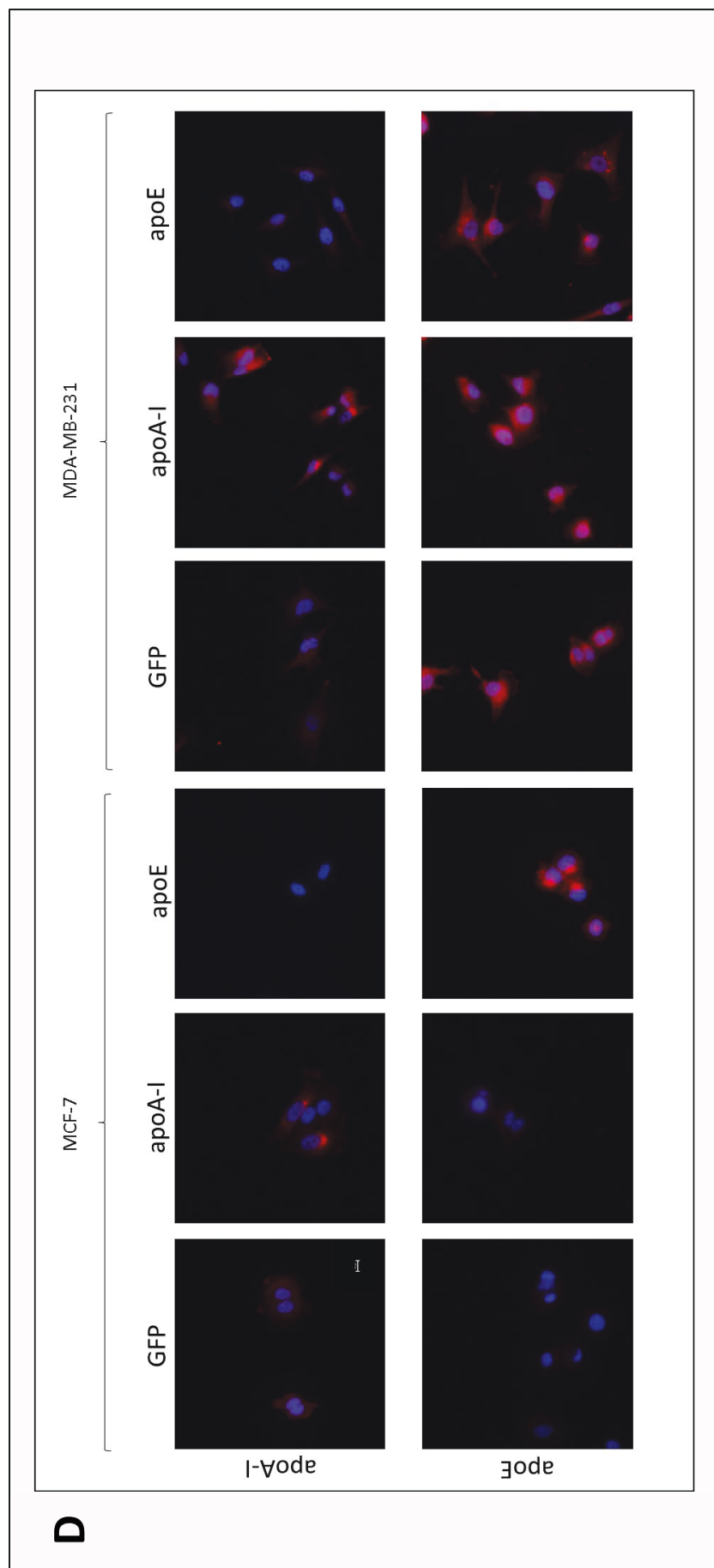


Figure 9 : Expression de l'apoA-I et de l'apoE dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. 9A : Schéma hypothétique des mécanismes attendus. En exprimant l'apoA-I, nous nous attendions à favoriser une sortie de cholestérol médiée par le transporteur ABCA1. En surexprimant l'apoE, nous nous attendions à favoriser une entrée ou une sortie de cholestérol. Dans chacun des cas, l'impact de l'une ou l'autre de ces apolipoprotéines sur le métabolisme du cholestérol visait à freiner (dans le cas de l'apoA-I, et potentiellement de l'apoE si cette dernière devait favoriser une sortie de cholestérol) ou stimuler (dans le cas où l'apoE devait favoriser une entrée de cholestérol) la croissance tumorale. **9B :** Visualisation de la fluorescence des cellules contrôles transfectées avec l'ADNc de la GFP. L'échelle représente 500μm. **9C :** Analyse de l'expression de l'apoA-I et de l'apoE au niveau de l'ARNm par RT-qPCR dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 transfectées (N=4 ; n=6). L'expression de l'apoA-I et de l'apoE est statistiquement significative dans le cas des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. **9D :** Analyse de l'expression de l'apoA-I et de l'apoE au niveau protéique par immunofluorescence. L'échelle représente 10 μm. Les noyaux cellulaires ont été colorés grâce au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et apparaissent en bleu, l'apoA-I ou l'apoE apparaissent en rouge.

2) L'apoA-I et l'apoE modifient le métabolisme du cholestérol des cellules MCF-7 et MDA-MB-231

Pour vérifier notre hypothèse principale, nous avons commencé par mesurer le contenu en cholestérol dans nos lignées. Si les différences observées ne sont pas statistiquement significatives, il existe tout de même une légère tendance à l'augmentation du contenu en cholestérol (total et libre) avec l'apoA-I dans les cellules MCF-7. L'apoE, en revanche, n'est pas responsable de changements significatifs en termes de contenu en cholestérol dans les cellules MCF-7. En GC apparaît même plutôt dans ces cellules une tendance à la diminution du contenu en cholestérol total. Les esters de cholestérol augmentent eux aussi dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I (tendance), mais ne sont pas impactés par l'expression de l'apoE (**Figure 10A**).

Les résultats portant sur les cellules MDA-MB-231 ne sont pas statistiquement significatifs non plus. En revanche, ils semblent différer de ce que nous retrouvons avec les cellules MCF-7. L'apoA-I tend, ici à augmenter le contenu en cholestérol total, et augmente le contenu en esters de cholestérol de façon marginalement significative ($p= 0,0507$), mais n'affecte pas le contenu en cholestérol libre. Aucun changement majeur n'est visible avec l'apoE au niveau du cholestérol total et du cholestérol libre, mais une légère augmentation du contenu en esters de cholestérol est peut-être à noter (**Figure 10A**).

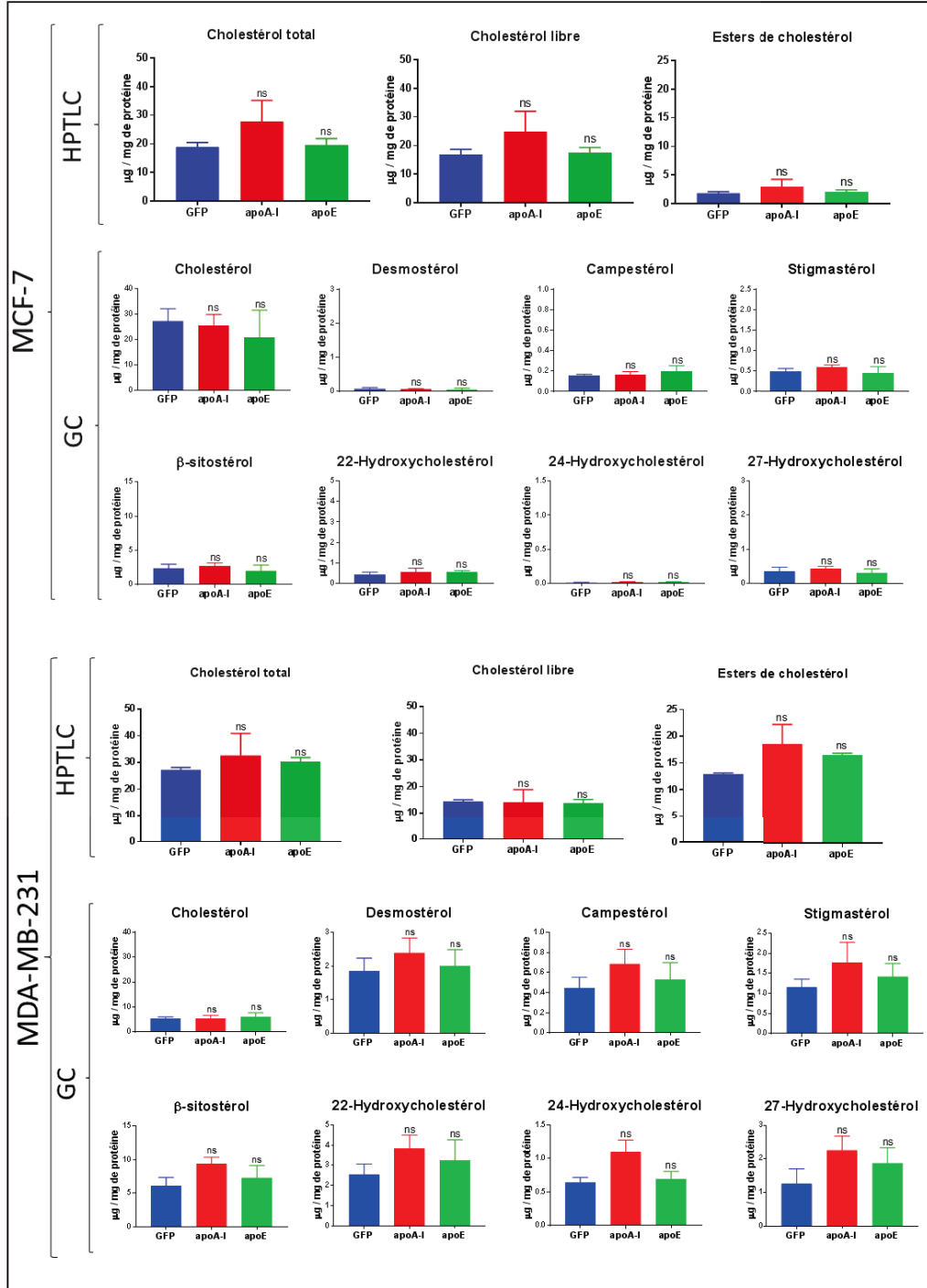
Au niveau des stérols, on n'observe dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I aucun changement majeur. De la même façon, dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE, les stérols ne sont pas grandement affectés : seul le contenu en campestérol tend à augmenter légèrement. Dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I, même si les niveaux de plusieurs stérols semblent augmenter (campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, 22-hydroxycholestérol, 24-hydroxycholestérol), seuls ceux du 27-hydroxycholestérol sont augmentés de façon marginalement significative ($p= 0,0507$) par rapport à la lignée contrôle. Dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE, le contenu en 27-hydroxycholestérol tend à augmenter légèrement, tous les autres demeurent inchangés. (**Figure 10A**).

Lorsque l'on observe les images obtenues après coloration à la filipine, on remarque qu'il semble exister une différence de répartition du cholestérol libre entre nos lignées contrôles et nos lignées d'intérêt. Ainsi, dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, le

contenu en cholestérol intracellulaire libre semble plus important que dans la lignée contrôle MCF-7 n'exprimant que la GFP. Dans les cellules MDA-MB-231, le constat est tout autre : si le contenu en cholestérol total semble là aussi plus élevé dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE que dans les cellules contrôles, le cholestérol semble davantage réparti au niveau de la membrane plasmique (**Figure 10B**).

Ces changements en termes de quantité ou de répartition du cholestérol, quoique parfois légers, semblent néanmoins avoir de réelles conséquences sur la nature de la membrane plasmique. En mesurant la fluidité membranaire, il apparaît en effet que les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I présentent une GP value plus faible que les cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP, ce qui signifie que la membrane plasmique des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I est plus fluide. La GP value des cellules MCF-7 exprimant l'apoE tend également à diminuer, mais de façon moins marquée, ce qui laisse à penser que la membrane plasmique de ces cellules pourrait elle aussi être moins rigide. Les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, en revanche, ne présentent pas de différence avec les cellules MDA-MB-231 n'exprimant que la GFP en termes de fluidité membranaire (**Figure 10C**).

A



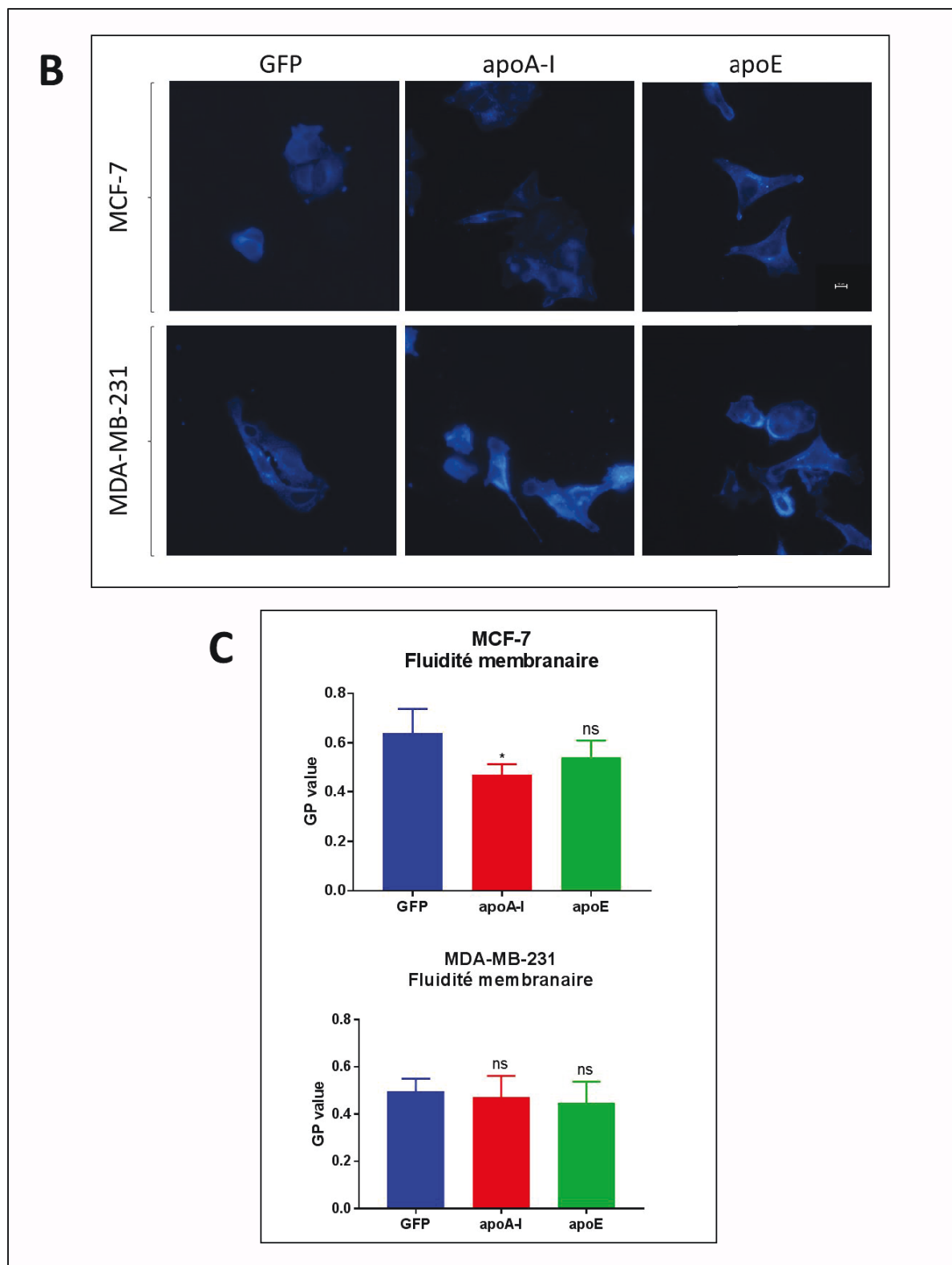


Figure 10 : L'apoA-I et l'apoE modifient le métabolisme du cholestérol des lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. 10A : Mesure du contenu cellulaire en cholestérol (total et libre) et en esters de cholestérol par HPTLC et mesure du contenu cellulaire en stérols par GC (N=3 ; n=3). **10B :** Coloration du cholestérol par la filipine (N=2 ; n=3). L'échelle représente 10µm. **10C :** Mesure de la fluidité membranaire grâce à la sonde di-4-ANE (N=3, n=4). En comparaison à une condition contrôle, une augmentation de la valeur de GP signifie que la membrane plasmique est plus rigide, tandis qu'une diminution de la valeur de GP signifie au contraire que la membrane plasmique est plus fluide.

3) L'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération des cellules MCF-7 mais diminuent celle des cellules MDA-MB-231

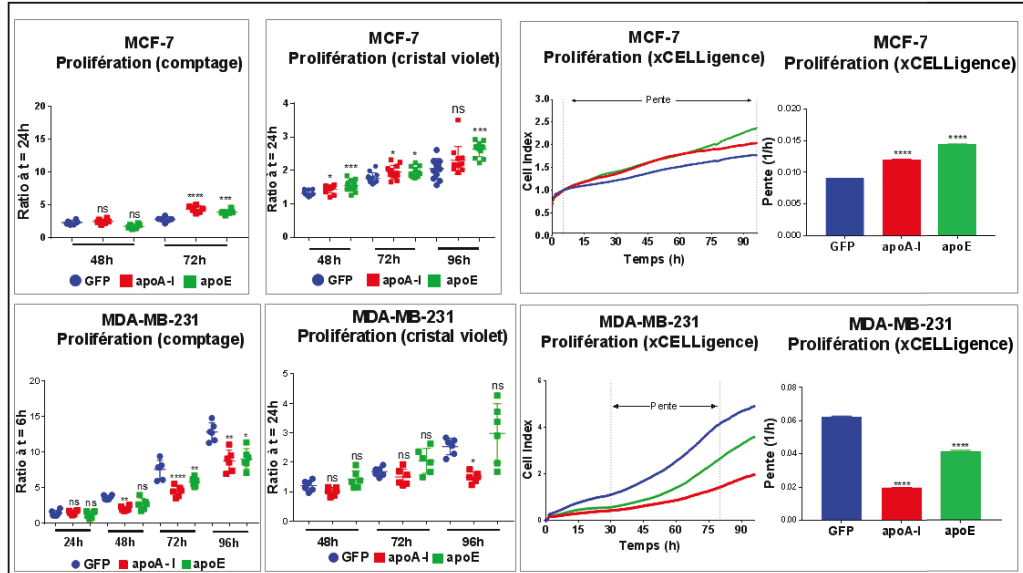
En mesurant la prolifération des cellules MCF-7 par comptage des cellules, on s'aperçoit que les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE prolifèrent davantage que les cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP (dès 48h pour les cellules MCF-7-apoE, et au bout de 72h de culture pour les cellules MCF-7-apoA-I). Lorsque la prolifération est évaluée par coloration au cristal violet suivie d'une mesure de l'absorbance, le constat précédent se vérifie dès les premières 48h suivant l'ensemencement, et se confirme sur toute la durée de l'expérience. Enfin, en mesurant la prolifération grâce au système xCELLigence (qui, pour rappel, repose sur une mesure de l'impédance grâce à des électrodes qui tapissent le fond du puits), la différence entre les lignées est d'autant plus flagrante : en mesurant la pente entre 6h et 96h, ce sont les cellules MCF-7 exprimant l'apoE qui présentent la vitesse de prolifération la plus élevée. Tous ces résultats convergent donc vers le fait que l'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération des cellules MCF-7 (**Figure 11A**).

Les résultats concernant les cellules MDA-MB-231 sont diamétralement opposés. En étude de prolifération par comptage, une diminution de la prolifération est observée pour les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I dès 48h après l'ensemencement. En prolifération par coloration au cristal violet, cela n'est vrai que 96h après ensemencement. En revanche, en prolifération par mesure de l'impédance et en calculant la pente sur la phase de croissance linéaire, soit ici entre 30 et 80h après ensemencement, la tendance à la diminution de la prolifération dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I est très largement confirmée, avec une vitesse de prolifération considérablement inférieure à celle des cellules MDA-MB-231 exprimant la GFP. En ce qui concerne les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE, les résultats obtenus sont un peu moins flagrants. Une tendance à la diminution de la prolifération existe et apparaît fortement significative avec le système xCELLigence, mais elle n'est constatée qu'au bout de 96h en prolifération par comptage, et n'est pas retrouvée du tout en coloration au cristal violet. De façon globale, nous pouvons conclure que l'apoA-I et l'apoE diminuent la prolifération des cellules MDA-MB-231 (**Figure 11A**).

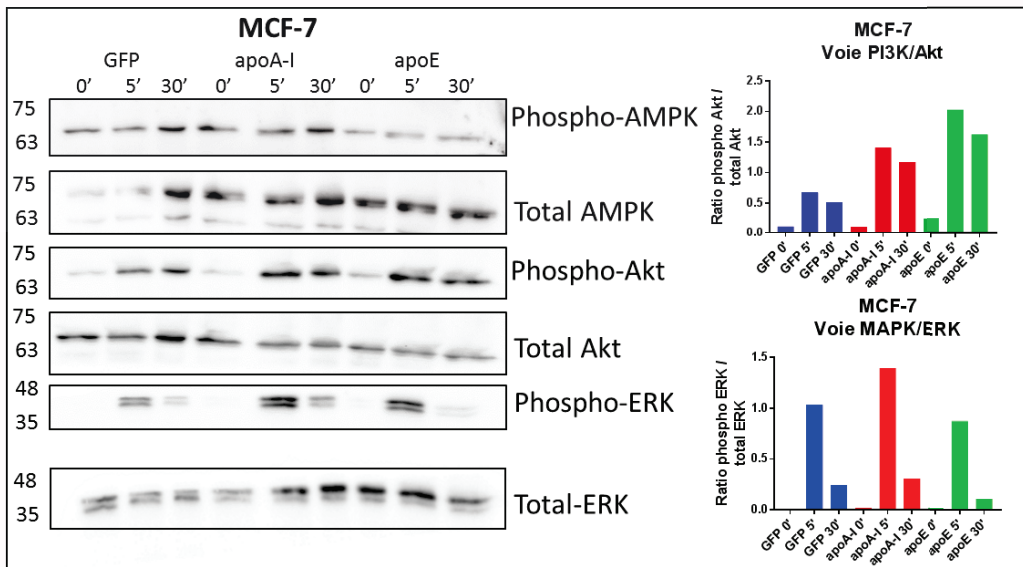
Nous nous sommes alors demandés quelles voies de signalisation étaient impliquées dans ces effets de l'apoA-I et de l'apoE sur la lignée MCF-7. Pour répondre à cette question, nous

avons stimulé la prolifération des cellules MCF-7 avec un milieu contenant 10% de SVF, après un sevrage de 24h dans un milieu sans sérum, et nous avons récolté les cellules au temps 0 puis après 5 et 30 minutes. En analysant ces échantillons par Western Blot, nous avons constaté que la voie AMPK n'était pas particulièrement impactée par l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE dans les cellules MCF-7. En revanche, la voie PI3K/Akt semble être suractivée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I comme dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE. La forme phosphorylée (et donc active) de la protéine Akt est en effet retrouvée en plus grande quantité dans ces lignées que dans la lignée contrôle n'exprimant que la GFP, et ce dès 5 minutes après stimulation de la prolifération. La voie MAPK/ERK1/2, elle aussi, est suractivée par l'expression de l'apoA-I dans les cellules MCF-7, puisque l'on retrouve une plus grande quantité de ERK dans sa forme phosphorylée (active) 5 minutes après stimulation de la prolifération (**Figure 11B**). Ce n'est en revanche pas le cas dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE. Inhiber les voies MAPK/ERK avec 10µM de l'inhibiteur spécifique U0126, ou PI3K/Akt avec 15µM de LY294002, permet de réduire drastiquement la prolifération de toutes les lignées MCF-7 mais impacte plus fortement les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE que les cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP, ce qui indiquerait que l'effet pro-prolifératif de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7 implique ces deux voies de signalisation. De plus, inhiber la voie PI3K/Akt ne se contente pas de freiner la prolifération : les pentes obtenues avec les inhibiteurs sont négatives, signe de mortalité cellulaire. La voie PI3K/Akt contribuerait donc également à la survie cellulaire (**Figure 11C**).

A



B



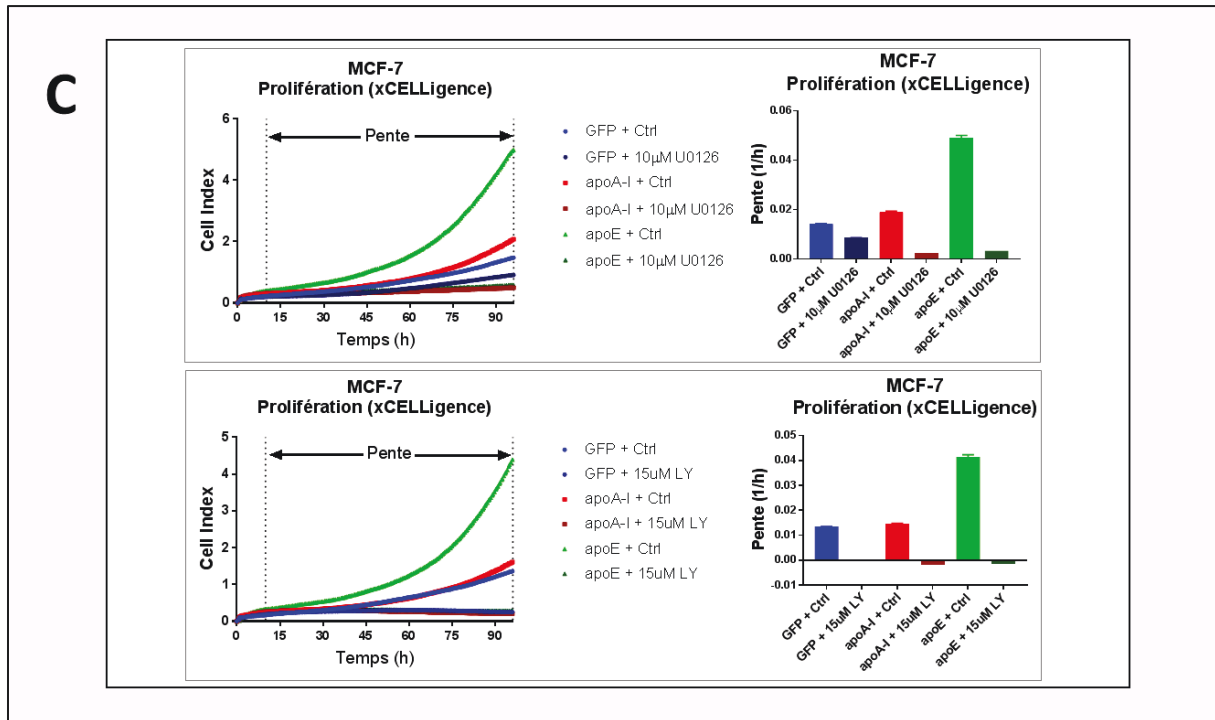


Figure 11 : L'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération des cellules MCF-7, mais diminuent la prolifération des cellules MDA-MB-231. 11A : Mesure de la prolifération par trois techniques différentes. A gauche : par comptage (N=3 ; n=6) ; au milieu : par coloration au cristal violet (N=3, n=12 pour les cellules MCF-7 ; N=3, n=6 pour les cellules MDA-MB-231) ; à droite : par mesure de l'impédance (xCELLigence) (N=3 ; n=5). En haut : les cellules MCF-7, en bas : les cellules MDA-MB-231. A chaque fois, les cellules sontensemencées dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF. Dans le cas de la mesure par comptage et par coloration au cristal violet, les résultats sont exprimés en ratio de la valeur correspondant à un temps 0 (6h ou 24h après ensemencement). **11B :** Analyse des voies de signalisation en réponse à un stimulus de prolifération (après ensemencement et sevrage à la BSA pendant 24h, la prolifération est stimulée en remplaçant le milieu de culture par un milieu DMEM contenant 10% de SVF). Seules sont représentées les cellules MCF-7. **11C :** Prolifération des cellules MCF-7 en présence d'inhibiteurs de la voie PI3K ou MAPK (N=1 ; n=3). En haut : inhibition de la voie MAPK avec 10 μ M d'U0126 ; en bas : inhibition de la voie PI3K avec 15 μ M de LY294002.

4) L'apoA-I et l'apoE stimulent la migration des cellules MCF-7 mais diminuent celle des cellules MDA-MB-231

Nous avons utilisé trois techniques de migration différentes, qui couvrent deux types de migration aux mécanismes distincts : la migration individuelle en inserts de migration, stimulée par un chimioattractant dans la partie inférieure des inserts (ici, un gradient 1% SVF -> 10% SVF), et la migration collective par cicatrisation, stimulée par la création d'une cicatrice au milieu du puits de culture.

La migration individuelle s'effectue sur 24h pour éviter que des phénomènes de prolifération cellulaire ne viennent s'ajouter aux phénomènes de migration. Dans le cas des inserts de migration (transwells), les cellules ayant migré sont colorées au cristal violet et comptées après 24h, soit à la toute fin de l'expérience, tandis qu'avec le système xCELLigence, il est possible de suivre le processus tout au long des 24h. Les cellules MCF-7 ne sont pas des cellules qui migrent beaucoup naturellement. Cela se confirme dans nos résultats, car au bout de 24h on dénombre très peu de cellules MCF-7 contrôles de l'autre côté de la membrane poreuse des inserts de migration. Par contre, l'apoA-I stimule très fortement la migration des cellules MCF-7, multipliant par quatre le nombre de cellules ayant migré, et par six la vitesse de migration en xCELLigence. L'apoE, quant à elle, stimule également la migration des cellules MCF-7, mais moins que l'apoA-I (**Figure 12A**). En migration par cicatrisation, les conclusions sont légèrement différentes : si l'apoA-I contribue là aussi à stimuler la migration, l'apoE, en revanche, n'a pas d'effet sur la migration des cellules MCF-7.

Les résultats des expériences menées sur les cellules MDA-MB-231 sont plus contrastés. Avec les inserts de migration conventionnels (transwells), l'apoA-I et l'apoE n'ont pas d'effet sur la migration individuelle. Avec le système xCELLigence, en revanche, les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I et l'apoE migrent moins vite que les cellules MDA-MB-231 n'exprimant que la GFP (**Figure 12B**). Enfin, en migration par cicatrisation, l'apoA-I diminue la migration des cellules MDA-MB-231, tandis que l'apoE, au contraire, la stimule légèrement.

Inhiber la voie MAPK/ERK avec l'inhibiteur U0126 n'a pas d'effet sur la migration des cellules MCF-7 exprimant l'apoE (**Figure 12D**). En revanche, cela augmente la migration des

cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I (et des cellules MCF-7 contrôles, mais de façon moins prononcée). Inhiber la voie PI3K avec l'inhibiteur LY294002 a des conséquences très similaires. L'implication des voies PI3K/Akt et MAPK/ERK dans les effets pro-migratoires de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7 n'est donc pas clairement définie au vu de ces résultats, et des expériences complémentaires (inhiber ces voies de signalisation à d'autres niveaux, éteindre la cavéoline-1 ou SRB1 pour découvrir si ces deux protéines jouent ici un rôle dans la régulation de ces voies, etc) seraient nécessaires pour l'élucider parfaitement.

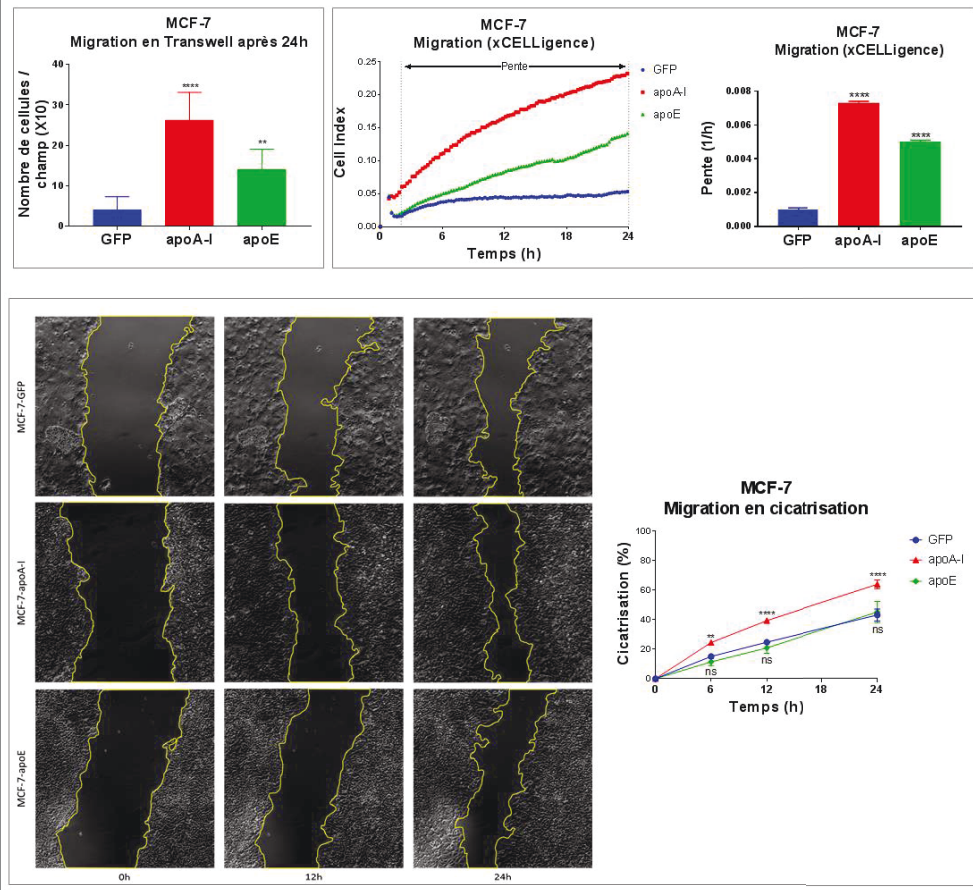
5) L'apoA-I et l'apoE stimulent l'invasion des cellules MCF-7 et MDA-MB-231

L'invasion a été étudiée comme la migration individuelle, en inserts, avec un gradient de sérum (1% SVF → 10% SVF), et pendant 24h. Les cellules MCF-7 ne sont pas des cellules naturellement invasives, contrairement aux cellules MDA-MB-231. Comme pour la migration individuelle, l'apoA-I, mais pas l'apoE, stimule l'invasion des cellules MCF-7, mais le nombre de cellules capables d'envahir la matrice et de traverser les pores reste faible même avec l'apoA-I en comparaison des cellules MDA-MB-231. En revanche, et ceci est un résultat qui tranche avec les résultats précédents portant sur la migration, l'apoA-I et l'apoE stimulent très fortement l'invasion des cellules MDA-MB-231. L'apoE, en particulier, multiplie par cinq le nombre de cellules capables de traverser l'insert en 24h (**Figure 12C**).

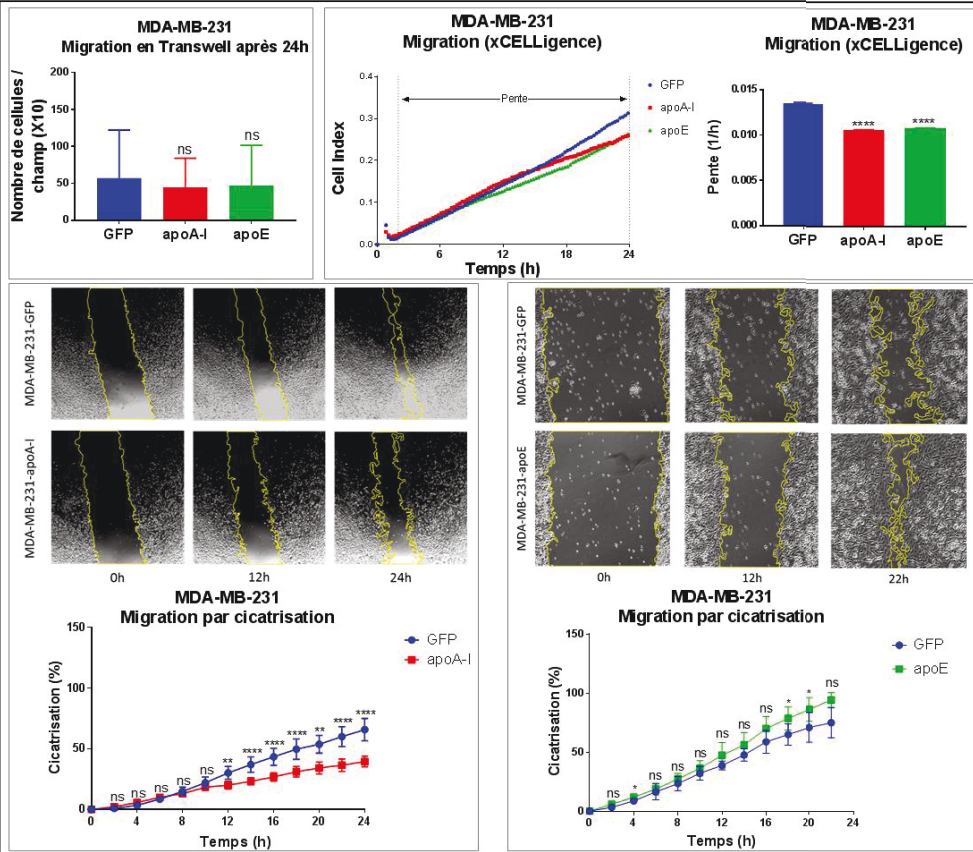
MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 et MT1-MMP sont des métalloprotéinases impliquées dans la destruction de la matrice extra-cellulaire, tandis que TIMP1 et TIMP2 sont des inhibiteurs des métalloprotéinases. L'ensemble de ces protéines régule l'invasion des cellules cancéreuses. En ce qui concerne les niveaux des ARNm correspondant à ces protéines, dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, les ARNm codant MMP2, MMP9, MT1-MMP, et TIMP1 sont sous-exprimés et ceux de MMP1 et de TIMP2 tendent à être sous-exprimés, tandis que celui de MMP7 tend à être sur-exprimé (**Figure 13B**). Dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE, on observe une tendance à la diminution de l'expression des ARNm codant pour MMP2, MMP9, MT1-MMP et TIMP1, une tendance à l'augmentation de l'expression génique de MMP1 et MMP7, et aucun changement d'expression génique pour TIMP2. Dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I, nous avons observé une diminution de l'expression du gène codant pour la protéine MMP2, et une tendance à la diminution de

l'expression génique de MMP7, MMP9, MT1-MMP et TIMP2, tandis que la transcription du gène codant pour la protéine MMP1 tendait à être très fortement augmentée, et celle de TIMP1 inchangée. Dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE, l'expression génique de MT1-MMP, TIMP1 et TIMP2 est diminuée tandis que l'expression génique de MMP1, MMP7, et MMP9 tendent elles aussi à diminuer, et que celle de MMP2 n'est pas impactée. Il est possible d'envisager que l'augmentation de l'expression génique de MMP1 combinée à la diminution de celle de TIMP1 conduise à stimuler l'invasion des cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I. Par contre, la diminution de l'expression génique de TIMP1 et TIMP2 pourrait être responsable de l'effet de l'apoE sur l'invasion dans cellules MDA-MB-231.

A



B



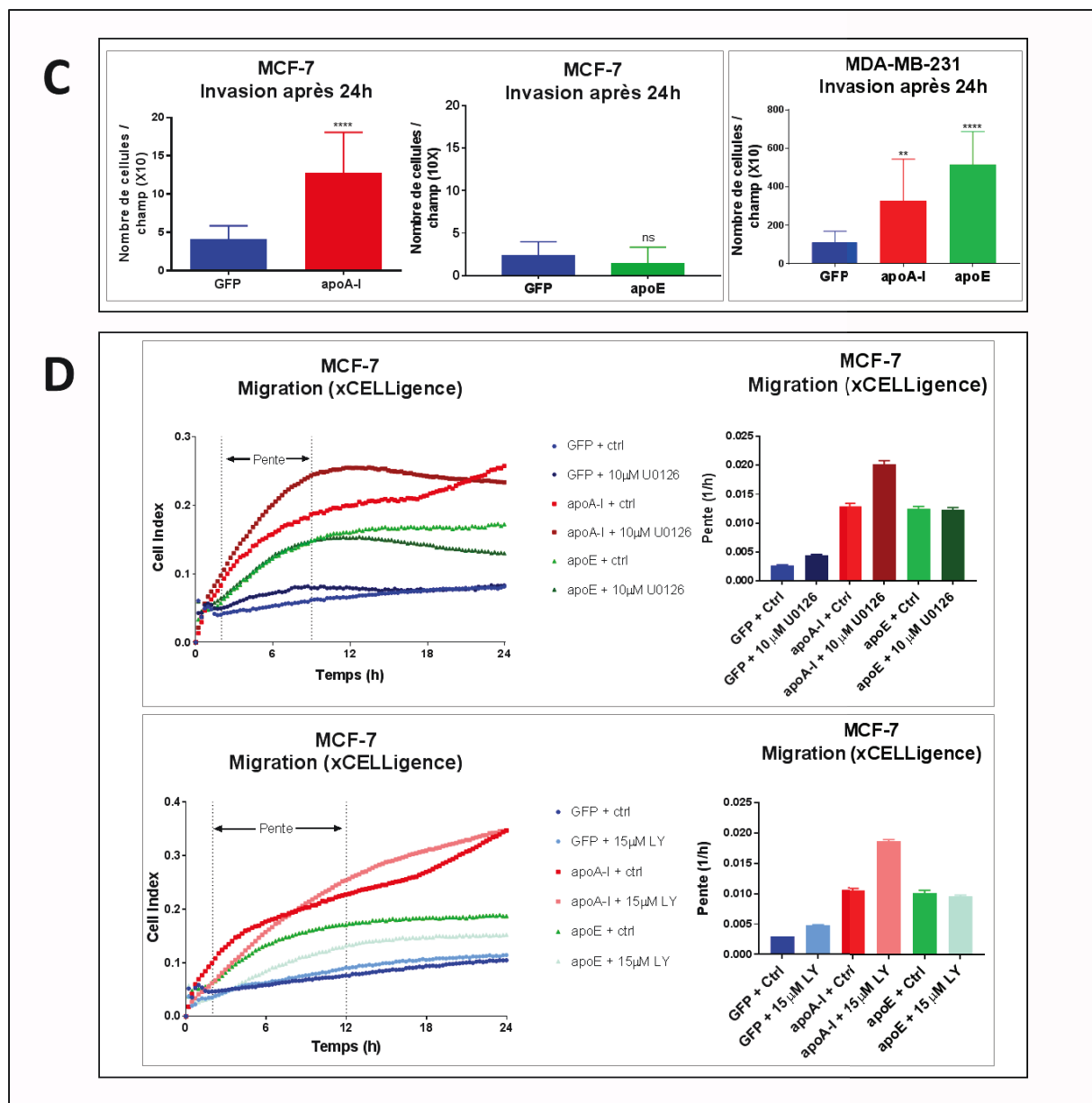


Figure 12 : L'apoA-I et l'apoE modifient les propriétés migratoires et invasives des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. **12A :** Migration des cellules MCF-7. Les cellules sont ensemencées dans des inserts de migration standards (à gauche ; N=3, n=15) ou conçus pour le système xCELLigence (à droite ; N=3 ; n=5) et soumises à un gradient de sérum 1% SVF → 10% SVF, ou ensemencées à confluence avant sevrage (milieu DMEM contenant 0,1% de BSA pendant 24h) puis cicatrisation le lendemain (en bas ; N=3, n=3). La migration par cicatrisation est stimulée par du milieu DMEM contenant 10% de SVF. **12B :** Migration des cellules MDA-MB-231 (N=3, n=15 pour les inserts de migration ; N=3, n=5 pour le système xCELLigence ; N=3, n=6 pour la migration par cicatrisation). **12C :** Invasion des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (N=3, n=10 ou 15 selon les conditions). Les cellules sont là aussi soumises à un gradient de sérum 1% SVF → 10% SVF. **12D :** Migration des cellules MCF-7 en système xCELLigence, en présence d'un inhibiteur de la voie MAPK (U0126, 10µM) ou PI3K (LY294002, 15µM) dans les parties inférieures et supérieures de l'insert (N=1 ; n=3).

6) L'apoA-I et l'apoE stimulent la Transition Épithélio-Mésenchymateuse des cellules MCF-7

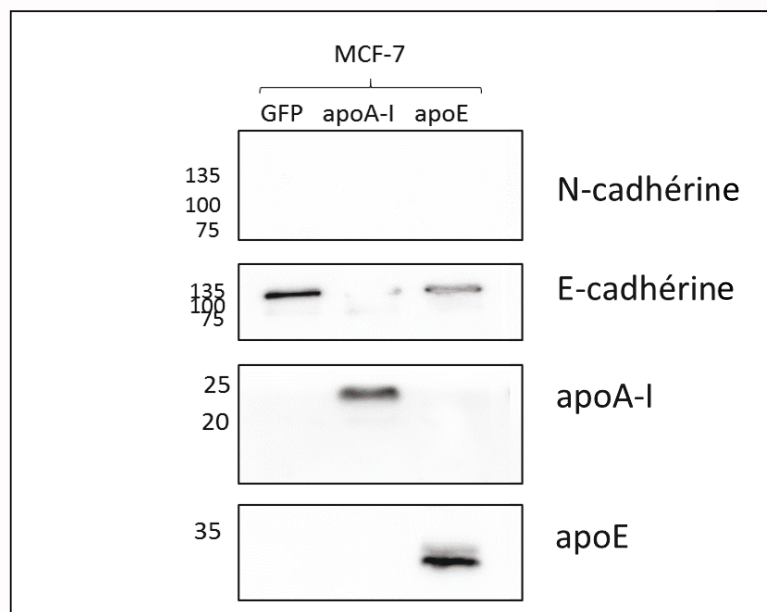
Pour vérifier l'état de la transition épithélio-mésenchymateuse dans nos lignées, nous avons analysé par RT-qPCR et Western-Blot l'expression de certains ARNm et des protéines correspondantes phares du phénomène de TEM. Ainsi, si la N-cadhérine n'est exprimée dans aucune des lignées MCF-7 au niveau protéique, la E-cadhérine est moins exprimée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE que dans les cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP (**Figure 13A**). Cela pourrait signifier qu'en exprimant l'apoA-I ou l'apoE dans les cellules MCF-7, nous avons déclenché une transition épithélio-mésenchymateuse, qui peut être mise en relation avec les effets pro-migratoires que nous observons, mais qui serait incomplète puisque les cellules ne vont pas jusqu'à exprimer la N-cadhérine. Au niveau de l'ARNm, la diminution de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE est confirmée (**Figure 13B**). Nous constatons aussi, dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, peu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la fibronectine (marqueur de l'adhésion à la matrice extracellulaire), et une tendance à l'augmentation de l'expression génique de la vimentine (marqueur mésenchymateux), de SNAIL2 (facteur de transcription qui est un marqueur de la TEM), mais pas de changement d'expression génique de ZEB1 (autre marqueur de la TEM). Dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE, nous observons une augmentation de l'expression génique de la vimentine et de SNAIL2, une tendance à l'augmentation de l'expression génique de la fibronectine, mais pas de changement d'expression génique de ZEB1. Tous ces résultats convergent vers l'idée d'une stimulation de la TEM dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE (**Figure 13B**).

Stimuler la TEM avec du TGF- β semble avoir davantage d'efficacité sur les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE que sur leurs homologues contrôles (**Figure 13C**). Ainsi, l'expression de la N-cadhérine tend à augmenter dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, tandis qu'elle demeure inchangée dans les cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP. L'expression de la E-cadhérine tend à diminuer dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, mais pas dans celles exprimant l'apoE. Le TGF- β augmente l'expression génique de la vimentine dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE, alors que ce n'est pas le cas dans les autres lignées. Cette expérience permet également de constater que l'expression génique de la N-cadhérine est augmentée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE (tendance).

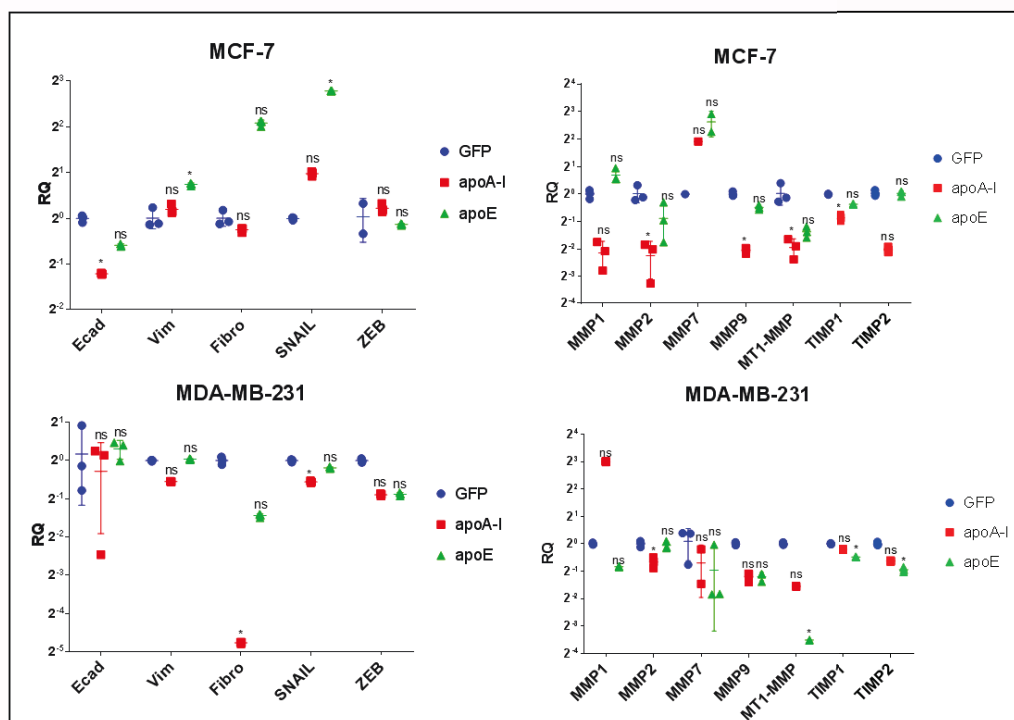
7) L'apoA-I et l'apoE inhibent la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules MDA-MB-231

Au niveau de l'ARNm, certains changements appuient l'idée que l'apoA-I et l'apoE inhibent la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules MDA-MB-231, ce qui va de paire avec le constat que l'apoA-I comme l'apoE ralentissent la migration de ces mêmes cellules. En effet, on constate dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I une tendance à la diminution de l'expression génique de la vimentine et de ZEB1, et une diminution confirmée de l'expression génique de SNAIL2 et surtout de la fibronectine (**Figure 13B**). Aucun changement n'a en revanche été remarqué au niveau de l'expression de la E-cadhérine. Dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE, si aucun changement drastique n'est observé en ce qui concerne l'expression génique de la E-cadhérine, de la vimentine, ou de SNAIL2, nous avons retrouvé une tendance à la diminution pour la fibronectine et ZEB1.

A



B



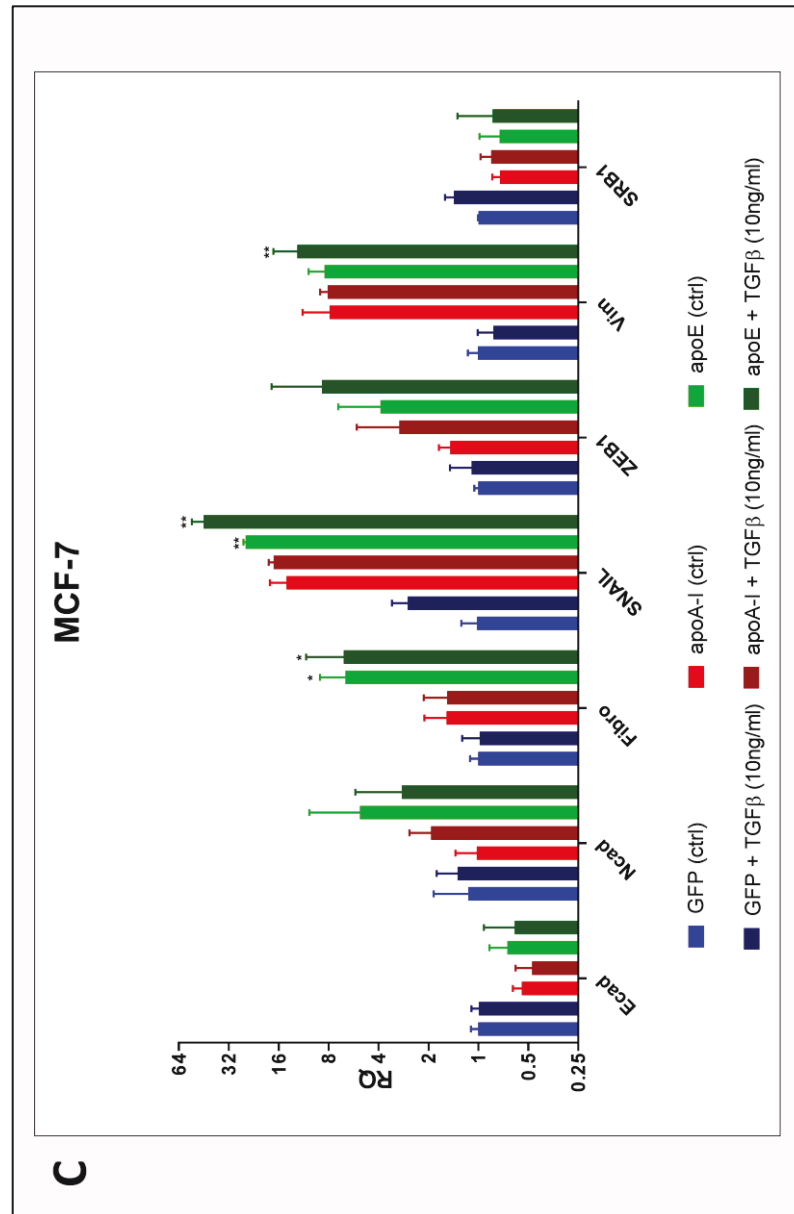


Figure 13 : Evaluation de l'impact de l'apoA-I et de l'apoE sur l'expression d'ARNm et des protéines correspondantes phares du phénomène de Transition Epithélio-Mésenchymateuse et de l'invasion dans les cellules MCF-7. 13A : Mesure de l'expression des protéines de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse au niveau protéique (Western-Blot ; N=2, n=1). **13B :** Mesure de l'expression des protéines de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse et de protéines impliquées dans le phénomène d'invasion au niveau de l'ARNm (RT-qPCR ; N=3, n=3). **13C :** Mesure de l'expression de protéines de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse au niveau de l'ARNm dans les cellules MCF-7, en présence de TGF-β. Ici, chaque condition est comparée à son équivalent avec les cellules contrôles, et seules sont indiquées les différences statistiquement significatives (N=3, n=4).

8) L'apoA-I et l'apoE semblent modifier la réponse au traitement à la doxorobucine des cellules MDA-MB-231

Nous avons étudié la résistance à la doxorobucine dans deux conditions : après 48h de traitement, ou après 7 jours de traitement. Pour cela, les cellules sont ensemencées à faible confluence dans des plaques de 96 puits, puis à l'issue du traitement, elles sont colorées au cristal violet. Le colorant est ensuite dissous dans de l'acide acétique et l'absorbance est mesurée. Pour chacune des lignées et pour chaque condition sont calculés deux ratios : un premier ratio en divisant la valeur de l'absorbance à la valeur de l'absorbance initiale (obtenue 24h après l'ensemencement et considérée comme un temps 0), et un deuxième ratio en divisant la valeur du premier ratio à celui de la condition contrôle sans doxorobucine. Une IC_{50} peut alors être calculé : il ne correspond pas, comme au sens conventionnel, à la concentration nécessaire pour tuer 50% des cellules, mais à la concentration permettant de diminuer de moitié la valeur du ratio final.

En se basant sur ces calculs, il est possible de constater qu'après 48h de traitement comme après 7 jours de traitement, aucune différence significative n'est observée quant à la résistance à la doxorobucine des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE comparées à leurs homologues contrôles (**Figure 14A**). En revanche, au bout de 48h de traitement comme au bout de 7 jours de traitement, les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I tendent à s'avérer plus résistantes que les cellules MDA-MB-231 n'exprimant que la GFP ($IC_{50} = 1,389\mu M$ contre $IC_{50} = 711,3nM$ au bout de 48h, $IC_{50} = 159,2nM$ contre $90,05nM$ au bout de 7 jours, **Figure 14A**), bien que ces résultats ne soient pas statistiquement significatifs. Il en va de même pour les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE ($IC_{50} = 1,171\mu M$ au bout de 48h, $IC_{50} = 117nM$ au bout de 7 jours).

La **Figure 14B** montre l'évolution du ratio final en fonction de la dose de doxorobucine des trois lignées MCF-7 en présence d'un inhibiteur du récepteur aux œstrogènes (Fulvestrant, utilisé à une concentration de $100nM$), ou d'un inhibiteur de ABCA1 (Glyburide, utilisé à une concentration de $100\mu M$ [419, 420, 421, 422]), au bout de 48h de traitement. Ces graphiques, il faut le préciser, ne sont le résultat que d'une expérience préliminaire qui n'a pas encore été répétée. Toutefois, il ressort de cette expérience qu'avec l'inhibiteur Fulvestrant, les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I seraient moins résistantes qu'en condition contrôle ($IC_{50} = 701,2nM$ contre $1,257\mu M$ en condition contrôle), ce qui laisse supposer que le fait d'inhiber le récepteur ER pourrait diminuer la résistance à la doxorobucine des cellules MCF-

7 exprimant l'apoA-I, et donc que l'augmentation de la résistance que l'on observe dans ces cellules pourrait impliquer le récepteur ER. En revanche, l'inhibiteur Glyburide ne modifierait pas de façon conséquente la sensibilité à l'agent chimiothérapeutique des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ($IC_{50} = 1,252\mu M$), ce qui suggère que le transporteur ABCA1 n'est pas impliqué dans le phénomène de résistance à la doxorubicine des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I. Avec l'inhibiteur Fulvestrant, les cellules MCF-7 exprimant l'apoE seraient plus résistantes qu'en condition contrôle ($IC_{50} = 529,5nM$ contre $155,7nM$ en condition contrôle), ce qui laisse supposer que le fait d'inhiber le récepteur ER pourrait augmenter la résistance des cellules MCF-7 exprimant l'apoE, et donc que l'augmentation de la sensibilité que l'on observe dans ces cellules pourrait impliquer le récepteur ER. L'inhibiteur Glyburide a le même effet sur ces cellules ($IC_{50} = 729,9nM$), il est donc possible d'imaginer que le transporteur ABCA1 soit lui aussi impliqué dans la sensibilité à la doxorubicine des cellules MCF-7 exprimant l'apoE. Il est intéressant de noter que ni le fait d'inhiber le récepteur ER, ni le fait d'inhiber le transporteur ABCA1 ne semble en revanche impacter la sensibilité à la doxorubicine des cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP ($IC_{50} = 419,8nM$ en présence de Fulvestrant et $475,1nM$ en présence de Glyburide contre $357,1nM$ en condition contrôle).

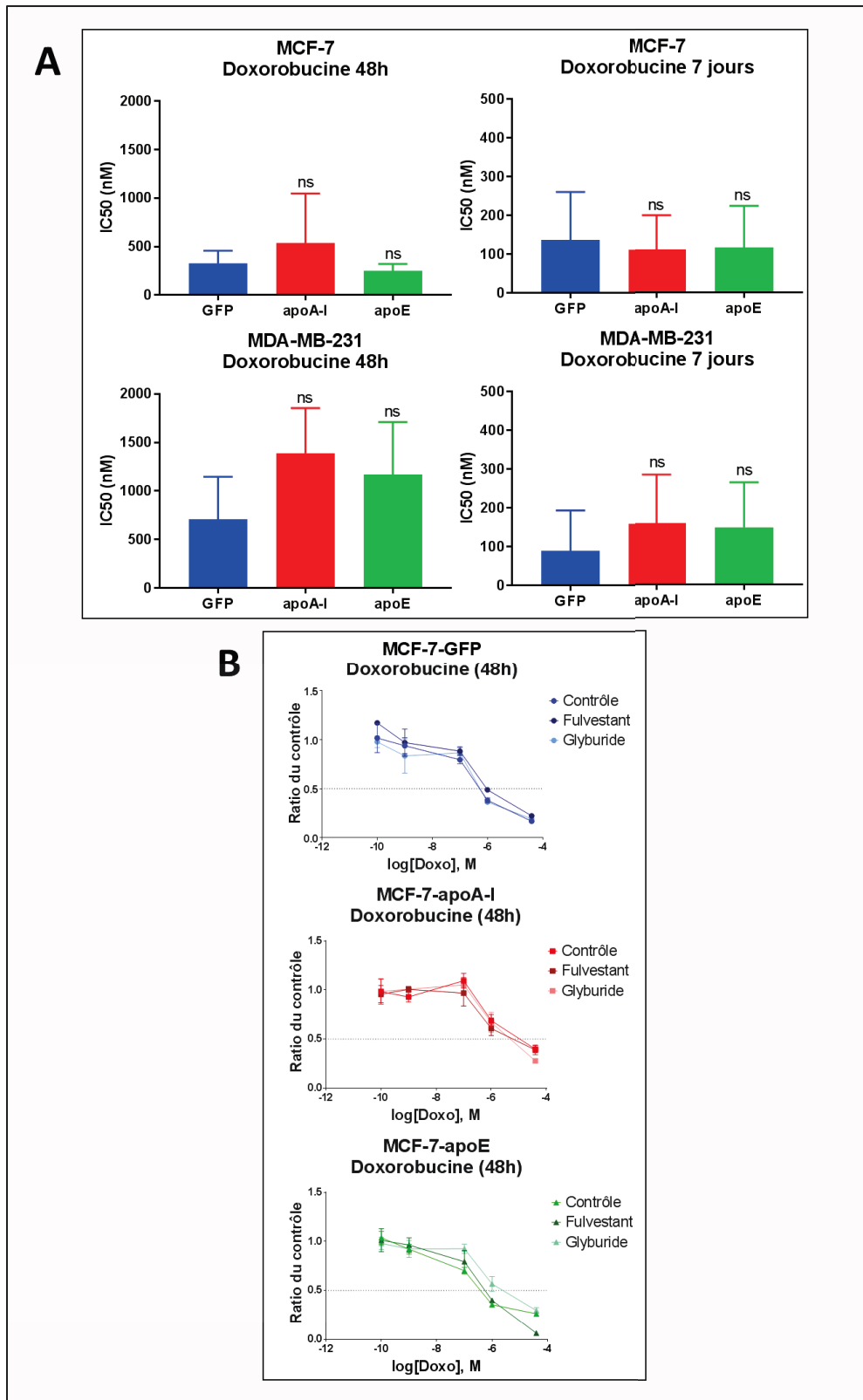


Figure 14 : Etude de la résistance des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE à la doxorobucine. 14A : Impact de l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE sur la résistance des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 après 48h ou 7 jours de traitement (N=3, n=4). **14B :** Modification de la sensibilité à la doxorobucine des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE en présence d'un inhibiteur du récepteur à œstrogènes (Fulvestrant) ou d'un inhibiteur du transporteur ABCA1 (Glyburide,). Cette dernière expérience est une expérience préliminaire n'ayant été réalisée qu'une seule fois (N=1, n=4).

9) Les effets de l'apoA-I et de l'apoE impliquent différentes protéines régulant le métabolisme du cholestérol

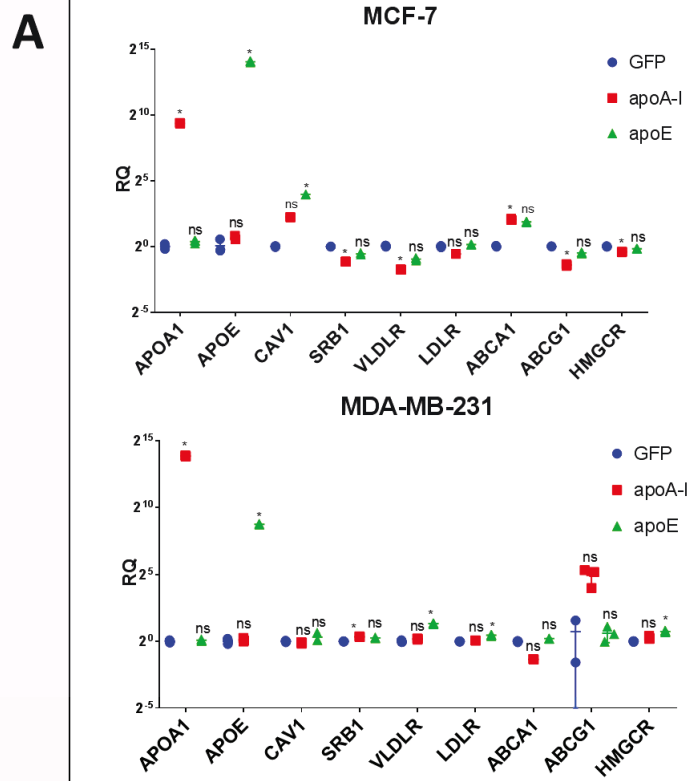
Après avoir mis en évidence les effets de l'apoA-I et de l'apoE sur la stimulation ou l'inhibition du phénotype cancéreux des cellules MCF-7 et MDA-MB-231, et certains des mécanismes impliqués, nous nous sommes demandés quels partenaires protéiques participant au métabolisme du cholestérol opéraient de concert avec elles, ou tout du moins, quelles protéines voyaient leur expression se modifier en présence de l'apoA-I ou de l'apoE. Pour cela, nous avons vérifié l'expression au niveau de l'ARNm (RT-qPCR, **Figure 15A**) et au niveau protéique (Western-Blot, **Figure 15B**) de certains acteurs phares du métabolisme du cholestérol.

Au niveau de l'ARNm, dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I : la transcription d'ABCA1 est surexprimée, tandis que celles de SRB1, VLDLR, ABCG1 et HMGCR sont sous-exprimées. Il existe également une forte tendance à l'augmentation de l'expression génique de la cavéoline-1 (**Figure 15A**). Dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE, l'expression génique de la cavéoline-1 est là aussi augmentée, et celles de SRB1, VLDLR, LDLR, ABCG1 et HMGCR ne sont pas modifiées. On observe également dans ces cellules une tendance à l'augmentation de la transcription de ABCA1. Au niveau protéique, les résultats ne vont pas forcément dans le même sens : dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, les niveaux de LDLR sont plus élevés et les niveaux de SRB1 paraissent un peu plus élevés que dans les cellules contrôles (**Figure 15B**). En revanche, on retrouve bien, dans ces cellules, une diminution de l'expression de ABCG1, et surtout une augmentation flagrante de l'expression de la cavéoline-1. Dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE, il semble qu'au niveau protéique l'expression du LDLR diminue, tout comme celle de ABCG1, tandis que l'expression de SRB1 augmente, ce que l'on ne retrouvait pas au niveau de l'ARNm. Par contre, l'expression de la cavéoline-1 est effectivement très fortement surexprimée.

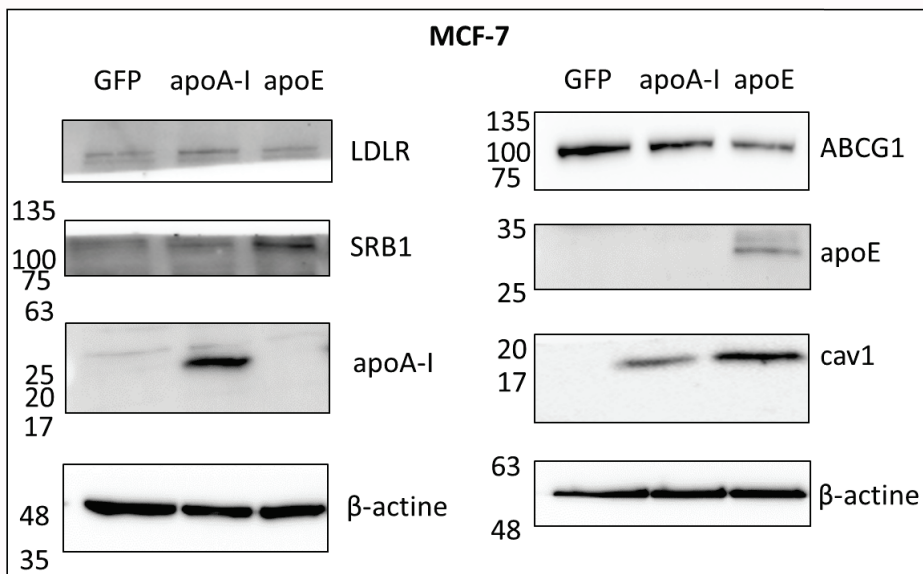
Au niveau de l'ARNm, dans les cellules MDA-MB-231 qui expriment l'apoA-I, l'expression génique de SRB1 augmente, et celle de ABCG1 tend à augmenter (**Figure 15B**). Dans le même temps, l'expression génique de ABCA1 tend à diminuer légèrement, et celle de la cavéoline 1 et du LDLR demeurent inchangées. Dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE, les résultats sont assez similaires : l'expression génique de VLDLR, LDLR et HMGCR augmentent, tandis que l'expression génique de la cavéoline-1, de l'ABCA1 et de l'ABCG1 ne varient pas. En immunofluorescence, il apparaît néanmoins que la distribution de

la cavéoline-1 est modifiée dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I et plus encore dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE : elle se répartit en effet davantage au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau intra-cellulaire (**Figure 15C**).

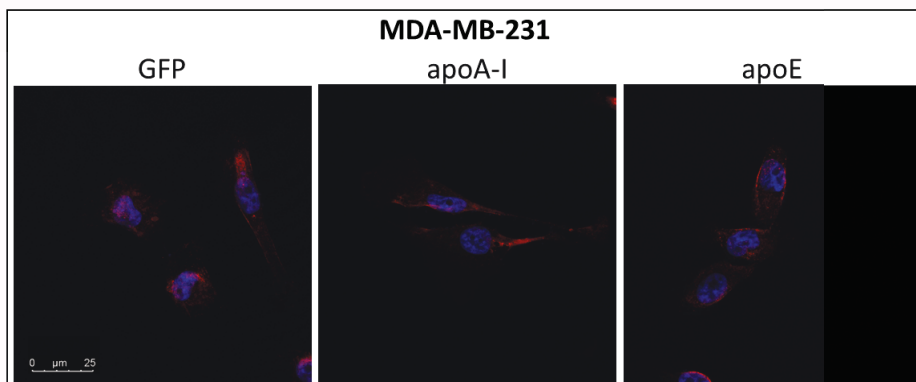
La cavéoline-1 pourrait jouer un rôle majeur dans les effets pro-migratoires de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7. En effet, en éteignant l'expression de la cavéoline-1 avec un siARN dirigée spécifiquement contre elle, on tend à diminuer la migration des cellules MCF-7 exprimant l'apoE (résultat non significatif), et on diminue significativement celle des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I (**Figure 15D**).



B



C



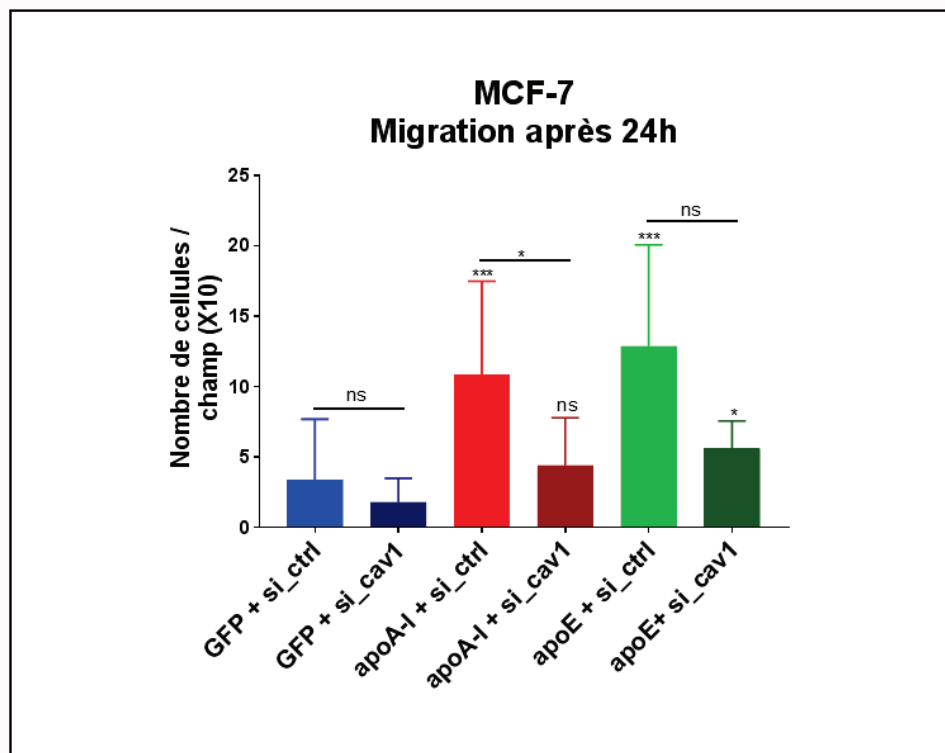
D

Figure 15 : Identification des partenaires de l'apoA-I et de l'apoE qui pourraient réguler leurs effets *in vitro*. **15A :** Analyse de l'expression de certaines protéines clés du métabolisme du cholestérol au niveau de l'ARNm (RT-qPCR ; N=3, n=3). **15B :** Analyse de l'expression de certaines protéines clés du métabolisme du cholestérol au niveau protéique (Western-Blot ; N=3, n=1). Les cellules HepG2 ont été utilisées comme contrôle positif. **15C :** Détection par immunofluorescence de la cavéoline-1 dans les cellules MDA-MB-231 et visualisation par microscopie confocale (N=2). L'échelle correspond à 25µm. **15D :** Migration des cellules MCF-7 en présence d'un siARN dirigé contre la cavéoline-1 (inserts de migration ; N=3, n=15).

10) L'apoA-I et l'apoE stimulent la croissance tumorale *in vivo*

In vivo, nous avons injecté nos lignées MCF-7 dans des souris athymiques immunodéficientes, et nous avons suivi la croissance tumorale (stimulée par une pilule d'œstrogène) au cours du temps pendant environ soixante jours. Pour ce faire, nous avons, une fois par semaine, visualisé les tumeurs par bioluminescence. La **Figure 16A** présente pour chacun des trois groupes et à différents temps (quatrième jour, vingt-deuxième jour, et soixante-deuxième jour) une souris représentative de chaque groupe. Visuellement, il est déjà possible de constater en observant ces photographies que les tumeurs générées par les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE sont plus grosses que celles générées par les cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP, et ce dès le vingt-deuxième jour. En représentant l'intensité de la bioluminescence issue des tumeurs au cours du temps, ce constat est confirmé : l'apoA-I et l'apoE stimulent la croissance tumorale dès les premiers jours. Les tumeurs observées avec l'apoA-I et l'apoE sont plus volumineuses et grossissent plus rapidement. En revanche, nous n'avons constaté de métastases dans aucune des souris, ni par bioluminescence, ni en observant les poumons après sacrifice et dissection des souris le dernier jour. Cette expérience a été répétée deux fois, avec des résultats similaires. Nous avons ici combiné les résultats des deux expériences.

Au niveau du plasma, les souris dans lesquelles ont été injectées les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I possédaient des taux de cholestérol plus élevés (statistiquement significatif) et des taux de desmostérol plus faibles (statistiquement marginalement significatif) (**Figure 16B**). Nous avons également remarqué dans ces mêmes souris une tendance à la baisse des taux de campestérol et de stigmastérol, et une tendance à la hausse du taux de 22-hydroxycholestérol. Les souris ayant été injectées avec les cellules MCF-7 exprimant l'apoE ont elles aussi un taux de desmostérol sanguin plus faible et un taux de 22-hydroxycholestérol plus élevé. Dans ces souris, en revanche, le taux de cholestérol sanguin tend seulement à augmenter légèrement.

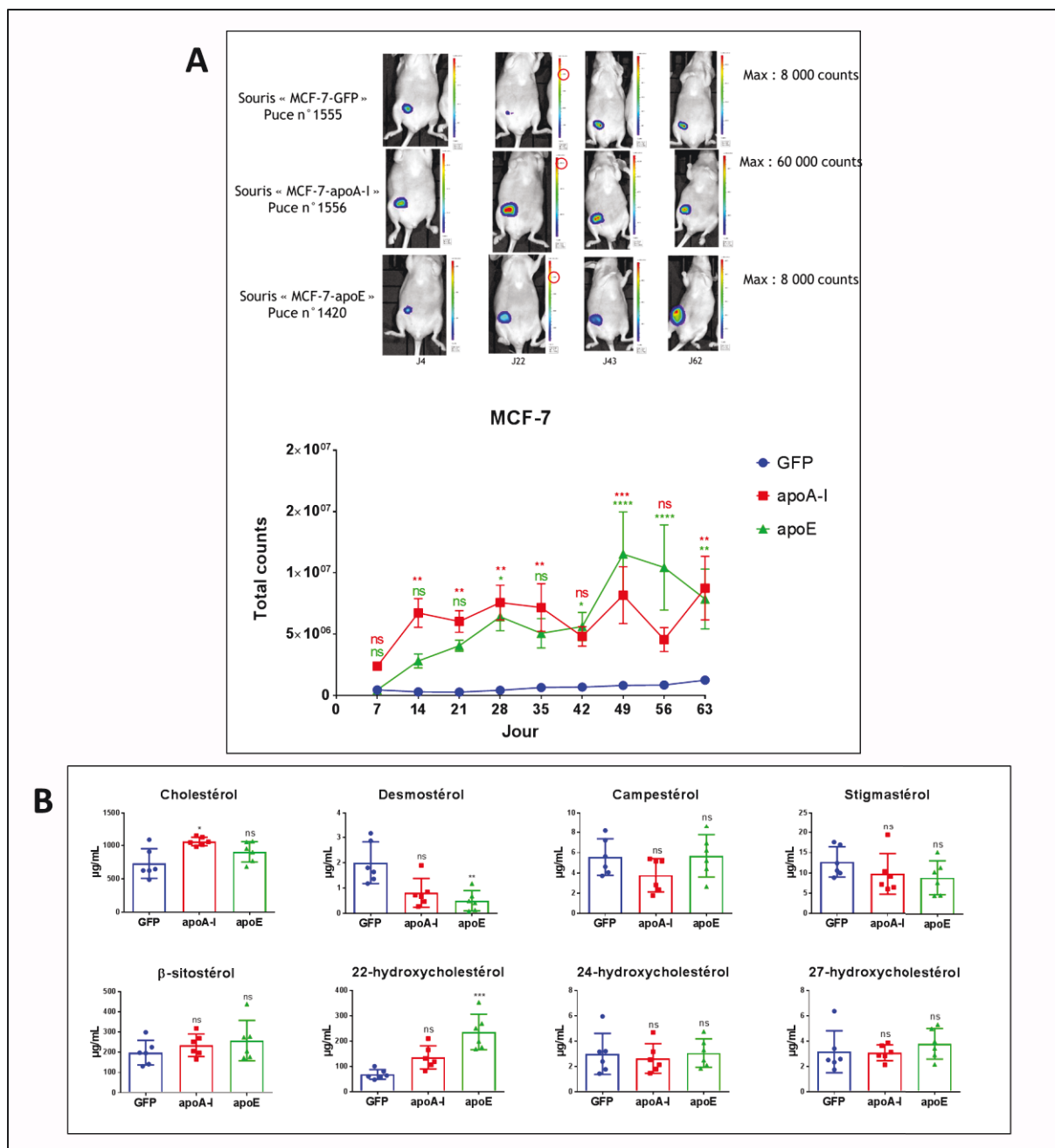


Figure 16 : L'apoA-I et l'apoE stimulent la croissance tumorale *in vivo*. **16A :** Nous avons injecté cinq millions de cellules MCF-7 dans 50µL de DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et nous avons suivi la croissance tumorale pendant environ soixante jours après injection sous-cutanée de la pilule de 17β -estradiol. Les résultats présentés ici correspondent à la combinaison de deux expériences différentes ($n = 10$ pour les cellules MCF-7-GFP et MCF-7-apoE, $n = 12$ pour les cellules MCF-7-apoA-I). La bioluminescence est exprimée en « total counts », après ratio à la valeur de bioluminescence intrinsèque à chaque lignée cellulaire. Sont représentées graphiquement les moyennes assorties de leurs écart-types. L'expression de l'apoA-I ou de l'apoE conduit au développement plus rapide de tumeurs plus grosses. **16B :** Mesure des stérols dans le plasma des souris par GC ($N=1$, $n=6$).

Chapitre IV : Discussion

1) Résumé des résultats

Avec nos travaux, nous avons montré que l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 pouvait impacter le métabolisme du cholestérol de ces cellules, et modifier leurs caractéristiques pro-tumorales. En particulier, l'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération des cellules MCF-7, déclenchent chez elles un début de Transition Epithélio-Mésenchymateuse, stimulent leur migration et augmentent leurs capacités invasives. Les mécanismes sous-jacents pourraient impliquer la cavéoline-1, dont l'expression est fortement augmentée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE. Les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK sont suractivées, ce qui sous-tend l'idée qu'elles participent elles aussi à ces phénomènes. *In vivo*, l'injection des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE dans des souris athymiques immunodéficientes a également conduit au développement de tumeurs plus volumineuses. Les conclusions concernant les cellules MDA-MB-231 sont très différentes. En effet, l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE diminuent la prolifération et la migration de ces cellules, mais stimulent néanmoins l'invasion.

2) Une expression instable

Nous avons constaté que les cellules, après un certain nombre de passages, tendaient à perdre l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE (ou à moindre mesure, de la GFP), sans nécessairement perdre leur résistance à la puromycine. Les cellules MDA-MB-231 étaient plus sujettes à ce phénomène que les cellules MCF-7 (peut-être parce que l'apoA-I et l'apoE étaient néfastes à la survie des cellules MDA-MB-231), ce qui explique que nous ayons pu réaliser davantage d'expériences avec les secondes qu'avec les premières. Il est possible que lors de certaines expériences, nous ayons travaillé avec un pool de cellules, certaines exprimant la protéine d'intérêt, d'autres non, posant certains problèmes de reproductibilité. A l'avenir, il serait donc préférable, à l'issue de l'étape de la transfection, de procéder à une sélection de clones, afin de prévenir ou de limiter ce problème.

3) L'apoA-I et l'apoE modulent la distribution du cholestérol dans les cellules cancéreuses mammaires, mais pas exactement comme nous l'attendions

A l'origine de ce projet se trouvait l'hypothèse forte selon laquelle le cholestérol pourrait être impliqué dans le développement du cancer du sein. En exprimant l'apoA-I et l'apoE dans des lignées cancéreuses mammaires qui normalement ne les expriment pas, nous pensions influencer de façon significative sur le contenu en cholestérol de nos lignées. Le résultat n'a pas tout à fait été conforme à nos attentes : le contenu cellulaire total de cholestérol semble parfois peu ou pas modifié. Néanmoins, cela ne signifie pas nécessairement que la répartition du cholestérol n'est pas impactée. Nous observons également des modifications de la quantité d'autres stérols (desmostérol, 27-hydroxycholestérol, 24-hydroxycholestérol) qui jouent un rôle important non seulement dans la régulation du métabolisme du cholestérol [423 , 424] mais aussi dans la cellule cancéreuse [425]. Les oxystérols peuvent notamment, en se liant à NRF1, médier l'activation de certains gènes de l'homéostasie du cholestérol par LXR [426] (NRF1 est par ailleurs généralement associé aux phénomènes de stress, aussi il serait intéressant de mesurer le contenu en cholestérol au niveau de chaque organelle, car une augmentation du cholestérol au niveau du RE pourrait en effet entraîner une augmentation du stress [427 , 428 , 429]). Il a aussi été montré que les oxystérols peuvent stimuler la prolifération et la migration des cellules MCF-7 [426]. Le 27-hydroxycholestérol, en particulier, est un oxystérol bien connu pour stimuler dans certains cas (cellules ER-positives) le développement d'un phénotype cancéreux [208 , 210 , 430], mais il n'est pas le seul. Le 25-hydroxycholestérol, peut lui aussi stimuler la prolifération des cellules MCF-7, par un mécanisme impliquant le récepteur aux œstrogènes [431]. Nous avons bien retrouvé une augmentation du 27-hydroxycholestérol dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE. Ces deux oxystérols lient et activent les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β [432]. Le rôle de ces deux protéines est maintenant bien établi dans le métabolisme du cholestérol. Celles-ci permettent la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que ABCA1, ABCG1, apoE, SREBP1c [433]. Cependant d'autres voies sont régulées par ces récepteurs nucléaires. Elles impliquent notamment des gènes régulant le cycle cellulaire (suppression de Skp2, cycline A2, cycline D1, augmentation de p53), ce qui permettrait de limiter la prolifération de cellules cancéreuses [235]. Des activateurs

synthétiques (T0901317) ou naturels (22(R)-hydroxycholestérol) ont été utilisés avec succès pour limiter la croissance tumorale [235 , 434] . Un autre activateur (la dendrogénine A) de LXR a récemment été identifié : il active une autophagie létale dans les cellules cancéreuses par un mécanisme impliquant les LXR β [257]. Cependant, des études avec le 25- ou le 27-hydroxycholestérol ont identifié ces composés comme étant des agonistes du récepteur aux œstrogènes ER α [431, 435]. Dans ce cas, selon le type d'activateur et le type de tumeur (« luminal » versus triple-négative), l'efficacité du traitement avec un oxystérol pourrait varier comme dans le cas de notre étude. Dans le cas des cellules MCF-7, il est possible que les niveaux de 25- ou de 27-hydroxycholestérol dans les cellules exprimant l'apoA-I et l'apoE augmentent localement et activent ER α et LXR alors que dans les cellules MDA-MB-231, seul LXR pourrait être activé.

Les expériences menées avec la filipine, bien que non quantitatives, semblent quant à elles montrer que l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE conduit à une accumulation de cholestérol au niveau intracellulaire dans les cellules MCF-7, et au niveau de la membrane plasmique dans les cellules MDA-MB-231. La fluidité membranaire, d'ailleurs, est modifiée par l'expression de l'apoA-I et de l'apoE : la membrane des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I (et à moindre mesure, celle des cellules MCF-7 exprimant l'apoE) est plus fluide que celle de leurs homologues contrôles n'exprimant que la GFP, ce qui peut aller dans le sens d'une augmentation de cholestérol au niveau intra-cellulaire. Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent donc que s'opère bel et bien une modulation de la distribution du cholestérol dans la cellule suite à l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE. Cette modification est cependant différente selon le type cellulaire, ce qui pourrait être liée à la différence de niveaux d'expression des transporteurs et récepteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol et la sécrétion de l'apoA-I sous forme de HDL [436] . En effet, les niveaux d'expression de ABCA1 au niveau de l'ARNm sont plus élevés dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules MCF-7, tandis que c'est l'inverse qui se produit pour le transporteur ABCG1 et le récepteur SRB1. Or ABCA1 joue un rôle important dans la sécrétion des particules HDL (apoA-I lipidée, [436]), ce qui peut signifier que la sécrétion de HDL dans les cellules MDA-MB-231 serait plus efficace. Ainsi sécrétées par les cellules, les particules HDL ne tendraient donc pas à stimuler leur prolifération.

La modification de la fluidité membranaire pourrait être directement liée aux effets que nous observons : une augmentation de la fluidité membranaire peut en effet augmenter les capacités migratoires et métastatiques des cellules [437]. Zhao et al. [438] ont notamment

montré que le fait d'augmenter la rigidité membranaire pouvait rendre les cellules cancéreuses mammaires moins métastatiques en diminuant la migration, en empêchant la Transition Epithélio-Mésenchymateuse, et en réduisant la capacité de formation de mammosphères. La surexpression de la cavéoline-1 dans les lignées MCF-7 exprimant l'apoA-I et l'apoE est un autre élément pouvant indiquer que se produisent dans ces lignées des changements au niveau du métabolisme du cholestérol. Il est envisageable que si les niveaux de cavéoline-1 augmentent, la quantité de radeaux lipidiques ou leurs propriétés augmentent elles aussi.

Le cholestérol serait donc bel et bien affecté par l'expression de l'apoA-I et de l'apoE, mais pas exactement comme nous l'envisagions aux commencements de ce projet, car ce sont surtout ses métabolites et sa distribution qui sont affectés. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que se produisent dans nos cellules des phénomènes de compensation, en réponse à des changements du métabolisme du cholestérol. Il est toutefois à souligner que le taux de cholestérol sanguin a été significativement augmenté dans les souris ayant subi une injection de cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, ce qui révèle là aussi des changements au niveau du métabolisme du cholestérol, cette fois à l'échelle de l'organisme. Pour mieux comprendre les changements éventuels qui se produisent au niveau de la membrane plasmique, il faudrait compléter nos résultats en mesurant le contenu cellulaire total en phospholipides et compléter nos expériences concernant le contenu en stérols (car nous n'avons mesuré que certains d'entre eux). Il serait aussi intéressant de transfecter les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 avec l'ADN codant pour d'autres acteurs du transport inverse du cholestérol comme les transporteurs ABCA1 et ABCG1.

Il serait aussi intéressant de mesurer les niveaux d'autres métabolites du cholestérol dans nos cellules, comme la dendrogénine A ou l'OCDO. Le premier a des propriétés anti-tumorales : il est en effet capable d'induire une autophagie léthale des cellules cancéreuses [254, 256, 257]. Le second, à l'inverse est considéré comme un oncométabolite du cholestérol, en cela qu'il stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en se liant au récepteur des glucocorticoïdes [237].

4) Quid des hypothèses de départ ?

Exprimer l'apoA-I devait contribuer à diminuer le contenu cellulaire en cholestérol, en stimulant une sortie de cholestérol de façon similaire à ce qu'elle fait *in vivo* dans les

macrophages (transport inverse du cholestérol). Dans nos deux lignées cellulaires, les MCF-7 comme les MDA-MB-231, ce n'est pourtant pas ce que nous avons observé. Il est envisageable que l'apoA-I ne se soit pas comporté au niveau cellulaire comme elle le fait généralement au niveau de l'organisme. Nous pouvons imaginer, par exemple, que l'apoA-I ne soit pas capable de transporter le cholestérol intra-cellulaire hors de la cellule, mais qu'au contraire elle puisse, dans sa forme sécrétée, capter le cholestérol présent dans le milieu pour ensuite permettre son incorporation par la cellule. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser du milieu contenant du cholestérol marqué et suivre son devenir au sein de la cellule. Il est également possible que l'apoA-I et l'apoE nécessitent d'autres protéines pour être capables de mieux éliminer le cholestérol intracellulaire des cellules mammaires et pour produire des lipoprotéines de type HDL enrichies en cholestérol. Pour vérifier cela, il pourrait être utile de surexprimer dans nos cellules les transporteurs ABCA1 ou ABCG1 ou le récepteur SRB1.

L'effet de l'apoE était plus délicat à prévoir. Si dans certains types cellulaires, elle est plutôt associée aux VLDLR, auquel cas elle participe à la distribution de cholestérol, dans d'autres types elle participe plutôt à la sortie de cholestérol. Les cellules mammaires n'exprimant pas naturellement l'apoE, les deux possibilités étaient envisageables. Cependant, dans notre cas, les niveaux de cholestérol se sont trouvés peu impactés par l'expression de l'apoE, tant dans les cellules MCF-7 que dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, les effets de l'apoE sont d'une manière générale proches de ceux observés avec l'apoA-I dans chaque type cellulaire.

5) L'apoA-I et l'apoE stimulent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules MCF-7

Nous avons constaté que l'apoA-I tend à rendre les cellules MCF-7 plus agressives, en stimulant la prolifération, la migration et l'invasion. Les mécanismes semblent impliquer les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK, qui sont suractivées dans ces cellules sous l'impulsion d'une stimulation de la prolifération. Pourtant, dans la littérature, l'apoA-I est plutôt recensée comme étant protectrice d'un certain nombre de cancers [439]. C'est le cas, par exemple, pour le cancer de l'ovaire, dans le cadre duquel des niveaux d'apoA-I plus faibles que la normale peuvent être considérés comme des biomarqueurs du cancer, et des niveaux plus élevés

comme des indicateurs d'une meilleure survie [440 , 441 , 442]. Des résultats similaires ont été rapportés pour le cancer du pancréas ou du colon [443 , 444]. En ce qui concerne le cancer du sein, les résultats varient quelque peu en fonction des études : beaucoup présentent l'apoA-I comme associée positivement à une diminution du risque d'apparition ou de récurrence de la maladie [445 , 446], mais d'autres, plus rares, montrent parfois la relation inverse [179]. A l'échelle des modèles murins, l'apoA-I est aussi reconnue comme protectrice, notamment dans le cas du cancer du poumon, du mélanome, ou des ovaires [447 , 448]. Ce constat s'applique à des études menées en surexprimant le gène codant pour l'apoA-I, ou en utilisant des peptides mimant son effet [449 , 450].

Plusieurs théories peuvent expliquer que dans le cas de nos travaux, l'apoA-I ait exercé un rôle pro-tumoral sur nos cellules MCF-7. Il est possible que l'expression de l'apoA-I, par exemple, contribue à augmenter le nombre de particules HDL. Or il a été montré en 2013 par Danilo et al. [451] que celles-ci étaient capables de stimuler la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein (**Figure 17A**). En effet, dans leur étude, Danilo et al. ont utilisé des HDL₃ pour stimuler la migration des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 et ont montré que ces dernières pouvaient servir de chimioattractant (contrairement aux particules LDL). Plus précisément, les particules HDL₃ multipliaient respectivement par 3,5 et par 61 le nombre de cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 ayant migré par rapport à la condition contrôle (0,1% BSA). En présence de particules HDL₃ (à une concentration de 100µg/mL), les voies MAPK/ERK et PI3K/Akt étaient suractivées dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (phénomène qui ne se retrouvait pas ou peu avec une stimulation par les LDL). Diminuer l'expression de SRB1, le récepteur des HDL, dans ces cellules conduisait à réduire la suractivation de la voie PI3K/Akt induite par les HDL₃, ce qui suggère que l'effet pro-prolifératif de ces HDL débiterait par l'interaction de ces particules dans les cellules cancéreuses mammaires via le récepteur SRB1, avant de conduire à une activation de la voie Akt. La voie MAPK/ERK, quant à elle, était de la même façon moins activée dans les cellules MCF-7 en l'absence de SRB1, mais ce constat n'était pas retrouvé dans les cellules MDA-MB-231. Diminuer l'expression de SRB1 avait également pour conséquence de réduire les niveaux de cholestérol total dans les cellules MDA-MB-231. Le rôle de SRB1 dans les effets pro-prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs des particules HDL₃ sur les cellules MDA-MB-231 a ensuite été confirmé en constatant que la prolifération et la migration se retrouvaient considérablement diminuées en l'absence de SRB1. Danilo et al. n'ont pas corroboré ces dernières constatations avec les cellules MCF-7, mais il a déjà été

montré par ailleurs que les HDL stimulent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires : dès 1989, Rotheneder et al. [452] montraient que les LDL stimulaient la prolifération des cellules MDA-MB-231, mais pas des cellules MCF-7, tandis que les HDL stimulaient la prolifération des deux lignées. Les travaux de Cao et al. [453] vont dans le même sens : en mutant le gène codant pour SRB1 (conduisant à une version inactive de SRB1, dénuée de son domaine C-terminal), ils ont pu diminuer la prolifération induite par les HDL des cellules MCF-7 (**Figure 17B**). Des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt diminuaient cette prolifération, mais des inhibiteurs de la voie MAPK/ERK comme de la voie JNK n'avaient pas d'effet, ce qui indique là aussi que l'effet pro-prolifératif des HDL impliquerait la voie PI3K/Akt. Enfin, des résultats non publiés par Frank et al. sous-tendent également l'hypothèse d'une stimulation de la prolifération des cellules MCF-7 par les particules HDL (bien que dans leur cas, ce qui tranche avec les résultats de Rotheneder et al. évoqués précédemment, les particules LDL étaient elles aussi capables de stimuler la prolifération des cellules MCF-7, **Figure 17C**). Il est donc possible d'imaginer que l'effet pro-prolifératif, pro-migratoire et pro-invasif que nous observons dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I est simplement dû aux particules HDL, en impliquant la voie PI3K/Akt. Nous n'avons pas retrouvé de surexpression du récepteur SRB1, ni dans les cellules MCF-7, ni dans les cellules MDA-MB-231 au niveau de l'ARNm. Au contraire, nous avons même observé une diminution de la transcription de SRB1 dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I. Cependant, au niveau protéique, l'expression de SRB1 semble augmenter, ce qui pourrait être dû à une augmentation des niveaux intracellulaires de cholestérol. Des études précédentes ont en effet démontré qu'une augmentation du cholestérol cellulaire pouvait être associée à une augmentation de la stabilité de la protéine SRB1 [454].

L'idée que le cholestérol présent dans le milieu de culture serait incorporé par l'apoA-I est aussi alimentée par certains de nos résultats préliminaires qui laissent présager que l'effet de l'apoA-I sur les cellules MCF-7 est exacerbé lorsqu'on augmente la quantité de sérum dans le milieu (et donc, la quantité de cholestérol). Ainsi, la fluidité membranaire des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE semble diminuer (augmentation de la GP value) lorsqu'on augmente la quantité de sérum dans le milieu, ce qui pourrait signifier que le cholestérol présent dans le milieu est capté par l'apoA-I ou l'apoE et transféré dans la membrane plasmique (**Figure 18A**). De plus, en migration par cicatrisation, le fait de faire varier les conditions de stimulation ne semble pas impacter les cellules MCF-7 exprimant la GFP, tandis que le fait d'augmenter la quantité de sérum augmente la migration des cellules

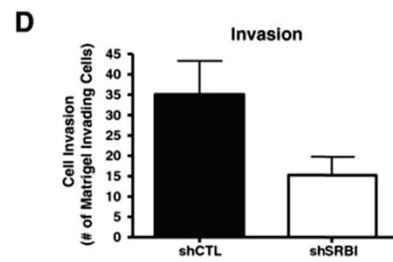
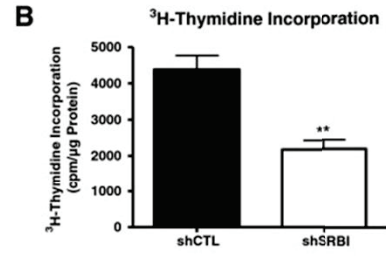
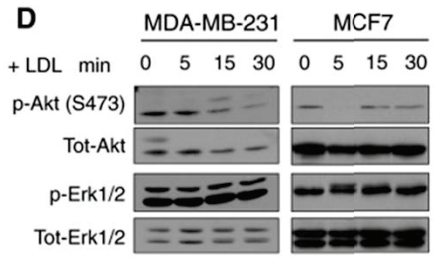
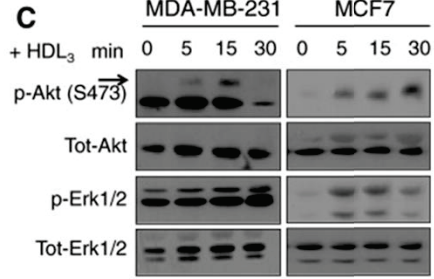
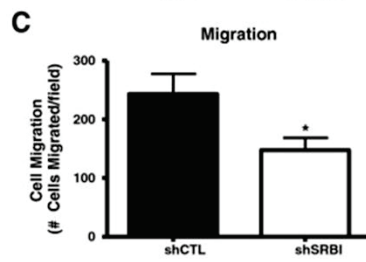
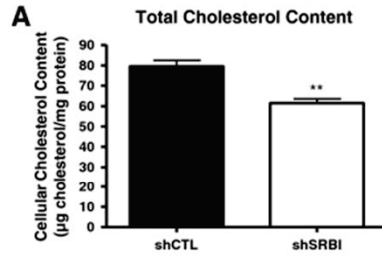
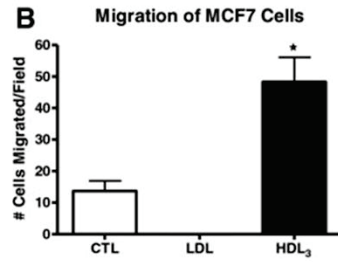
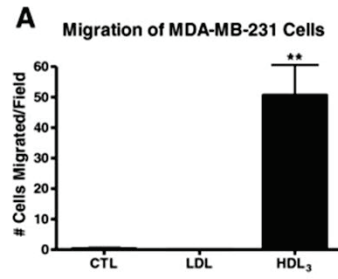
MCF-7 exprimant l'apoA-I (**Figure 18B**). Pour vérifier cette hypothèse, il serait judicieux, de la même façon, de répéter toutes nos expériences (prolifération, migration, invasion) en stimulant ces phénomènes avec différentes quantités de sérum, ou avec autre chose que du sérum (par exemple, comme nous l'avons fait ici, avec le facteur de croissance EGF).

Dans la littérature, l'apoE est parfois décrite comme pouvant exercer une activité pro-tumorale, parfois une activité anti-tumorale, selon l'étude et le type de cancer considéré. Wang et al. [455], par exemple, ont rapporté que des niveaux élevés en apoE pouvaient être considérés comme un biomarqueur de certains cancers du poumon. Toujours dans le cas du cancer du poumon, Su et al. [456] ont montré que la surexpression de l'apoE stimulait la prolifération, la migration, l'invasion, et la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Jayakar et al. [457] ont quant à eux mis en évidence un effet pro-invasif de l'apoE dans le cas du carcinome des cellules squameuses. Zhao et al. [458] ont montré qu'une surexpression de l'apoE était associée au risque de cancer du côlon et à une mauvaise survie. Une surexpression de l'apoE a également été constatée par Chen et al. [459] dans le cadre du cancer des ovaires, du cancer du pancréas, du cancer de l'estomac, du cancer du côlon, du cancer de la prostate, et du cancer du sein. Ces mêmes auteurs ont également montré que le fait de réduire l'expression de l'apoE provoquait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de cellules cancéreuses ovariennes. A l'inverse, il a été rapporté que l'apoE pouvait freiner la prolifération de certaines cellules cancéreuses, comme des cellules représentatives de la maladie de Kaposi ou des cellules de mélanome [460, 461]. Il est ainsi couramment admis, à présent, que l'apoE a un rôle double, dépendant du tissu. L'apoE a globalement des effets similaires à ceux de l'apoA-I sur nos cellules MCF-7, aussi les mêmes mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer son impact sur le phénotype cancéreux de ces cellules. Ces résultats se démarquent de ceux de la littérature. Il existe en effet deux études qui ont montré un rôle différent de l'apoE sur les cellules MCF-7 : El Roz et al. [462] ont incubé des cellules MCF-7 avec le surnageant de culture de macrophages contenant de l'apoE sécrétée par ces dernières et ont montré que cela réduisait la viabilité des cellules MCF-7 et augmentait la mort cellulaire par apoptose, tandis que Ha et al. [463], en transfectant les cellules MCF-7 avec de l'ADN codant pour l'apoE, ont considérablement réduit la prolifération des cellules MCF-7. A ce jour, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer ces différences, mais il faut préciser que Hu et al. ont utilisé une séquence codant pour ApoE-Myc-His₆ (ce qui pourrait modifier ses propriétés). Le mécanisme d'action de l'apoE (et de l'apoA-I) dans nos cellules MCF-7 nécessite encore d'être mieux compris. Des expériences sur micropuces pourraient

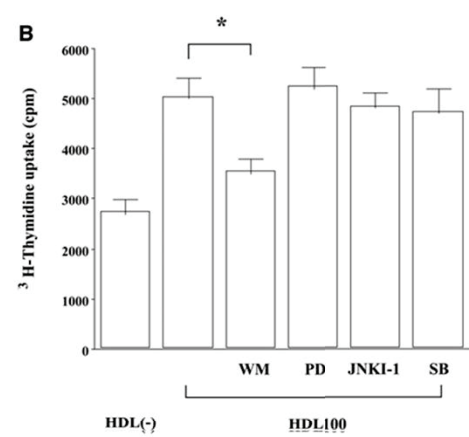
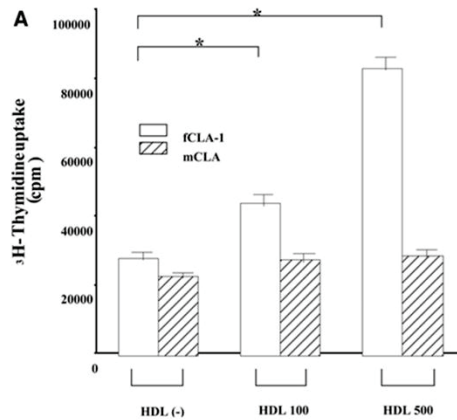
être envisagées. Elles permettraient en effet d'obtenir une vue d'ensemble sur les régulations génétiques qui s'opèrent au sein de la cellule suite à l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE, et ainsi d'identifier les mécanismes, voies et partenaires impliqués dans les effets pro-tumoraux que nous rapportons.

En complément de nos expériences de prolifération pourraient être réalisées des expériences de formation de mammosphères, qui permettent de mesurer le potentiel des cellules cancéreuses à se comporter comme des cellules souches [464]. Cependant, il a été montré que la formation de mammosphères par les cellules MCF-7 pouvait être inhibée par une perte de l'expression de la E-cadhérine, ce qui pourrait empêcher nos cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE de former des mammosphères, bien qu'elles prolifèrent davantage que les cellules contrôles [465].

A



B



C

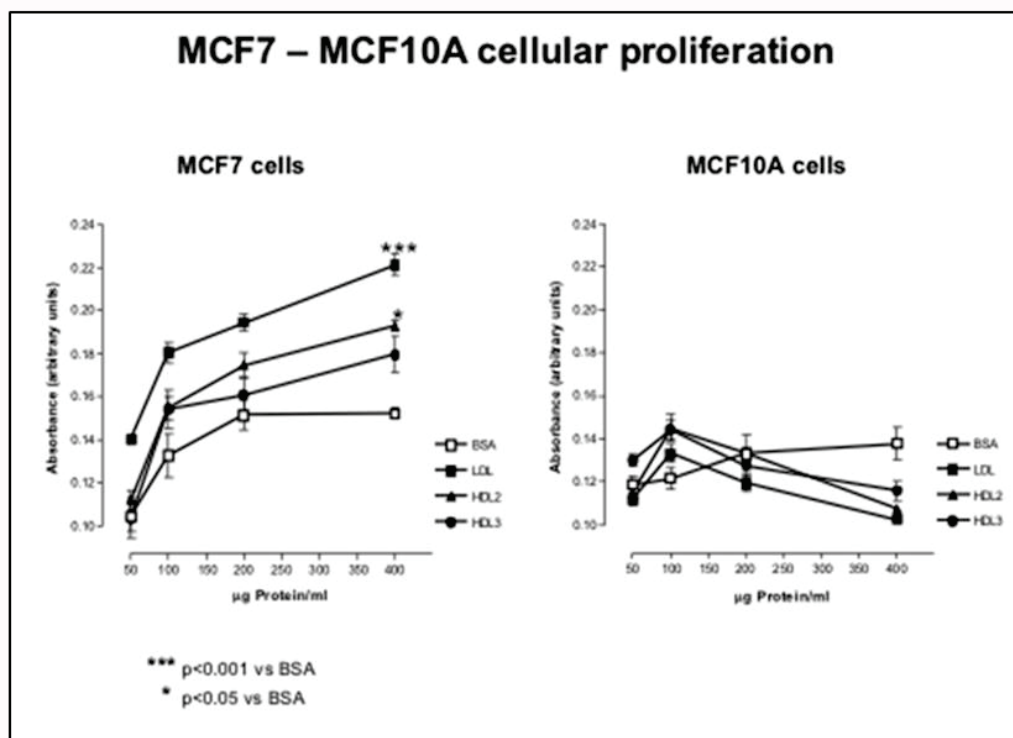


Figure 17 : Les particules HDL pourraient être à l'origine des effets pro-prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs que nous retrouvons dans les MCF-7 exprimant l'apoA-I. Il est possible qu'en exprimant l'apoA-I, le nombre de particules HDL soit augmenté, or il a été montré que ces dernières peuvent stimuler la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires. **17A : Résultats de Danilo et al., 2013 [451].** La migration des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 est fortement augmentée en présence de particules HDL₃, mais pas de particules LDL. Les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK sont suractivées en présence de particules HDL₃ d'une manière temps-dépendante. En diminuant l'expression du récepteur à HDL SRB1 dans les cellules MDA-MB-231 : le contenu en cholestérol total diminue, la prolifération diminue, la migration diminue, et l'invasion diminue. **17B : Résultats de Cao et al., 2004 [453].** La prolifération des cellules MCF-7 augmente en présence de HDL, et ce phénomène est complètement inhibé lorsque SRB1 est rendu inactif par une mutation (« mCLA », figure de gauche). Seule l'inhibition de la voie PI3K/Akt permet de réduire significativement la prolifération induite par les MCF-7 (« WM », figure de droite). **17C : Résultats non publiés de Frank et al..** La prolifération des cellules MCF-7 est stimulée par les particules LDL et les particules HDL (HDL₂ et HDL₃), mais ces dernières n'ont aucun effet sur les cellules mammaires non cancéreuses MCF-10A.

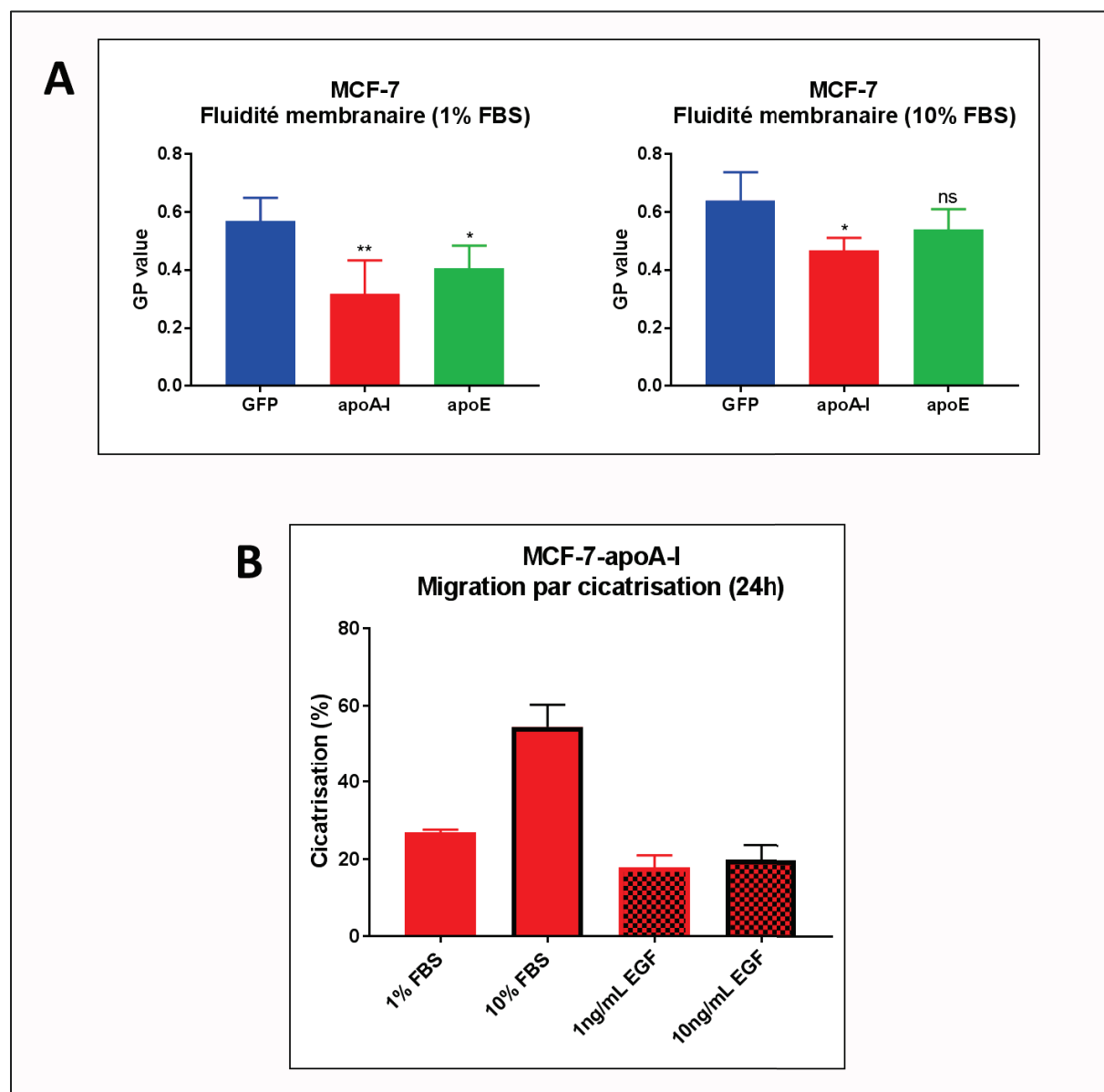


Figure 18 : L'apoA-I et l'apoE sont-elles capables de capter le cholestérol présent dans le milieu de culture ? 18A : Mesure de la fluidité membranaire des cellules MCF-7 en présence de 1 ou 10% de sérum SVF. 18B : Mesure de la migration par cicatrisation (wound-healing) au bout de 24h dans différentes conditions. Après l'étape de sevrage (0,1% BSA pendant 24h), la cicatrice est tracée et les cellules sont incubées dans un milieu DMEM contenant 1% de SVF, 10% SVF, 1ng/mL EGF, ou 10ng/mL EGF.

6) ABCG1 pourrait être impliqué dans l'effet médié par l'apoA-I sur les cellules MCF-7 et ABCA1 dans celui médié par l'apoE sur les cellules MCF-7

Des expériences préliminaires de prolifération en système xCELLigence ont montré que diminuer l'expression de SRB1 diminue la prolifération des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE comme dans le cas des cellules contrôles MCF-7 n'exprimant que la GFP (**Figure 19**). Ces résultats confirment les études de Danilo et al. [451]. En revanche, les siARN dirigés contre ABCA1 ou ABCG1 n'ont pas les mêmes effets en fonction de la lignée considérée. En effet, si diminuer l'expression de ABCA1 diminue la prolifération des cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP et des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, cela stimule la prolifération des cellules MCF-7 exprimant l'apoE. De la même façon, si diminuer l'expression de ABCG1 diminue la prolifération des cellules MCF-7 n'exprimant que la GFP et des cellules MCF-7 exprimant l'apoE, cela stimule la prolifération des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I. Rappelons par ailleurs que nous avons observé une tendance à la diminution de l'expression de l'ABCG1 dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I. Si ces résultats n'ont pas encore été reproduits, ils sont néanmoins potentiellement intéressants. S'ils étaient confirmés, cela signifierait que ABCG1 aurait un effet antagoniste à celui de l'apoA-I, tandis que ABCA1 aurait un effet antagoniste à celui de l'apoE. Il est possible d'imaginer que les dérégulations du métabolisme du cholestérol potentiellement provoquées par l'expression de l'une ou l'autre de ces apolipoprotéines obligent la cellule à réagir de manière à maintenir malgré tout l'homéostasie du cholestérol. Il est possible également que l'apoE régule ABCA1, ou qu'au contraire ce dernier freine la sécrétion de l'apoE.

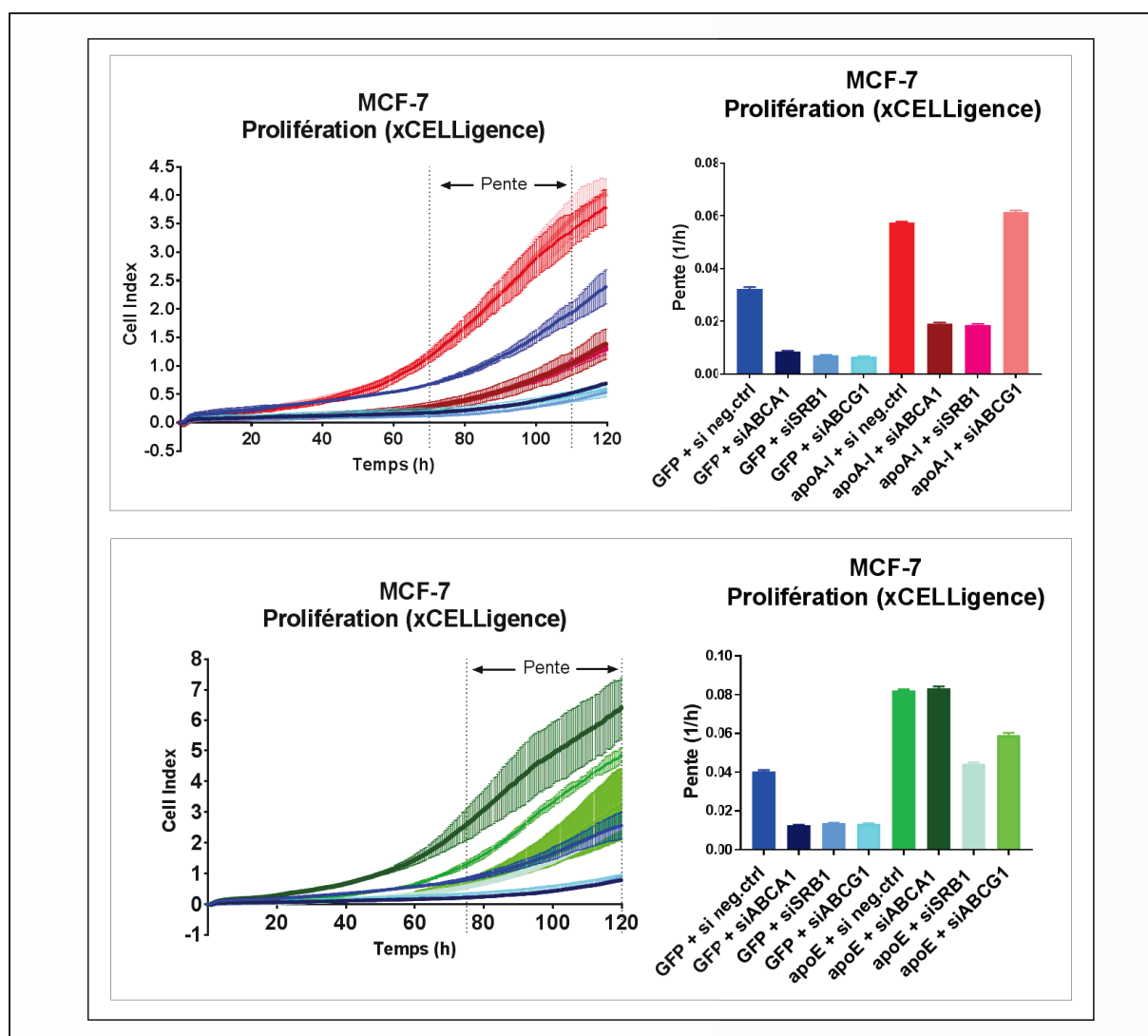


Figure 19 : Mesure de la prolifération des cellules MCF-7 après inhibition de l'expression ABCA1, de SRB1 ou de ABCG1 via siARN. La prolifération est mesurée par le système xCELLigence. A gauche est représentée l'évolution de l'impédance au cours du temps, à droite la valeur de la vitesse de la prolifération pendant une phase linéaire (N=2, n=2).

7) Un rôle potentiel pour la cavéoline-1

La surexpression de la cavéoline-1 dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE (ou plus précisément : l'expression de la cavéoline-1, car elle n'est pas exprimée en conditions basales dans nos cellules contrôles n'exprimant que la GFP), est l'une de nos découvertes principales. Comme nous l'avons déjà soulignée, l'implication de la cavéoline-1 dans le cancer du sein est encore controversée, certaines études la présentant comme participant au développement du phénotype cancéreux quand d'autres montrent au contraire qu'elle pourrait le ralentir [466 , 467]. Il est difficile d'imaginer que dans notre cas, au vu des résultats, la cavéoline-1 ne soit pas impliquée dans les effets pro-prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7. Cependant, il est important de noter que même si une augmentation de l'expression de la caveoline-1 est observée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, et une modification de la répartition de la cavéoline-1 est observée dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, les niveaux ne sont pas les mêmes dans les deux lignées. Dans le cas des cellules MCF-7, ces niveaux restent très faibles, si bien qu'il n'a pas été possible de détecter cette protéine par immunofluorescence dans les conditions utilisées pour les cellules MDA-MB-231.

La surexpression de la cavéoline-1 (dans le cas des cellules MCF-7), comme la modification de sa répartition au niveau de la membrane plasmique (dans le cas des cellules MDA-MB-231) sont des éléments révélateurs de modifications au niveau du métabolisme du cholestérol. En effet, la cavéoline-1 participe à l'homéostasie du cholestérol. Frank et al. [468] ont par exemple montré que des fibroblastes ou des macrophages dénués de cavéoline-1 voient leur niveau d'esters de cholestérol augmenter, et leur niveau de cholestérol libre baisser, ce qui s'explique par une diminution de la synthèse de cholestérol libre et par une augmentation de l'activité de l'enzyme SOAT. La cavéoline-1 est aussi capable, selon le type cellulaire considéré, de réguler le flux sortant de cholestérol médié par l'ABCG1 et l'ABCA1 [469]. Une surexpression de cavéoline-1 est d'ailleurs parfois rapportée comme stimulant une sortie de cholestérol et par conséquent diminuant l'accumulation de cholestérol [470]. La cavéoline-1 est également impliquée dans la régulation du cholestérol au niveau de la mitochondrie : une perte de la cavéoline-1 conduit à une accumulation de cholestérol dans les membranes des mitochondries [471]. Par ailleurs, il a été montré que SRB1 est capable de stabiliser la cavéoline-1 [472], ce qui s'accorde avec nos résultats puisque l'expression de

SRB1 est, tout comme l'expression de la cavéoline-1, augmentée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, et plus encore dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoE (au niveau protéique).

Comme nous l'avons déjà évoquée dans l'introduction, l'implication de la cavéoline-1 dans le cancer est controversée. Historiquement, la cavéoline-1 a plus souvent été présentée comme un gène suppresseur de tumeur. Elle est d'ailleurs sous-exprimée dans un certain nombre de cancers, parmi lesquels le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer du côlon, le cancer des ovaires, les ostéosarcomes, les glioblastomes [473 , 474 , 475 , 476 , 477 , 478 , 479 , 480]. Néanmoins, la cavéoline-1 possède aussi certaines propriétés pro-tumorales, et il est de plus en plus envisagé que ses effets diffèrent en fonction du stade de la maladie (anti-tumoraux à des stades précoces de la maladie, pro-tumoraux à des stades tardifs). La cavéoline-1 est ainsi capable, par exemple, de stimuler la métastase de cellules de cancer de la prostate ou de mélanomes [481 , 482]. Il a également été montré que le fait d'inhiber la cavéoline-1 conduit à réduire la migration des cellules MDA-MB-231 [483]. Certaines études montrent que l'effet de la cavéoline-1 dépend de la présence ou non de la E-cadhérine : cette dernière serait nécessaire, dans le cas du cancer du côlon, pour que la cavéoline-1 séquestre la β -caténine au niveau de la membrane plasmique et ainsi régule négativement la transcription β -catenin/(T-cell factor) dépendante de Tcf-Lef de la survivine, qui est une protéine impliquée dans l'apoptose [484]. Des résultats similaires ont été obtenus au sujet du mélanome [482]. Dans notre cas, nous avons constaté une diminution de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, ce qui pourrait expliquer que la cavéoline-1 n'ait pas, ici, joué un rôle anti-tumoral et pro-apoptotique. La cavéoline-1 peut d'ailleurs aussi être impliquée dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse [485]. Similairement à ce que nous avons obtenu, il a été montré que l'extinction de la cavéoline-1 dans les cellules cancéreuses mammaires BT474 inhibe la migration et l'invasion. Cela passe par une augmentation de l'expression de la E-cadhérine et une diminution de l'expression de MMP-2, MMP-9 et MMP-1 [486]. A contrario, la surexpression de la cavéoline-1 conduit à une diminution de l'expression de la E-cadhérine et à une augmentation de l'expression de la N-cadhérine, de la fibronectine et de la vimentine, ce qui là aussi correspond à ce que nous avons obtenu avec les cellules MCF-7 [487]. La cavéoline-1 peut aussi avoir un rôle pro-tumoral lorsqu'elle est sécrétée [473]. Elle serait sécrétée sous forme d'un complexe lipidique, en association avec l'apoA-I et l'apoE, mais pas avec l'apolipoprotéine apoB [488]. Tahir et al. [489] ont montré que la cavéoline-1 peut être sécrétée par des cellules cancéreuses

prostatiques de façon androgène-dépendante, et que cette sécrétion stimule la formation de métastase *in vivo* dans un modèle murin. Bartz et al. [490] ont obtenu des résultats similaires en montrant que la sécrétion de la cavéoline-1 stimule la croissance tumorale *in vivo*, toujours dans le cas du cancer de la prostate. Ce dernier n'est cependant pas le seul type de cancer que la cavéoline-1 sécrétée peut rendre plus agressif : les mêmes conclusions ont en effet été tirées quant au mélanome et au sarcome [491 , 492]. La cavéoline-1 peut également être retrouvée dans les exosomes, utiles aux cellules saines mais aussi aux cellules cancéreuses, et Logozzi et al. [493] ont montré que de grandes quantités de cavéoline-1 dans les exosomes pourraient servir de marqueur tumoral pour les mélanomes. Des vésicules extracellulaires contenant la cavéoline-1 sont aussi capables de stimuler la migration et l'invasion de cellules du sein non métastatiques, que ces dernières possèdent ou non des niveaux intrinsèques élevés de cavéoline-1 [473, 494 , 495]. Cela pourrait notamment s'expliquer par la capacité de la cavéoline-1 à enrichir les exosomes en certaines protéines d'adhésion, et cela conduit à l'accumulation dans ces cellules de composés pro-métastatiques [495]. Comme nous avons retrouvé des quantités plus élevées de cavéoline-1 dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, il est possible d'envisager que la cavéoline-1 soit sécrétée par nos cellules, et que cette sécrétion participe aux effets pro-tumoraux que nous observons. Pour valider ou invalider cette hypothèse, il conviendrait d'étudier la sécrétion de la cavéoline-1 par nos cellules MCF-7, et si elle est effectivement sécrétée, de vérifier si l'apoA-I et/ou l'apoE sont associées à cette forme sécrétée comme l'ont retrouvé Liu et al. [488]. Par ailleurs, Du et al. [496] ont, contrairement à nous, montré que la cavéoline-1 exerçait sur les cellules MCF-7 une activité anti-tumorale, en freinant la prolifération et l'invasion, et que ce mécanisme passait par une régulation négative des canaux ioniques BKCa, qui sont activés par le calcium. Il pourrait donc être intéressant pour nous de mesurer l'activité de ces canaux dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE.

Une des prochaines étapes, que nous avons déjà commencé à mettre en place et qu'il conviendrait de poursuivre, serait de bloquer l'expression de la cavéoline-1 avec un siARN spécifique et d'analyser, dans ces conditions, l'effet de l'apoA-I et de l'apoE sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules MCF-7. Si, comme nous le suspectons, la cavéoline-1 est une protéine clé des phénomènes observés, inhiber son expression devrait complètement éradiquer l'effet de l'apoA-I et de l'apoE sur le phénotype cancéreux des cellules MCF-7. Etudier l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt

en présence du siARN anti-cavéoline-1 permettrait de comprendre les mécanismes impliqués. La voie MAPK/ERK, en particulier semble agir en aval de la cavéoline-1 [470].

Pour comprendre les changements se produisant dans nos lignées surexprimant la cavéoline-1, nous avons d'ores et déjà procédé à des expériences préliminaires avec nos cellules MCF-7 en présence d'un siARN dirigé spécifiquement contre la cavéoline-1 (**Figure 20**). Contrairement à ce qu'il se produit dans les cellules contrôles, il apparaît que dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, le fait d'inhiber l'expression de la cavéoline-1 augmente l'expression génique du VLDLR. En ce qui concerne la Transition Epithélio-Mésenchymateuse, il est possible de noter que l'expression génique de la E-cadhérine augmente en présence du siARN anti-cavéoline-1 (dans toutes les lignées). Il est alors possible d'envisager que la cavéoline-1 soit responsable de la stimulation de la TEM dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE en réduisant l'expression de la E-cadhérine. Cependant, les marqueurs de la TEM (vimentine, fibronectine, SNAIL2, ZEB1) voient eux aussi leur expression augmenter en présence du siARN. Enfin, l'expression génique de la protéine MMP2 diminue dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I lorsqu'on inhibe l'expression de la cavéoline-1, alors qu'elle augmente dans les deux autres lignées.

Un autre mécanisme possible pour expliquer le rôle pro-tumoral de la cavéoline-1 implique le récepteur EGFR, dont la cavéoline-1 serait capable de réguler l'activité tyrosine-kinase [497, 498]. Cela mériterait d'être étudié dans de futures expériences. La cavéoline-1 peut aussi stabiliser le récepteur de l'insuline, or les effets pro-tumoraux de l'insuline sont connus et décrits dans la littérature [141, 499, 500]. Il serait donc intéressant de mesurer l'expression du récepteur à insuline dans nos cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, ainsi que de bloquer son activité pour vérifier si cela inhibe ou non les effets pro-prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs que nous observons.

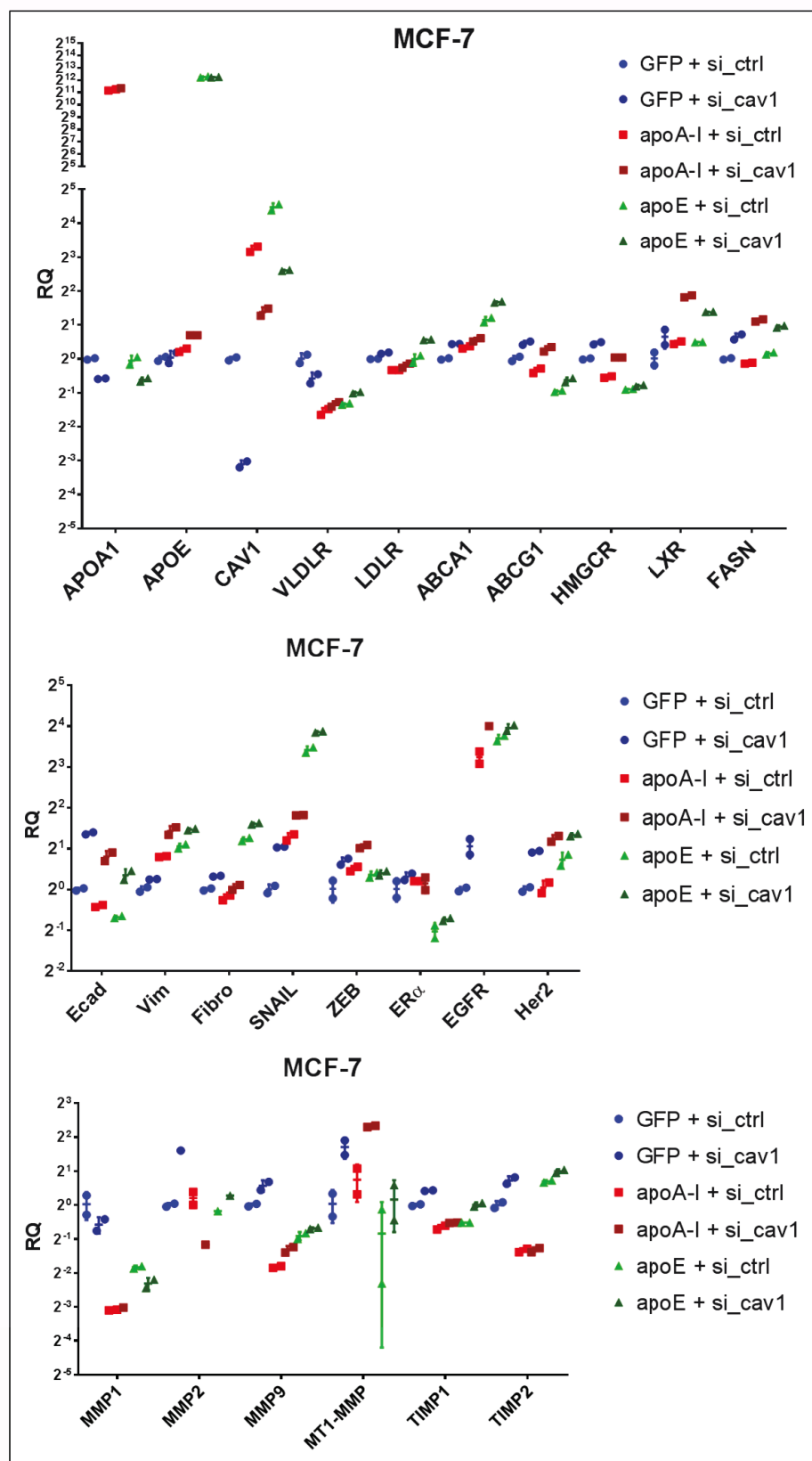


Figure 20 : Analyse par RT-qPCR des changements d'expression de certaines protéines dans les cellules MCF-7 en présence d'un siARN spécifique de la cavéoline-1. Ces résultats sont issus d'une expérience préliminaire n'ayant été réalisée que deux fois (N=1, n=2).

8) Quelles explications pour les différences observées entre la lignée MCF-7 et la lignée MDA-MB-231 ?

Un des constats majeurs de nos travaux est le suivant : les effets de l'apoA-I et de l'apoE diffèrent selon la lignée. La principale différence entre les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 étant la sensibilité aux œstrogènes, il est possible d'imaginer que l'effet de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7 transite d'une manière ou d'une autre par le récepteur aux œstrogènes. Ce dernier, comme nous l'avons vu, est impliqué dans la dérégulation du cycle cellulaire et dans la stimulation de la prolifération, la migration, la Transition Epithélio-Mésenchymateuse ou bien encore l'invasion. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il serait judicieux de travailler avec un inhibiteur du récepteur à œstrogènes, ou mieux, un siARN dirigé spécifiquement contre lui, et de répéter les expériences de prolifération, de migration et d'invasion pour vérifier si les effets de l'apoA-I et de l'apoE disparaissent. Les cellules MDA-MB-231 seraient elles aussi utilisées pour servir de contrôle négatif. Si la théorie se confirme, inhiber le ER ne devrait avoir aucun impact sur les cellules MDA-MB-231, mais devrait diminuer la prolifération, la migration et l'invasion des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I et l'apoE.

Il est également à noter que si l'expression de la cavéoline-1 a été considérablement augmentée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, aucun changement d'expression de la cavéoline-1 n'a été retrouvé dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, dans le cas de cette dernière lignée, l'apoA-I et l'apoE augmentent la distribution de la cavéoline-1 à la surface des cellules. Il se pourrait donc que cette protéine soit au cœur des divergences d'effets de l'apoA-I et de l'apoE sur nos deux lignées cellulaires. Si dans le cas des MDA-MB-231, la localisation de la caveoline-1 à la membrane plasmique pourrait expliquer l'inhibition de la prolifération et l'inhibition des voies de signalisation associées, dans le cas des MCF-7, la différence pourrait provenir d'une différence de niveau d'expression et/ou du rôle de la cavéoline-1 dans la régulation de l'activité du récepteur aux œstrogènes ER α . La caveoline-1 pourrait en effet potentialiser la signalisation via le ER α , qu'elle est capable d'activer [501].

Enfin, il est important de noter que des différences en termes de survie sont également retrouvées chez les patients selon le type de cancer du sein considéré. En effet, si l'expression de l'apoA-I n'influe pas sur la survie des patientes, l'expression de l'apoE, en revanche, présente des effets différents en fonction du type de cancer du sein (**Figure 21**). Ainsi, une

forte expression de l'apoE (supérieure à une valeur médiane) est associée à une augmentation de la survie pour les cancers du sein de type « basal-like » (HR = 0,67 [0,52 – 0,87]), mais au contraire à une diminution de la survie pour les cancers du sein de type luminal A (HR = 1,46 [1,18 – 1,80]) [502]. Cette observation rejoint nos résultats : l'expression de l'apoE tend à diminuer le caractère agressif des cellules MDA-MB-231 (notamment en diminuant prolifération et migration), mais à augmenter le caractère agressif des cellules MCF-7 (notamment en augmentant prolifération et migration).

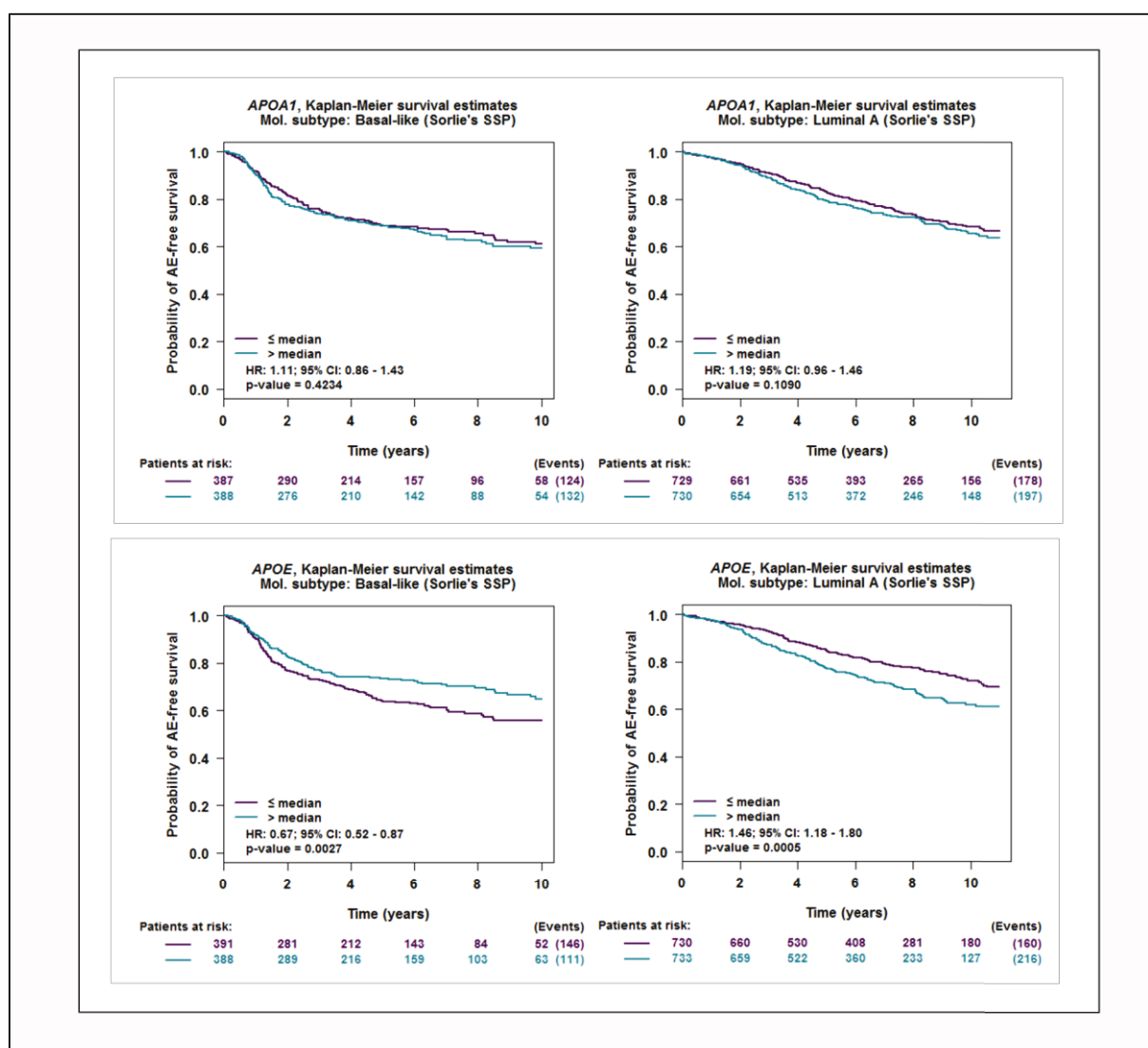


Figure 21 : Analyse de la survie sans apparition de tumeur en fonction de l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE. Les cancers du sein sont séparés par type : « basal-like » à gauche, « luminal A » à droite [502].

9) L'apoA-I et l'apoE diminuent la prolifération des cellules MDA-MB-231 : les voies de signalisation

Nos résultats concernant les cellules MDA-MB-231 rejoignent davantage la littérature actuelle quant au rôle de l'apoA-I dans le cancer [439]. En effet, l'apoA-I comme l'apoE ont exercé sur nos cellules MDA-MB-231 des effets plutôt anti-tumoraux. Ce résultat s'ajoute à ceux d'études préexistantes, comme celle de Alikhani et al. [199] qui a montré que l'injection des cellules Triples-Négatives Mvt-1 dans des souris *apoE*^{-/-} aboutissaient à la formation de tumeurs plus grosses.

Comme nous avons constaté que les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK sont suractivées dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE, il est possible d'imaginer qu'à l'inverse, ces deux voies se retrouvent sous-activées dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE. Une expérience préliminaire laisse présager que ces deux voies pourraient effectivement être sous-activées dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I (**Figure 21**).

Un de nos résultats intéressants concerne l'augmentation du contenu en oxystérols dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I. En effet, ces derniers sont des activateurs de LXR, lui-même étant un activateur de la transcription des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (dont l'expression tend effectivement à augmenter dans nos cellules MDA-MB-231) [503 , 504 , 505]. Il est possible d'envisager que ABCG1 joue un rôle important dans ces cellules, par exemple en stimulant une sortie de cholestérol (que nous n'avons pas constaté, mais qui peut tout de même être imaginée car nous avons mesuré le contenu en cholestérol total qui à lui seul peut ne pas refléter correctement les flux entrant et sortant de cholestérol), ce qui à terme entraînerait une diminution de la prolifération de ces cellules. En effet, El Roz et al. [434] ont montré en 2012 que le fait d'activer LXR permettait de réduire la prolifération des cellules MCF-7 et de déclencher des phénomènes d'apoptose, et que cela s'expliquait par une activation de la transcription d'ABCG1, responsable d'un flux sortant du cholestérol d'ordinaire nécessaire à la prolifération des cellules. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres équipes de recherche, y compris sur les cellules MDA-MB-231 [235 , 506]. Il faut également noter que dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I, le contenu en 27-hydroxycholestérol tend lui aussi à augmenter, or il est tout comme le 24-hydroxycholestérol un activateur de LXR.

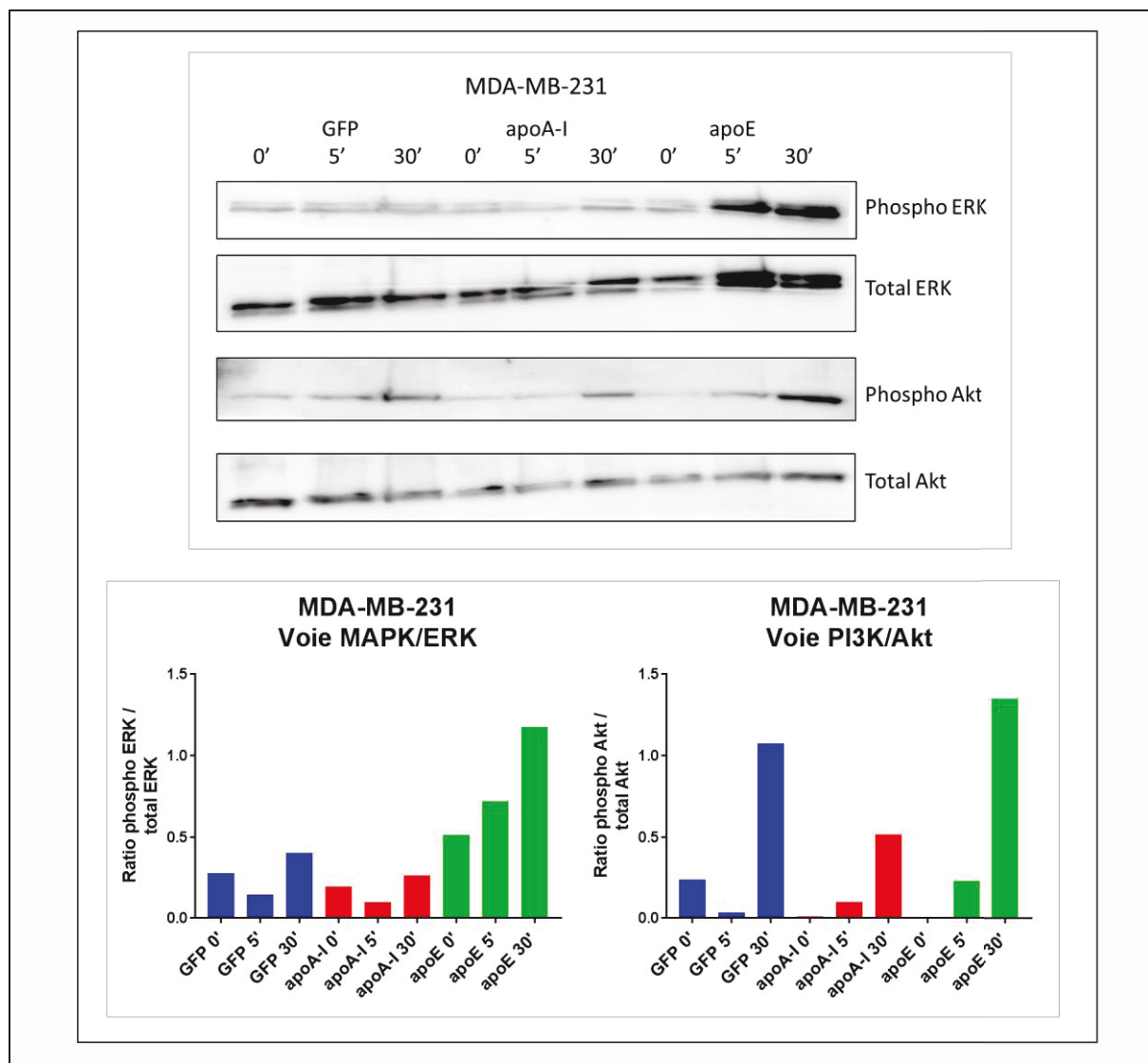


Figure 22 : Etude de l'activation des voies MAPK/ERK et PI3K/Akt dans les cellules MDA-MB-231 en réponse à un stimulus (10% SVF). Ceci est une expérience préliminaire n'ayant été réalisée qu'une seule fois.

10) L'apoA-I et l'apoE diminuent la migration des cellules MDA-MB-231, mais stimulent l'invasion

Les divergences de conclusion qui existent entre les expériences de migration et d'invasion menées sur les cellules MDA-MB-231 sont assez déconcertantes. En effet, il est au premier abord difficile d'envisager que des cellules qui migrent moins soient dans le même temps capables d'envahir plus. Cependant, il a été montré que les phénomènes de migration et d'invasion ne sont pas forcément corrélés positivement. En effet, Schaeffer et al. [507] se sont penchés sur cette question et ont montré que certaines cellules cancéreuses migraient moins après avoir subi la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (qui est l'étape clé pour que les cellules deviennent invasives) qu'avant, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que le fait d'induire la TEM en forçant l'expression du facteur de transcription TWIST1 diminuait la migration *in vitro*, et que dans ces deux cas l'invasion était augmentée en dépit de la diminution de la migration. Schaeffer et al. ont expliqué cela par une augmentation de l'adhésion cellule-cellule post-TEM (avant, les cellules adhèrent moins entre elles, ce qui facilite la migration individuelle).

Pour vérifier cette théorie, nous pourrions réaliser un test d'adhésion cellulaire et ainsi constater si les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE ont moins tendance à former des clusters de cellules que les cellules MDA-MB-231 contrôles n'exprimant que la GFP.

11) L'apoE inhibe la migration individuelle, mais stimule la migration collective des cellules MDA-MB-231

Nous avons montré que les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoE migraient moins que les cellules MDA-MB-231 n'exprimant que la GFP en inserts de migration (migration individuelle) mais migraient davantage en migration par cicatrisation (migration collective). A première vue, ce résultat peut sembler contre-intuitif, car beaucoup de leurs mécanismes sont communs. Cependant, il existe des différences entre ces deux types de migration. En effet, la migration individuelle nécessite dans un premier temps la polarisation des cellules, puis la déformation du bord avant des cellules, tout cela étant piloté par des modifications du

cytosquelette. S'ensuit la liaison au substrat, la dégradation protéolytique de ce qui constitue l'architecture de la cellule, et la contraction de l'actomyosine, qui permet le déplacement de la cellule. Dans le cadre de la migration collective, les cellules restent, comme son nom l'indique, reliées entre elles par des jonctions cellulaires à la fois à l'avant et sur les côtés. Pour se déplacer collectivement, les cellules doivent donc synchroniser leur polarisation, les remodelages du cytosquelette et pour ce faire, communiquer [508]. Il est donc possible d'envisager que l'impact de l'apoE au niveau individuel soit compensé par les capacités des cellules à communiquer ensemble pour se déplacer en groupe.

12) L'apoA-I et l'apoE modifient-elles la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux agents chimiothérapeutiques ?

Nos expériences en présence de doxorobucine ont mis en lumière certaines tendances, mais sans faire ressurgir d'effets statistiquement significatifs. Il faut préciser que nos expériences ont été réalisées sans changement de milieu, et ce même après un traitement de 7 jours. D'autres mécanismes de survie se sont donc mis en place pour s'ajouter à ceux de la résistance à la doxorobucine : ceux nécessaires à la survie dans un milieu de plus en plus pauvre en nutriments. Répéter cette expérience, mais cette fois en renouvelant le milieu toutes les 48 heures permettrait de mieux se rendre compte de l'effet de la doxorobucine seule. Il est connu, en effet, que le cholestérol peut influencer sur la résistance à la doxorobucine. Cela s'explique par le fait que la membrane cellulaire constitue le principal obstacle à surmonter pour les drogues, et nombreux sont les phénomènes de résistance qui passent par une impossibilité à franchir la membrane plasmique. Le cholestérol, en augmentant la rigidité de la membrane plasmique, diminue sa perméabilité à certaines drogues parmi lesquelles la doxorobucine [509]. Alves et al. [510] ont également montré en 2017 que la présence de cholestérol dans la membrane plasmique change la structure de cette dernière, ce qui n'a pas pour conséquence de modifier la façon dont la doxorobucine s'insère dans la membrane, mais réduit l'aptitude de l'agent chimiothérapeutique à jouer sur la fluidité membranaire. Plus la membrane plasmique est riche en cholestérol et plus la résistance à la doxorobucine est par conséquent augmentée.

Par ailleurs, il serait intéressant de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en présence de l'inhibiteur du récepteur à œstrogènes et de l'inhibiteur du transporteur ABCA1, car cela permettrait d'identifier des mécanismes impliqués dans ce phénomène de résistance à la doxorubicine. Des expériences en présence d'un siARN dirigé contre la cavéoline-1 sont également envisageables dans ce contexte. Enfin, la sensibilité à d'autres agents chimiothérapeutiques pourrait également être étudiée.

13) Effets de l'apoA-I et de l'apoE *in vivo*

In vivo, l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE dans les cellules MCF-7 a conduit à l'apparition de tumeurs plus grosses qui se sont développées plus rapidement, mais sans donner lieu à des métastases (rappelons que les cellules MCF-7 ne sont par définition pas très agressives et qu'il est donc difficile d'obtenir des métastases). Malheureusement, les tumeurs issues des cellules contrôles MCF-7 n'exprimant que la GFP n'ont pas assez grossi en taille pour être collectées dans leur totalité à la fin de l'expérience, ce qui nous a empêchés de procéder aux analyses des tumeurs initialement prévues (immunohistochimie, Western-Blot, mesure du cholestérol au sein des tumeurs). Il est possible d'imaginer qu'*in vivo*, l'apoA-I et l'apoE ne se contentent pas d'avoir un effet sur les cellules cancéreuses, mais agissent aussi sur le micro-environnement de la tumeur (macrophages, fibroblastes, tissu adipeux environnant). L'effet de l'expression de l'apoA-I sur les niveaux de cholestérol dans le plasma est d'ailleurs un bon indicateur de changements métaboliques à l'échelle de l'organisme, et non pas seulement à l'échelle de la tumeur. Nos résultats *in vivo* sont en concordance avec les conclusions de nos expériences *in vitro*, et apportent un nouveau regard sur l'effet potentiel de l'apoA-I *in vivo*. En effet, Cedó et al. [511] ont eux aussi étudié l'impact de l'apoA-I sur le développement de tumeurs mammaires, mais en ayant recours à deux techniques différentes de celle que nous avons employée. En utilisant des modèles de souris PyMT surexprimant l'apoA-I, ils n'ont pas rapporté d'effet de l'apoA-I sur le développement des tumeurs, bien que ces souris exhibent des niveaux de cholestérol total dans le sérum plus élevés ainsi que des niveaux de 27-hydroxycholestérol plus élevés également, à la fois dans le sérum et dans le tissu mammaire. Bien que contrairement aux auteurs de cette étude, nous ayons constaté une stimulation de la croissance tumorale après injection des cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I, nous avons tout de même en commun avec leurs résultats une augmentation des niveaux de cholestérol total. En utilisant un peptide

mimétique de l'apoA-I, en revanche, Cedó et al. sont parvenus à inhiber le développement tumoral dans des souris PyMT. Cela s'explique potentiellement par le fait que l'effet du peptide sur les niveaux de cholestérol est complètement différent de celui de la surexpression de l'apoA-I : diminution de la quantité de HDL-cholestérol, et réduction des niveaux de 27-hydroxycholestérol dans le sérum [511].

Il serait intéressant d'étudier le rôle de ces apolipoprotéines dans la formation de tumeurs *in vivo* par les cellules MDA-MB-231 mais aussi dans la formation de métastases. L'impact du cholestérol sur le développement métastatique dans le cadre du cancer du sein est en effet quelque chose que l'on retrouve dans la littérature. Awad et al. [512] ont ainsi montré que des souris suivant un régime alimentaire riche en cholestérol développaient des tumeurs plus volumineuses, et davantage de métastases (20%) que des souris suivant un régime riche en phytostérols (ces derniers étant responsable d'une diminution de 40% des niveaux de cholestérol sérique). Llaverias et al. [513] ont obtenu des résultats similaires en nourrissant des souris PyMT avec un régime alimentaire dit « occidental », enrichi en cholestérol. Baek et al. [514] ont rapporté que ce rôle pro-métastatique du cholestérol était dû à l'un de ses métabolites, le 27-hydroxycholestérol. Il serait intéressant, dans notre cas, d'injecter nos cellules MDA-MB-231 dans des souris athymiques immunodéficientes au niveau du tissu adipeux mammaire comme nous l'avons fait avec les cellules MCF-7, mais il est aussi envisageable d'injecter les cellules au niveau de la veine caudale pour, à chaque fois, mesurer le développement de métastases pulmonaires [515].

14) Perspectives thérapeutiques

Nous avons rapporté que l'apoA-I et l'apoE ralentissent la prolifération des cellules MDA-MB-231, et cela constitue notre résultat principal en termes de nouvelles approches thérapeutiques possibles. Cette lignée cellulaire est en effet représentative des cancers du sein Triples-Négatifs, qui sont non seulement les plus agressifs, mais aussi les plus difficiles à traiter, car ne répondant pas aux thérapies hormonales, et il est donc plus que nécessaire de découvrir de nouvelles façons de s'attaquer à ce type de cancers. Il serait intéressant, au vu de nos résultats, de trouver un moyen de surexprimer l'apoA-I ou l'apoE dans les cellules cancéreuses. Il est connu, par exemple, que certaines hormones comme les glucocorticoïdes peuvent stimuler la transcription de l'apoA-I [516 , 517]. Le glucose et l'insuline peuvent également influencer sur la

transcription de l'apoA-I : le glucose diminue l'activité du promoteur du gène codant pour l'apoA-I, tandis que l'insuline a l'effet inverse [518]. Jouer sur le pH pourrait également être envisagé, car il a été montré que l'acidose inhibe la transcription de l'apoA-I [519]. Certains facteurs de croissance, comme l'EGF, sont également capables d'augmenter l'expression de l'apoA-I [520]. Une modulation de certains nutriments peut également être envisagée, car il a été montré que certains peuvent modifier l'expression de l'apoA-I : de fortes concentrations en zinc ou en chrome, notamment, entraînent une diminution de son expression [521 , 522]. Cependant, il pourrait être nécessaire de diminuer la méthylation du gène codant pour l'apoA-I pour améliorer sa transcription [523]. Pour réguler l'expression de l'apoE, un moyen peut être d'agir sur le récepteur nucléaire PPAR γ . Ce dernier est en effet impliqué dans la modulation de la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans divers processus physiologiques et particulièrement importants pour le métabolisme des adipocytes [524]. Yue et al. [525] ont par exemple montré que l'utilisation de pioglitazone et de rosiglitazone, qui sont deux agonistes de PPAR γ et deux médicaments utilisés dans le cadre du diabète, peuvent augmenter l'expression de l'apoE.

Chapitre V : Conclusion

Etablir un lien entre cholestérol et cancer du sein, tel était l'objectif de notre projet. L'ambition était double : confirmer le rôle du cholestérol comme facteur de risque de la maladie, et faire émerger de nouvelles pistes thérapeutiques. En surexprimant l'apoA-I et l'apoE dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, nous pensions fortement influencer sur les niveaux de cholestérol, et aisément relier ces modifications à des conséquences éventuelles sur le phénotype cancéreux. Au cours de ces dernières années, et comme il est de coutume dans le monde des sciences, nous avons rencontré plus d'une difficulté, et nous avons été, parfois, contraints de repenser nos hypothèses. De nos résultats, il ressort plusieurs éléments intéressants. Certains étaient attendus, d'autres un peu moins, mais beaucoup nécessitent d'être étudiés davantage pour être mieux compris.

L'expression de l'apoA-I ou de l'apoE conduit, de manière générale, à augmenter l'agressivité des cellules MCF-7. *In vitro*, elles stimulent la prolifération, la migration, la Transition Epithélio-Mésenchymateuse et l'invasion de ces cellules, et *in vivo*, elles stimulent la croissance tumorale de ces mêmes cellules. Nous avons montré que les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK sont impliquées dans les effets pro-prolifératifs et pro-migratoires de l'apoA-I et de l'apoE, mais aussi et surtout, nous avons mis en lumière le rôle potentiel de la cavéoline-1 dans la médiation de ces effets. Ce dernier élément est particulièrement important, car il vient s'ajouter à une littérature déjà complexe et controversée au sujet de l'influence de la cavéoline-1 sur le cancer. Cette dernière est en effet présentée, selon l'étude et le type de cancer, parfois comme pro-tumorale, parfois comme anti-tumorale. Dans notre cas, la cavéoline-1 semble jouer un rôle pro-tumoral, tout du moins dans le cas des cellules MCF-7. Il conviendrait, par la suite, d'étudier plus en détails son implication et les mécanismes sous-jacents de son action dans nos cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE. Ceci constitue, à notre sens, une perspective importante de notre projet.

L'expression de l'apoA-I ou de l'apoE conduit, de manière générale, à diminuer l'agressivité des cellules MDA-MB-231. L'apoA-I, en particulier, freine la prolifération et la migration de ces cellules. Cette différence majeure entre cette lignée cellulaire, Triple-Négative, et la lignée MCF-7, ER-positif, constitue en soi un élément d'étude intéressant. La question de l'implication du récepteur aux œstrogènes dans les effets de l'apoA-I et de l'apoE sur les cellules MCF-7 est légitime, et il serait pertinent de tenter d'y répondre par de futures

expériences. L'autre perspective intéressante de ce projet serait le développement d'une approche impliquant l'utilisation de l'apoA-I ou l'apoE pour traiter les cancers Triple-Négatifs.

L'impact exact du cholestérol dans les effets de l'apoA-I et de l'apoE que nous observons n'est pas encore tout à fait compris. Si nous n'avons pas nécessairement observé d'augmentation ou de diminution majeure du contenu en cholestérol total, nous avons tout de même rapporté un certain nombre de modifications indirectes du métabolisme du cholestérol. En particulier, *in vitro* la répartition du cholestérol cellulaire a été modifiée dans toutes nos lignées. Le contenu en esters de cholestérol a été augmenté dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I. Certains stérols ont été impactés dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE. La fluidité membranaire a été augmentée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I. La répartition de la cavéoline-1 a été modifiée dans les cellules MDA-MB-231 exprimant l'apoA-I ou l'apoE et son expression, comme nous l'avons déjà mentionné, a été augmentée dans les cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ou l'apoE. *In vivo*, les souris ayant subi une injection de cellules MCF-7 exprimant l'apoA-I ont vu leurs niveaux de cholestérol sanguins augmenter et leurs niveaux de desmostérol sanguin diminuer. De façon à mieux comprendre les changements qui s'opèrent, d'autres expériences sont à envisager. La mesure du contenu en phospholipides, par exemple, permettrait de mieux se rendre compte des modifications ayant lieu au niveau de la membrane plasmique. Le recours à du cholestérol marqué pourrait quant à lui permettre de décrire le devenir du cholestérol dans nos cellules.

Dans l'ensemble, nos résultats nous paraissent prometteurs, et mériteraient d'être creusés davantage pour être confirmés ou mieux compris. Au-delà de notre projet, l'impact des recherches menées sur le cholestérol et ses dérivés en général est à notre sens très important. A l'heure du « manger bien », du « manger mieux », et de la prise de conscience collective quant aux effets parfois désastreux de notre alimentation sur notre santé, il est important de continuer à étudier ces thématiques pour, si ce n'est mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques (nécessaires même dans le cas du cancer du sein qui demeure parfois très agressif même s'il est relativement bien soigné dans son ensemble), tout du moins mettre en lumière certains facteurs de risque sur lesquels il est facile d'agir au quotidien. Et ainsi, peut-être, prévenir des maux tout en osant croire qu'ils ne se concrétiseront jamais.

Références

- [1] "The Edwin Smith Surgical papyrus," *JH Breasted* 1984. 1930.
- [2] J. R. P. Albert S Lyons, *Medicine: an illustrated history*. Abradale/Abrams, 1987.
- [3] D. Toft and J. Gorski, "A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 55, no. 6, pp. 1574-1581, 1966, doi: 10.1073/pnas.55.6.1574.
- [4] G. T. Beatson, "On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases," (in eng), *Trans Med Chir Soc Edinb*, vol. 15, pp. 153-179, 1896. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29584099>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518378/>.
- [5] S. Boyd, "On Oöphorectomy In Cancer Of The Breast," *The British Medical Journal*, vol. 2, no. 2077, pp. 1161-1167, 1900. [Online]. Available: www.jstor.org/stable/20266091.
- [6] E. V. Jensen and V. C. Jordan, "The Estrogen Receptor," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 6, p. 1980, 2003. [Online]. Available: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/6/1980.abstract>.
- [7] E. F. Lewison, "The surgical treatment of breast cancer: an historical and collective review," (in eng), *Surgery*, vol. 34, no. 5, pp. 904-53, Nov 1953.
- [8] K. A. Ekmektzoglou, T. Xanthos, V. German, and G. C. Zografos, "Breast cancer: from the earliest times through to the end of the 20th century," (in eng), *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 145, no. 1, pp. 3-8, Jul 2009, doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.03.017.
- [9] R. Lakhtakia and R. F. Chinoy, "A Brief History of Breast Cancer: Part II - Evolution of surgical pathology," (in eng), *Sultan Qaboos Univ Med J*, vol. 14, no. 3, pp. e319-e322, 2014. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097765>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117655/>.
- [10] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, no. 6, pp. 394-424, 2018/11/01 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [11] E. D. K. Jéhannin-Ligier, N. Bossard, F. Molinié, G. Defossez, L. Daubisse-Marliac, L. Remontet, Z. Uhry "Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017. Rapport technique.," Santé publique France, 2017.
- [12] S. L. G.-P. Gautier Defossez, Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Laurent Remontet, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony, Patricia Delafosse, Florence Molinié, Anne-Sophie Woronoff, Anne-Marie Bouvier, Nadine Bossard, Alain Monnereau, "Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018," Santé Publique France, Institut National du Cancer, 2019.
- [13] I. N. d. Cancer, "Les cancers en France : essentiel des faits et chiffres/Edition 2019," 2019.
- [14] G. C. Observatory. "Cancer Today." http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&population_ns=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D (accessed).
- [15] I. N. d. Cancer. "Projection d'incidence et de mortalité des cancers en 2017." <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/Incidence-mortalite-nationale/Projection-d-incidence-et-de-mortalite-des-cancers-en-2017> (accessed).

- [16] C. N. E. Board, "Cancer.Net's Guide to Breast Cancer," 2019.
- [17] C. A. Quiet, D. J. Ferguson, R. R. Weichselbaum, and S. Hellman, "Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 13, no. 5, pp. 1144-1151, 1995/05/01 1995, doi: 10.1200/JCO.1995.13.5.1144.
- [18] G. N. Hortobagyi, "The curability of breast cancer: present and future," *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 1, no. 1, pp. 24-34, 2003/09/01/ 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S1359-6349\(03\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6349(03)00003-X).
- [19] P. Schmid *et al.*, "Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 22, pp. 2108-2121, 2018/11/29 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1809615.
- [20] Y. Feng *et al.*, "Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis," (in eng), *Genes Dis*, vol. 5, no. 2, pp. 77-106, Jun 2018, doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001.
- [21] K. H. Allison, "Molecular Pathology of Breast Cancer: What a Pathologist Needs to Know," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 138, no. 6, pp. 770-780, 2012, doi: 10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO.
- [22] Y. Feng *et al.*, "Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis," (in eng), *Genes Dis*, vol. 5, no. 2, pp. 77-106, 2018, doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001.
- [23] R. Sever and J. S. Brugge, "Signal transduction in cancer," (in eng), *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 5, no. 4, Apr 1 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a006098.
- [24] M. Nadji, C. Gomez-Fernandez, P. Ganjei-Azar, and A. R. Morales, "Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers," (in eng), *Am J Clin Pathol*, vol. 123, no. 1, pp. 21-7, Jan 2005, doi: 10.1309/4wv79n2ghj3x1841.
- [25] V. Kumar, S. Green, G. Stack, M. Berry, J. R. Jin, and P. Chambon, "Functional domains of the human estrogen receptor," (in eng), *Cell*, vol. 51, no. 6, pp. 941-51, Dec 24 1987, doi: 10.1016/0092-8674(87)90581-2.
- [26] E. N. Imyanitov and K. P. Hanson, "Mechanisms of breast cancer," *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, vol. 1, no. 2, pp. 235-245, 2004/11/01/ 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2004.09.002>.
- [27] S. Fan *et al.*, "Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity," (in eng), *Oncogene*, vol. 20, no. 1, pp. 77-87, Jan 4 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204073.
- [28] R. M. Zwijsen, E. Wientjens, R. Klompmaaker, J. van der Sman, R. Bernards, and R. J. Michalides, "CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1," (in eng), *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 405-15, Feb 7 1997, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81879-6.
- [29] A. S. Lundberg and R. A. Weinberg, "Control of the cell cycle and apoptosis," (in eng), *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 35, no. 14, pp. 1886-94, Dec 1999, doi: 10.1016/s0959-8049(99)00292-0.
- [30] A. W. Burgess, "EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets," (in eng), *Growth factors (Chur, Switzerland)*, vol. 26, no. 5, pp. 263-74, Oct 2008, doi: 10.1080/08977190802312844.
- [31] M. M. Moasser, "The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis," (in eng), *Oncogene*, vol. 26, no. 45, pp. 6469-6487, 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210477.
- [32] E. Tzahar *et al.*, "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 16, no. 10, pp. 5276-87, Oct 1996, doi: 10.1128/mcb.16.10.5276.
- [33] K. Yang *et al.*, "The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies," (in eng), *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 96, no. 2, pp. 116-36, Feb 2016, doi: 10.1038/labinvest.2015.144.

- [34] R. L. Sutherland and E. A. Musgrove, "Cyclins and Breast Cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 9, no. 1, pp. 95-104, 2004/01/01 2004, doi: 10.1023/B:JOMG.0000023591.45568.77.
- [35] D. A. Guertin and D. M. Sabatini, "Defining the role of mTOR in cancer," (in eng), *Cancer cell*, vol. 12, no. 1, pp. 9-22, Jul 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.05.008.
- [36] T. W. Miller, B. N. Rexer, J. T. Garrett, and C. L. Arteaga, "Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 13, no. 6, pp. 224-224, 2011, doi: 10.1186/bcr3039.
- [37] D. A. Fruman and C. Rommel, "PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities," (in eng), *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 13, no. 2, pp. 140-56, Feb 2014, doi: 10.1038/nrd4204.
- [38] A. Khwaja, P. Rodriguez-Vician, S. Wennström, P. H. Warne, and J. Downward, "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway," (in eng), *EMBO J*, vol. 16, no. 10, pp. 2783-2793, 1997, doi: 10.1093/emboj/16.10.2783.
- [39] B. Singh *et al.*, "p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas," (in eng), *Genes & development*, vol. 16, no. 8, pp. 984-93, Apr 15 2002, doi: 10.1101/gad.973602.
- [40] S. Koren *et al.*, "PIK3CA(H1047R) induces multipotency and multi-lineage mammary tumours," (in eng), *Nature*, vol. 525, no. 7567, pp. 114-8, Sep 3 2015, doi: 10.1038/nature14669.
- [41] G. Perez-Tenorio and O. Stal, "Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 86, no. 4, pp. 540-5, Feb 12 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600126.
- [42] E. K. Kim *et al.*, "Phosphorylated S6K1 is a possible marker for endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer," (in eng), *Breast Cancer Res Treat*, vol. 126, no. 1, pp. 93-9, Feb 2011, doi: 10.1007/s10549-010-1315-z.
- [43] F. Radtke and K. Raj, "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?," (in eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 3, no. 10, pp. 756-67, Oct 2003, doi: 10.1038/nrc1186.
- [44] A. Rangarajan, R. Syal, S. Selvarajah, O. Chakrabarti, A. Sarin, and S. Krishna, "Activated Notch1 Signaling Cooperates with Papillomavirus Oncogenes in Transformation and Generates Resistance to Apoptosis on Matrix Withdrawal through PKB/Akt," *Virology*, vol. 286, no. 1, pp. 23-30, 2001/07/20/ 2001, doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0867>.
- [45] Y. Chen, W. H. Fischer, and G. N. Gill, "Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJkappa and NOTCH," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 22, pp. 14110-4, May 30 1997, doi: 10.1074/jbc.272.22.14110.
- [46] M. Reedijk *et al.*, "High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival," (in eng), *Cancer Res*, vol. 65, no. 18, pp. 8530-7, Sep 15 2005, doi: 10.1158/0008-5472.can-05-1069.
- [47] B. C. Dickson *et al.*, "High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer," (in eng), *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 20, no. 6, pp. 685-93, Jun 2007, doi: 10.1038/modpathol.3800785.
- [48] G. Dontu, K. W. Jackson, E. McNicholas, M. J. Kawamura, W. M. Abdallah, and M. S. Wicha, "Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 6, no. 6, pp. R605-15, 2004, doi: 10.1186/bcr920.
- [49] P. J. Mitchell *et al.*, "Cloning and characterisation of cDNAs encoding a novel non-receptor tyrosine kinase, brk, expressed in human breast tumours," (in eng), *Oncogene*, vol. 9, no. 8, pp. 2383-90, Aug 1994.

- [50] K. T. Barker, L. E. Jackson, and M. R. Crompton, "BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas," (in eng), *Oncogene*, vol. 15, no. 7, pp. 799-805, Aug 14 1997, doi: 10.1038/sj.onc.1201241.
- [51] N. Ludyga, N. Anastasov, I. Gonzalez-Vasconcellos, M. Ram, H. Hofler, and M. Aubele, "Impact of protein tyrosine kinase 6 (PTK6) on human epidermal growth factor receptor (HER) signalling in breast cancer," (in eng), *Molecular bioSystems*, vol. 7, no. 5, pp. 1603-12, May 2011, doi: 10.1039/c0mb00286k.
- [52] S. Miah, A. Martin, and K. E. Lukong, "Constitutive activation of breast tumor kinase accelerates cell migration and tumor growth in vivo," (in eng), *Oncogenesis*, vol. 1, p. e11, May 7 2012, doi: 10.1038/oncsis.2012.11.
- [53] J. Jiang and C. C. Hui, "Hedgehog signaling in development and cancer," (in eng), *Developmental cell*, vol. 15, no. 6, pp. 801-12, Dec 2008, doi: 10.1016/j.devcel.2008.11.010.
- [54] M. Fiaschi, B. Rozell, A. Bergstrom, R. Toftgard, and M. I. Kleman, "Targeted expression of GLI1 in the mammary gland disrupts pregnancy-induced maturation and causes lactation failure," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 49, pp. 36090-101, Dec 7 2007, doi: 10.1074/jbc.M704280200.
- [55] E. Garcia-Zaragoza *et al.*, "Intraepithelial paracrine Hedgehog signaling induces the expansion of ciliated cells that express diverse progenitor cell markers in the basal epithelium of the mouse mammary gland," (in eng), *Developmental biology*, vol. 372, no. 1, pp. 28-44, Dec 1 2012, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.09.005.
- [56] K. S. Jeng, I. S. Sheen, W. J. Jeng, M. C. Yu, H. I. Hsiau, and F. Y. Chang, "High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma," (in eng), *OncoTargets and therapy*, vol. 7, pp. 79-86, 2013, doi: 10.2147/ott.s54702.
- [57] S. J. Thomas, J. A. Snowden, M. P. Zeidler, and S. J. Danson, "The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 113, no. 3, pp. 365-371, 2015, doi: 10.1038/bjc.2015.233.
- [58] A. S. Nascimento *et al.*, "Phosphoproteome profiling reveals critical role of JAK-STAT signaling in maintaining chemoresistance in breast cancer," *Oncotarget; Vol 8, No 70*, 2017. [Online]. Available: <http://legacy.ontotarget.com/index.php?journal=ontotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=21801&path%5B%5D=69164>.
- [59] S. Ko, J. Y. Kim, J. Jeong, J. E. Lee, W. I. Yang, and W. H. Jung, "The role and regulatory mechanism of 14-3-3 sigma in human breast cancer," (in eng), *Journal of breast cancer*, vol. 17, no. 3, pp. 207-218, 2014, doi: 10.4048/jbc.2014.17.3.207.
- [60] R. E. Tamura, J. F. de Vasconcellos, D. Sarkar, T. A. Libermann, P. B. Fisher, and L. F. Zerbini, "GADD45 proteins: central players in tumorigenesis," (in eng), *Curr Mol Med*, vol. 12, no. 5, pp. 634-651, 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22515981>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797964/>.
- [61] S. Janssens and A. Tinel, "The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 19, no. 1, pp. 13-20, 2012, doi: 10.1038/cdd.2011.162.
- [62] H. Uramoto, K. Sugio, T. Oyama, T. Hanagiri, and K. Yasumoto, "P53R2, p53 inducible ribonucleotide reductase gene, correlated with tumor progression of non-small cell lung cancer," (in eng), *Anticancer Res*, vol. 26, no. 2a, pp. 983-8, Mar-Apr 2006.
- [63] T. Mashimo *et al.*, "The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 19, pp. 11307-11311, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.19.11307.
- [64] M. Gasco, S. Shami, and T. Crook, "The p53 pathway in breast cancer," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 4, no. 2, pp. 70-76, 2002, doi: 10.1186/bcr426.
- [65] B. Wang *et al.*, "Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response," (in eng), *Science*, vol. 316, no. 5828, pp. 1194-8, May 25 2007, doi: 10.1126/science.1139476.

- [66] R. Roy, J. Chun, and S. N. Powell, "BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection," (in eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 12, no. 1, pp. 68-78, 2011, doi: 10.1038/nrc3181.
- [67] O. A. Stefansson *et al.*, "Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 11, no. 4, p. R47, 2009, doi: 10.1186/bcr2334.
- [68] S. Fan *et al.*, "BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells," (in eng), *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1354-6, May 21 1999, doi: 10.1126/science.284.5418.1354.
- [69] C. Mant and J. Cason, "A human murine mammary tumour virus-like agent is an unconvincing aetiological agent for human breast cancer," *Reviews in Medical Virology*, vol. 14, no. 3, pp. 169-177, 2004/05/01 2004, doi: 10.1002/rmv.427.
- [70] S. E. Singletary, "Rating the risk factors for breast cancer," (in eng), *Ann Surg*, vol. 237, no. 4, pp. 474-482, 2003, doi: 10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87.
- [71] "Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease," (in eng), *Lancet (London, England)*, vol. 358, no. 9291, pp. 1389-99, Oct 27 2001, doi: 10.1016/s0140-6736(01)06524-2.
- [72] G. A. Colditz, K. A. Kaphingst, S. E. Hankinson, and B. Rosner, "Family history and risk of breast cancer: nurses' health study," (in eng), *Breast Cancer Res Treat*, vol. 133, no. 3, pp. 1097-104, Jun 2012, doi: 10.1007/s10549-012-1985-9.
- [73] H. R. Brewer, M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth, and A. J. Swerdlow, "Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure," (in eng), *Breast cancer research and treatment*, vol. 165, no. 1, pp. 193-200, 2017, doi: 10.1007/s10549-017-4325-2.
- [74] Y.-S. Sun *et al.*, "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer," (in eng), *Int J Biol Sci*, vol. 13, no. 11, pp. 1387-1397, 2017, doi: 10.7150/ijbs.21635.
- [75] K. L. Nathanson, B. L. Wooster R Fau - Weber, and B. L. Weber, "Breast cancer genetics: what we know and what we need," (in eng), no. 1078-8956 (Print).
- [76] S. A. Narod and W. D. Foulkes, "BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond," (in eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 4, no. 9, pp. 665-76, Sep 2004, doi: 10.1038/nrc1431.
- [77] A. Antoniou *et al.*, "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies," (in eng), *Am J Hum Genet*, vol. 72, no. 5, pp. 1117-1130, 2003, doi: 10.1086/375033.
- [78] B. B. Roa, A. A. Boyd, K. Volcik, and C. S. Richards, "Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2," (in eng), *Nature genetics*, vol. 14, no. 2, pp. 185-7, Oct 1996, doi: 10.1038/ng1096-185.
- [79] R. T. Neff, L. Senter, and R. Salani, "BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations," *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, vol. 9, no. 8, pp. 519-531, 2017/08/01 2017, doi: 10.1177/1758834017714993.
- [80] P. D. Pharoah, N. E. Day, and C. Caldas, "Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 80, no. 12, pp. 1968-1973, 1999, doi: 10.1038/sj.bjc.6690628.
- [81] M. Cristofanilli and G. N. Hortobagyi, "Molecular targets in breast cancer: current status and future directions," (in eng), no. 1351-0088 (Print).
- [82] T. Mukohara, "PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications," (in eng), *Breast cancer (Dove Medical Press)*, vol. 7, pp. 111-23, 2015, doi: 10.2147/bctt.s60696.
- [83] D. F. Easton, "The inherited component of cancer," (in eng), *British medical bulletin*, vol. 50, no. 3, pp. 527-35, Jul 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072908.
- [84] P. Apostolou and I. Papasotiriou, "Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer," (in eng), *Breast cancer (Dove Medical Press)*, vol. 9, pp. 331-335, 2017, doi: 10.2147/bctt.s111394.

- [85] M. M. de Jong *et al.*, "Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility," (in eng), *Journal of medical genetics*, vol. 39, no. 4, pp. 225-42, Apr 2002, doi: 10.1136/jmg.39.4.225.
 - [86] M. Yalaza, A. İnan, and M. Bozer, "Male Breast Cancer," (in eng), *J Breast Health*, vol. 12, no. 1, pp. 1-8, 2016, doi: 10.5152/tjbh.2015.2711.
 - [87] F. Ravandi-Kashani and T. G. Hayes, "Male breast cancer: a review of the literature," (in eng), *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 34, no. 9, pp. 1341-7, Aug 1998, doi: 10.1016/s0959-8049(98)00028-8.
 - [88] H. Miao *et al.*, "Incidence and Outcome of Male Breast Cancer: An International Population-Based Study," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, no. 33, pp. 4381-4386, 2011/11/20 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.36.8902.
 - [89] C. Gomez-Raposo, F. Zambrana Tevar, M. Sereno Moyano, M. Lopez Gomez, and E. Casado, "Male breast cancer," (in eng), *Cancer treatment reviews*, vol. 36, no. 6, pp. 451-7, Oct 2010, doi: 10.1016/j.ctrv.2010.02.002.
 - [90] K. Stavraky and S. Emmons, "Breast cancer in premenopausal and postmenopausal women," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 53, no. 3, pp. 647-54, Sep 1974, doi: 10.1093/jnci/53.3.647.
 - [91] J. Horn, B. O. Åsvold, S. Opdahl, S. Tretli, and L. J. Vatten, "Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 139, no. 1, pp. 237-243, 2013/05/01 2013, doi: 10.1007/s10549-013-2531-0.
 - [92] M. Khalis *et al.*, "Menstrual and reproductive factors and risk of breast cancer: A case-control study in the Fez region, Morocco," (in eng), *PloS one*, vol. 13, no. 1, pp. e0191333-e0191333, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0191333.
 - [93] C. Sweeney, C. K. Blair, K. E. Anderson, D. Lazovich, and A. R. Folsom, "Risk Factors for Breast Cancer in Elderly Women," *American Journal of Epidemiology*, vol. 160, no. 9, pp. 868-875, 2004, doi: 10.1093/aje/kwh276.
 - [94] F. Clavel-Chapelon and M. Gerber, "Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis?," (in eng), *Breast cancer research and treatment*, vol. 72, no. 2, pp. 107-115, 2002. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038701>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1925053/>.
- [95] V. Rosato *et al.*, "Reproductive and hormonal factors, family history, and breast cancer according to the hormonal receptor status," (in eng), *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, vol. 23, no. 5, pp. 412-7, Sep 2014, doi: 10.1097/CEJ.0b013e3283639f7a.
 - [96] H. Endogenous *et al.*, "Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies," (in eng), *Lancet Oncol*, vol. 14, no. 10, pp. 1009-1019, 2013, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70301-2.
 - [97] D. J. Press *et al.*, "Breast Cancer Risk and Ovariectomy, Hysterectomy, and Tubal Sterilization in the Women's Contraceptive and Reproductive Experiences Study," *American Journal of Epidemiology*, vol. 173, no. 1, pp. 38-47, 2010, doi: 10.1093/aje/kwq339.
 - [98] N. Kreiger, M. Sloan, M. Cotterchio, and V. Kirsh, "The risk of breast cancer following reproductive surgery," *European Journal of Cancer*, vol. 35, no. 1, pp. 97-101, 1999/01/01/ 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00343-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00343-8).
 - [99] A. Soroush, N. Farshchian, S. Komasi, N. Izadi, N. Amirifard, and A. Shahmohammadi, "The Role of Oral Contraceptive Pills on Increased Risk of Breast Cancer in Iranian Populations: A Meta-analysis," (in eng), *J Cancer Prev*, vol. 21, no. 4, pp. 294-301, 2016, doi: 10.15430/JCP.2016.21.4.294.
 - [100] T. N. Bethea *et al.*, "A case-control analysis of oral contraceptive use and breast cancer subtypes in the African American Breast Cancer Epidemiology and Risk Consortium," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 17, no. 1, pp. 22-22, 2015, doi: 10.1186/s13058-015-0535-x.

- [101] "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study," *The Lancet*, vol. 362, no. 9382, pp. 419-427, 2003/08/09/ 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14065-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14065-2).
- [102] J.-Y. Liu, T.-J. Chen, and S.-J. Hwang, "The Risk of Breast Cancer in Women Using Menopausal Hormone Replacement Therapy in Taiwan," (in eng), *Int J Environ Res Public Health*, vol. 13, no. 5, p. 482, 2016, doi: 10.3390/ijerph13050482.
- [103] L. Holmberg and H. Anderson, "HABITS (hormonal replacement therapy after breast cancer— is it safe?), a randomised comparison: trial stopped," *The Lancet*, vol. 363, no. 9407, pp. 453-455, 2004/02/07/ 2004, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15493-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15493-7).
- [104] M. Fahlén *et al.*, "Hormone replacement therapy after breast cancer: 10 year follow up of the Stockholm randomised trial," *European Journal of Cancer*, vol. 49, no. 1, pp. 52-59, 2013/01/01/ 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.07.003>.
- [105] I. Writing Group for the Women's Health Initiative, "Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal WomenPrincipal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial," *JAMA*, vol. 288, no. 3, pp. 321-333, 2002, doi: 10.1001/jama.288.3.321.
- [106] P. M. Ravdin *et al.*, "The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States," *New England Journal of Medicine*, vol. 356, no. 16, pp. 1670-1674, 2007/04/19 2007, doi: 10.1056/NEJMs070105.
- [107] S. Yamazaki, H. Sakakibara, H. Takemura, and K. Shimoi, "4-Hydroxyestradiol Induces γ -H2AX in the Presence of an Inhibitor of Catechol-O-methyltransferase in Human Breast Cancer MCF-7 Cells," *Genes and Environment*, vol. 34, pp. 129-135, 01/01 2012, doi: 10.3123/jemsge.34.129.
- [108] R. J. Santen, W. Yue, and J. P. Wang, "Estrogen metabolites and breast cancer," (in eng), *Steroids*, vol. 99, no. Pt A, pp. 61-6, Jul 2015, doi: 10.1016/j.steroids.2014.08.003.
- [109] V. C. Jordan, "The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer," (in eng), *Endocr Relat Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. R1-31, Feb 2015, doi: 10.1530/erc-14-0448.
- [110] S. C. Newman, A. B. Miller, and G. R. Howe, "A STUDY OF THE EFFECT OF WEIGHT AND DIETARY FAT ON BREAST CANCER SURVIVAL TIME," *American Journal of Epidemiology*, vol. 123, no. 5, pp. 767-774, 1986, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114305.
- [111] A. M. Y. Nomura, L. Le Marchand, L. N. Kolonel, and J. H. Hankin, "The effect of dietary fat on breast cancer survival among Caucasian and Japanese women in Hawaii," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 18, no. 1, pp. S135-S141, 1991/05/01 1991, doi: 10.1007/BF02633546.
- [112] M. D. Holmes, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, B. Rosner, D. J. Hunter, and W. C. Willett, "Dietary factors and the survival of women with breast carcinoma," *Cancer*, vol. 86, no. 5, pp. 826-835, 1999/09/01 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990901)86:5<826::AID-CNCR19>3.0.CO;2-O.
- [113] S. Kyogoku, T. Hirohata, Y. Nomura, T. Shigematsu, S. Takeshita, and I. Hirohata, "Diet and prognosis of breast cancer," *Nutrition and Cancer*, vol. 17, no. 3, pp. 271-277, 1992/01/01 1992, doi: 10.1080/01635589209514196.
- [114] Y. Cao, L. Hou, and W. Wang, "Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies," *International Journal of Cancer*, vol. 138, no. 8, pp. 1894-1904, 2016/04/15 2016, doi: 10.1002/ijc.29938.
- [115] C. Catsburg, R. S. Kim, V. A. Kirsh, C. L. Soskolne, N. Kreiger, and T. E. Rohan, "Dietary patterns and breast cancer risk: a study in 2 cohorts," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 101, no. 4, pp. 817-823, 2015, doi: 10.3945/ajcn.114.097659.
- [116] J. H. Kim, J. Lee, S.-Y. Jung, and J. Kim, "Dietary Factors and Female Breast Cancer Risk: A Prospective Cohort Study," (in eng), *Nutrients*, vol. 9, no. 12, p. 1331, 2017, doi: 10.3390/nu9121331.

- [117] P. A. van den Brandt and M. Schulpén, "Mediterranean diet adherence and risk of postmenopausal breast cancer: results of a cohort study and meta-analysis," *International Journal of Cancer*, vol. 140, no. 10, pp. 2220-2231, 2017/05/15 2017, doi: 10.1002/ijc.30654.
- [118] R. E. Patterson *et al.*, "Marine fatty acid intake is associated with breast cancer prognosis," (in eng), *J Nutr*, vol. 141, no. 2, pp. 201-206, 2011, doi: 10.3945/jn.110.128777.
- [119] M. S. Farvid, W. Y. Chen, K. B. Michels, E. Cho, W. C. Willett, and A. H. Eliassen, "Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study," *BMJ*, vol. 353, p. i2343, 2016, doi: 10.1136/bmj.i2343.
- [120] N. Hamajima *et al.*, "Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 87, no. 11, pp. 1234-1245, 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600596.
- [121] E. B. Harvey, C. Schairer, L. A. Brinton, R. N. Hoover, and J. F. Fraumeni, Jr., "Alcohol Consumption and Breast Cancer," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 78, no. 4, pp. 657-661, 1987, doi: 10.1093/jnci/78.4.657.
- [122] W. C. Willett, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, B. A. Rosner, C. H. Hennekens, and F. E. Speizer, "Moderate Alcohol Consumption and the Risk of Breast Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 316, no. 19, pp. 1174-1180, 1987/05/07 1987, doi: 10.1056/NEJM198705073161902.
- [123] W. Y. Chen, B. Rosner, S. E. Hankinson, G. A. Colditz, and W. C. Willett, "Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk," *JAMA*, vol. 306, no. 17, pp. 1884-1890, 2011, doi: 10.1001/jama.2011.1590.
- [124] S. Männistö, M. Virtanen, V. Kataja, M. Uusitupa, and P. Pietinen, "Lifetime alcohol consumption and breast cancer: a case-control study in Finland," *Public Health Nutrition*, vol. 3, no. 1, pp. 11-18, 2007, doi: 10.1017/S1368980000000033.
- [125] Y. Zhang, B. E. Kreger, J. F. Dorgan, G. L. Splansky, L. A. Cupples, and R. C. Ellison, "Alcohol Consumption and Risk of Breast Cancer: The Framingham Study Revisited," *American Journal of Epidemiology*, vol. 149, no. 2, pp. 93-101, 1999, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009791.
- [126] C. M. Vachon, R. A. Cerhan Jr Fau - Vierkant, T. A. Vierkant Ra Fau - Sellers, and T. A. Sellers, "Investigation of an interaction of alcohol intake and family history on breast cancer risk in the Minnesota Breast Cancer Family Study," (in eng), no. 0008-543X (Print).
- [127] G. Ursin *et al.*, "Does menopausal hormone replacement therapy interact with known factors to increase risk of breast cancer?," (in eng), no. 0732-183X (Print).
- [128] M. A. Royo-Bordonada *et al.*, "Alcohol intake and risk of breast cancer: the euramic study," (in eng), *Neoplasma*, vol. 44, no. 3, pp. 150-6, 1997.
- [129] S. Barve, S.-Y. Chen, I. Kirpich, W. H. Watson, and C. McClain, "Development, Prevention, and Treatment of Alcohol-Induced Organ Injury: The Role of Nutrition," (in eng), *Alcohol Res*, vol. 38, no. 2, pp. 289-302, 2017. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28988580>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513692/>.
- [130] C. Catsburg, A. B. Miller, and T. E. Rohan, "Active cigarette smoking and risk of breast cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 9, pp. 2204-2209, 2015/05/01 2015, doi: 10.1002/ijc.29266.
- [131] M. M. Gaudet *et al.*, "Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies," (in eng), *International journal of epidemiology*, vol. 46, no. 3, pp. 881-893, 2017, doi: 10.1093/ije/dyw288.
- [132] J. A. Knight *et al.*, "Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study," (in eng), *International journal of cancer*, vol. 141, no. 5, pp. 916-924, 2017, doi: 10.1002/ijc.30791.

- [133] N. L. Petrakis, L. D. Gruenke, T. C. Beelen, N. Castagnoli, Jr., and J. C. Craig, "Nicotine in breast fluid of nonlactating women," (in eng), *Science*, vol. 199, no. 4326, pp. 303-5, Jan 20 1978, doi: 10.1126/science.619458.
- [134] N. L. Petrakis, C. A. Maack, R. E. Lee, and M. Lyon, "Mutagenic activity in nipple aspirates of human breast fluid," (in eng), *Cancer Res*, vol. 40, no. 1, pp. 188-9, Jan 1980.
- [135] S. Tretli, "Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway," *International Journal of Cancer*, vol. 44, no. 1, pp. 23-30, 1989/07/15 1989, doi: 10.1002/ijc.2910440105.
- [136] M. Inoue *et al.*, "Impact of metabolic factors on subsequent cancer risk: results from a large-scale population-based cohort study in Japan," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 18, no. 3, 2009. [Online]. Available: https://journals.lww.com/eurjcancerprev/Fulltext/2009/06000/Impact_of_metabolic_factors_on_subsequent_cancer.13.aspx.
- [137] W. T. Garvey and C. Lara-Castro, "16 - Metabolic Syndrome," in *Handbook of Clinical Nutrition (Fourth Edition)*, D. C. Heimbarger and J. D. Ard Eds.: Mosby, 2006, pp. 357-370.
- [138] Y. Arita *et al.*, "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 257, no. 1, pp. 79-83, 1999/04/02/ 1999, doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>.
- [139] M. Minatoya *et al.*, "Equol, adiponectin, insulin levels and risk of breast cancer," (in eng), *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, vol. 14, no. 4, pp. 2191-9, 2013, doi: 10.7314/apjcp.2013.14.4.2191.
- [140] D. Ish-Shalom *et al.*, "Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor," (in eng), *Diabetologia*, vol. 40 Suppl 2, pp. S25-31, Jul 1997, doi: 10.1007/s001250051393.
- [141] J. Chappell, J. W. Leitner, S. Solomon, I. Golovchenko, M. L. Goalstone, and B. Draznin, "Effect of insulin on cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. Direct and potentiating influence," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 41, pp. 38023-8, Oct 12 2001, doi: 10.1074/jbc.M104416200.
- [142] S. M. Shafie and R. Hilf, "Insulin receptor levels and magnitude of insulin-induced responses in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats," (in eng), *Cancer Res*, vol. 41, no. 3, pp. 826-9, Mar 1981.
- [143] S. M. Shafie and F. H. Grantham, "Role of hormones in the growth and regression of human breast cancer cells (MCF-7) transplanted into athymic nude mice," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 67, no. 1, pp. 51-6, Jul 1981.
- [144] M. J. Gunter *et al.*, "Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 101, no. 1, pp. 48-60, Jan 7 2009, doi: 10.1093/jnci/djn415.
- [145] Y. Arita *et al.*, "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 257, no. 1, pp. 79-83, Apr 2 1999, doi: 10.1006/bbrc.1999.0255.
- [146] Y. Miyoshi *et al.*, "Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk," (in eng), *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 9, no. 15, pp. 5699-704, Nov 15 2003.
- [147] M. E. Grossmann, K. J. Nkhata, N. K. Mizuno, A. Ray, and M. P. Cleary, "Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 98, no. 2, pp. 370-379, 2008/01// 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604166.
- [148] M. Fasshauer and M. Bluher, "Adipokines in health and disease," (in eng), *Trends in pharmacological sciences*, vol. 36, no. 7, pp. 461-70, Jul 2015, doi: 10.1016/j.tips.2015.04.014.
- [149] I. Thune, T. Brenn, E. Lund, and M. Gaard, "Physical Activity and the Risk of Breast Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 336, no. 18, pp. 1269-1275, 1997/05/01 1997, doi: 10.1056/NEJM199705013361801.

- [150] M. D. Holmes, W. Y. Chen, D. Feskanich, C. H. Kroenke, and G. A. Colditz, "Physical Activity and Survival After Breast Cancer Diagnosis," *JAMA*, vol. 293, no. 20, pp. 2479-2486, 2005, doi: 10.1001/jama.293.20.2479.
- [151] B. M. Lynch, H. K. Neilson, and C. M. Friedenreich, "Physical activity and breast cancer prevention," (in eng), *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, vol. 186, pp. 13-42, 2011, doi: 10.1007/978-3-642-04231-7_2.
- [152] V. Sikind, F. Schofield, D. Rice, and C. Bain, "BREAST CANCER AND BREASTFEEDING: RESULTS FROM AN AUSTRALIAN CASE-CONTROL STUDY," *American Journal of Epidemiology*, vol. 130, no. 2, pp. 229-236, 1989, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115329.
- [153] L. A. Brinton *et al.*, "Breastfeeding and breast cancer risk," *Cancer Causes & Control*, vol. 6, no. 3, pp. 199-208, 1995/05/01 1995, doi: 10.1007/BF00051791.
- [154] J. Chang-Claude, N. Eby, M. Kiechle, G. Bastert, and H. Becher, "Breastfeeding and breast cancer risk by age 50 among women in Germany," *Cancer Causes & Control*, vol. 11, no. 8, pp. 687-695, 2000/09/01 2000, doi: 10.1023/A:1008907901087.
- [155] L. Tryggvadóttir, H. Tulinius, J. E. Eyfjord, and T. Sigurvinnson, "Breastfeeding and Reduced Risk of Breast Cancer in an Icelandic Cohort Study," *American Journal of Epidemiology*, vol. 154, no. 1, pp. 37-42, 2001, doi: 10.1093/aje/154.1.37.
- [156] J. Russo, D. Mailo, Y. F. Hu, G. Balogh, F. Sheriff, and I. H. Russo, "Breast differentiation and its implication in cancer prevention," (in eng), *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 11, no. 2 Pt 2, pp. 931s-6s, Jan 15 2005.
- [157] K. M. Rodgers, J. O. Udesky, R. A. Rudel, and J. G. Brody, "Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms," *Environmental Research*, vol. 160, pp. 152-182, 2018/01/01/ 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.045>.
- [158] B. A. Cohn *et al.*, "DDT Exposure in Utero and Breast Cancer," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 100, no. 8, pp. 2865-2872, 2015, doi: 10.1210/jc.2015-1841.
- [159] E. C. Bonefeld-Jørgensen, M. Long, S. O. Fredslund, R. Bossi, and J. Olsen, "Breast cancer risk after exposure to perfluorinated compounds in Danish women: a case-control study nested in the Danish National Birth Cohort," *Cancer Causes & Control*, vol. 25, no. 11, pp. 1439-1448, 2014/11/01 2014, doi: 10.1007/s10552-014-0446-7.
- [160] M. Koual *et al.*, "Associations between persistent organic pollutants and risk of breast cancer metastasis," *Environment International*, vol. 132, p. 105028, 2019/11/01/ 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105028>.
- [161] K. McPherson, C. M. Steel, and J. M. Dixon, "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics," (in eng), *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 321, no. 7261, pp. 624-628, 2000, doi: 10.1136/bmj.321.7261.624.
- [162] B. Gerber, H. Müller, T. Reimer, A. Krause, and K. Friese, "Nutrition and Lifestyle Factors on the Risk of Developing Breast Cancer," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 79, no. 2, pp. 265-276, 2003/05/01 2003, doi: 10.1023/A:1023959818513.
- [163] D. Lütjohann *et al.*, "First international descriptive and interventional survey for cholesterol and non-cholesterol sterol determination by gas- and liquid-chromatography-Urgent need for harmonisation of analytical methods," (in eng), *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 190, pp. 115-125, 2019, doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.03.025.
- [164] M. Touvier *et al.*, "Cholesterol and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies," *British Journal of Nutrition*, vol. 114, no. 3, pp. 347-357, 2015, doi: 10.1017/S000711451500183X.
- [165] C. M. Kitahara *et al.*, "Total cholesterol and cancer risk in a large prospective study in Korea," (in eng), *J Clin Oncol*, vol. 29, no. 12, pp. 1592-1598, 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.31.5200.
- [166] P. Knekt, A. Reunanen, A. Aromaa, M. Heliövaara, T. Hakulinen, and M. Hakama, "Serum cholesterol and risk of cancer in a cohort of 39,000 men and women," *Journal of Clinical*

- Epidemiology*, vol. 41, no. 6, pp. 519-530, 1988/01/01/ 1988, doi: [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(88\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0895-4356(88)90056-X).
- [167] Y. Osaki, S.-i. Taniguchi, A. Tahara, M. Okamoto, and T. Kishimoto, "Metabolic syndrome and incidence of liver and breast cancers in Japan," *Cancer Epidemiology*, vol. 36, no. 2, pp. 141-147, 2012/04/01/ 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.03.007>.
 - [168] S. Strohmaier *et al.*, "Total serum cholesterol and cancer incidence in the Metabolic syndrome and Cancer Project (Me-Can)," (in eng), *PloS one*, vol. 8, no. 1, pp. e54242-e54242, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054242.
 - [169] C. Agnoli *et al.*, "Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer in the ORDET cohort: a nested case-control study," (in eng), *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, vol. 20, no. 1, pp. 41-48, 2010, doi: 10.1016/j.numecd.2009.02.006.
 - [170] H. Tulinius, N. Sigfússon, H. Sigvaldason, K. Bjarnadóttir, and L. Tryggvadóttir, "Risk factors for malignant diseases: a cohort study on a population of 22,946 Icelanders," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 6, no. 11, p. 863, 1997. [Online]. Available: <http://cebp.aacrjournals.org/content/6/11/863.abstract>.
 - [171] A. A. Llanos, C. A. Makambi Kh Fau - Tucker, S. F. Tucker Ca Fau - Wallington, P. G. Wallington Sf Fau - Shields, L. L. Shields Pg Fau - Adams-Campbell, and L. L. Adams-Campbell, "Cholesterol, lipoproteins, and breast cancer risk in African American women," (in eng), no. 1049-510X (Print).
 - [172] M. His *et al.*, "Prospective associations between serum biomarkers of lipid metabolism and overall, breast and prostate cancer risk," *European Journal of Epidemiology*, vol. 29, no. 2, pp. 119-132, 2014/02/01 2014, doi: 10.1007/s10654-014-9884-5.
 - [173] Y. Kim *et al.*, "Serum high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer risk by menopausal status, body mass index, and hormonal receptor in Korea," (in eng), no. 1055-9965 (Print).
 - [174] A. S. Furberg, M. B. Veierod, T. Wilsgaard, L. Bernstein, and I. Thune, "Serum high-density lipoprotein cholesterol, metabolic profile, and breast cancer risk," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 96, no. 15, pp. 1152-60, Aug 4 2004, doi: 10.1093/jnci/djh216.
 - [175] T. Løfterød *et al.*, "Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 654-654, 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4568-2.
 - [176] H. Ni, H. Liu, and R. Gao, "Serum Lipids and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies," (in eng), no. 1932-6203 (Electronic).
 - [177] S. Borgquist *et al.*, "Apolipoproteins, lipids and risk of cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 138, no. 11, pp. 2648-2656, 2016/06/01 2016, doi: 10.1002/ijc.30013.
 - [178] D.-L. Lu, C. Le Cornet, D. Sookthai, T. S. Johnson, R. Kaaks, and R. T. Fortner, "Circulating 27-Hydroxycholesterol and Breast Cancer Risk: Results From the EPIC-Heidelberg Cohort," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 111, no. 4, pp. 365-371, 2018, doi: 10.1093/jnci/djy115.
 - [179] L. J. Martin *et al.*, "Serum lipids, lipoproteins, and risk of breast cancer: a nested case-control study using multiple time points," (in eng), *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, no. 5, p. djv032, 2015, doi: 10.1093/jnci/djv032.
 - [180] V. A. Katzke, D. Sookthai, T. Johnson, T. Kühn, and R. Kaaks, "Blood lipids and lipoproteins in relation to incidence and mortality risks for CVD and cancer in the prospective EPIC-Heidelberg cohort," (in eng), *BMC Med*, vol. 15, no. 1, pp. 218-218, 2017, doi: 10.1186/s12916-017-0976-4.
 - [181] J. Hu *et al.*, "Dietary cholesterol intake and cancer," *Annals of Oncology*, vol. 23, no. 2, pp. 491-500, 2011, doi: 10.1093/annonc/mdr155.
 - [182] C. Rodrigues Dos Santos, I. Fonseca, S. Dias, and J. C. Mendes de Almeida, "Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 14, pp. 132-132, 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-132.

- [183] M. Ha, J. Sung, and Y.-M. Song, "Serum total cholesterol and the risk of breast cancer in postmenopausal Korean women," *Cancer Causes & Control*, vol. 20, no. 7, pp. 1055-1060, 2009/09/01 2009, doi: 10.1007/s10552-009-9301-7.
- [184] M. Gaard, S. Tretli, and P. Urdal, "Risk of Breast Cancer in Relation to Blood Lipids: A Prospective Study of 31,209 Norwegian Women," *Cancer Causes & Control*, vol. 5, no. 6, pp. 501-509, 1994. [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/3552714>.
- [185] R. A. Hiatt and B. H. Fireman, "Serum cholesterol and the incidence of cancer in a large cohort," *Journal of Chronic Diseases*, vol. 39, no. 11, pp. 861-870, 1986/01/01/ 1986, doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(86\)90034-2](https://doi.org/10.1016/0021-9681(86)90034-2).
- [186] K. Steenland, S. Nowlin, and S. Palu, "Cancer incidence in the National Health and Nutrition Survey I follow-up data: Diabetes, cholesterol, pulse, and physical activity," *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 4, pp. 807-11, 01/01 1996.
- [187] P. G. Moorman *et al.*, "Association between high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer varies by menopausal status," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 7, no. 6, p. 483, 1998. [Online]. Available: <http://cebp.aacrjournals.org/content/7/6/483.abstract>.
- [188] M. His *et al.*, "Associations between serum lipids and breast cancer incidence and survival in the E3N prospective cohort study," *Cancer Causes & Control*, vol. 28, no. 1, pp. 77-88, 2017/01/01 2017, doi: 10.1007/s10552-016-0832-4.
- [189] J. C. Melvin *et al.*, "Lipid Profiles and Risk of Breast and Ovarian Cancer in the Swedish AMORIS Study," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 21, no. 8, p. 1381, 2012, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0188.
- [190] A. M. Kucharska-Newton, W. D. Rosamond, P. J. Mink, A. J. Alberg, E. Shahar, and A. R. Folsom, "HDL-cholesterol and incidence of breast cancer in the ARIC cohort study," (in eng), *Ann Epidemiol*, vol. 18, no. 9, pp. 671-677, 2008, doi: 10.1016/j.annepidem.2008.06.006.
- [191] A. H. Eliassen, G. A. Colditz, B. Rosner, W. C. Willett, and S. E. Hankinson, "Serum lipids, lipid-lowering drugs, and the risk of breast cancer," (in eng), *Archives of internal medicine*, vol. 165, no. 19, pp. 2264-71, Oct 24 2005, doi: 10.1001/archinte.165.19.2264.
- [192] L. Fahraeus, "The effects of estradiol on blood lipids and lipoproteins in postmenopausal women," (in eng), *Obstetrics and gynecology*, vol. 72, no. 5 Suppl, pp. 18s-22s, Nov 1988.
- [193] S. L. Mumford, S. Dasharathy, A. Z. Pollack, and E. F. Schisterman, "Variations in lipid levels according to menstrual cycle phase: clinical implications," (in eng), *Clin Lipidol*, vol. 6, no. 2, pp. 225-234, 2011, doi: 10.2217/clp.11.9.
- [194] G. L. Blackburn and K. A. Wang, "Dietary fat reduction and breast cancer outcome: results from the Women's Intervention Nutrition Study (WINS)," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 86, no. 3, pp. 878S-881S, 2007, doi: 10.1093/ajcn/86.3.878S.
- [195] C. Rodrigues Dos Santos *et al.*, "LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion," (in eng), *Lipids Health Dis*, vol. 13, pp. 16-16, 2014, doi: 10.1186/1476-511X-13-16.
- [196] M. P. Cleary, J. P. Grande, and N. J. Maihle, "Effect of high fat diet on body weight and mammary tumor latency in MMTV-TGF- α mice," *International Journal Of Obesity*, Paper vol. 28, p. 956, 07/15/online 2004, doi: 10.1038/sj.ijo.0802664.
- [197] S. Dogan, X. Hu, Y. Zhang, N. J. Maihle, J. P. Grande, and M. P. Cleary, "Effects of high-fat diet and/or body weight on mammary tumor leptin and apoptosis signaling pathways in MMTV-TGF- α mice," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 9, no. 6, pp. R91-R91, 2007, doi: 10.1186/bcr1840.
- [198] K. Pelton *et al.*, "Hypercholesterolemia induces angiogenesis and accelerates growth of breast tumors in vivo," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 184, no. 7, pp. 2099-2110, 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.03.006.

- [199] N. Alikhani *et al.*, "Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model," (in eng), *Oncogene*, vol. 32, no. 8, pp. 961-967, 2013, doi: 10.1038/onc.2012.113.
- [200] E. J. Gallagher *et al.*, "Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia," (in eng), *Oncogene*, vol. 36, no. 46, pp. 6462-6471, 2017, doi: 10.1038/onc.2017.247.
- [201] E. R. Nelson *et al.*, "27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology," (in eng), *Science*, vol. 342, no. 6162, pp. 1094-8, Nov 29 2013, doi: 10.1126/science.1241908.
- [202] M. R. Paillasse, P. de Medina, G. Amouroux, L. Mhamdi, M. Poirot, and S. Silvente-Poirot, "Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 50, no. 11, pp. 2203-2211, 2009, doi: 10.1194/jlr.M800668-JLR200.
- [203] D. de Gonzalo-Calvo *et al.*, "Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 15, pp. 460-460, 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1469-5.
- [204] C. J. Antalis, T. Arnold, T. Rasool, B. Lee, K. K. Buhman, and R. A. Siddiqui, "High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 122, no. 3, pp. 661-670, 2010/08/01 2010, doi: 10.1007/s10549-009-0594-8.
- [205] C. J. Antalis, A. Uchida, K. K. Buhman, and R. A. Siddiqui, "Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification," *Clinical & Experimental Metastasis*, vol. 28, no. 8, pp. 733-741, 2011/12/01 2011, doi: 10.1007/s10585-011-9405-9.
- [206] C. Y. Lin *et al.*, "Cholestane-3beta, 5alpha, 6beta-triol suppresses proliferation, migration, and invasion of human prostate cancer cells," (in eng), *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e65734, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065734.
- [207] Z. Shen *et al.*, "27-Hydroxycholesterol induces invasion and migration of breast cancer cells by increasing MMP9 and generating EMT through activation of STAT-3," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 51, pp. 1-8, 2017/04/01/ 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.001>.
- [208] C. G. Torres, Ramírez, M.E., Cruz, P., Epuñan, M.J., Valladares, L.E., & Sierralta, W.D, "27-Hydroxycholesterol induces the transition of MCF7 cells into a mesenchymal phenotype," *Oncology Reports*, vol. 26, no. 2, pp. 389-397, 2011, doi: <https://doi.org/10.3892/or.2011.1284>.
- [209] L.-M. Ma, Z.-R. Liang, K.-R. Zhou, H. Zhou, and L.-H. Qu, "27-Hydroxycholesterol increases Myc protein stability via suppressing PP2A, SCP1 and FBW7 transcription in MCF-7 breast cancer cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 480, no. 3, pp. 328-333, 2016/11/18/ 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.038>.
- [210] S. Raza *et al.*, "The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol regulates p53 activity and increases cell proliferation via MDM2 in breast cancer cells," (in eng), *Mol Cell Biochem*, vol. 410, no. 1-2, pp. 187-195, 2015, doi: 10.1007/s11010-015-2551-7.
- [211] W. A. Freed-Pastor *et al.*, "Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway," (in eng), *Cell*, vol. 148, no. 1-2, pp. 244-258, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2011.12.017.
- [212] F. Alpy and C. L. Tomasetto, "STARD3: A Lipid Transfer Protein in Breast Cancer and Cholesterol Trafficking," in *Cholesterol Transporters of the START Domain Protein Family in Health and Disease: START Proteins - Structure and Function*, B. J. Clark and D. M. Stocco Eds. New York, NY: Springer New York, 2014, pp. 119-138.
- [213] B. Vassilev *et al.*, "Elevated Levels of StAR-Related Lipid Transfer Protein 3 Alter Cholesterol Balance and Adhesiveness of Breast Cancer Cells: Potential Mechanisms Contributing to

- Progression of HER2-Positive Breast Cancers," *Am J Pathol*, vol. 185, no. 4, pp. 987-1000, 2015/04/01/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.018>.
- [214] "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," (in eng), *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1061-8, Oct 23 2008, doi: 10.1038/nature07385.
- [215] O. F. Kuzu, M. A. Noory, and G. P. Robertson, "The Role of Cholesterol in Cancer," (in eng), *Cancer research*, vol. 76, no. 8, pp. 2063-2070, 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2613.
- [216] B. Smith and H. Land, "Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene," (in eng), *Cell Rep*, vol. 2, no. 3, pp. 580-590, 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.011.
- [217] S. Silvente-Poirot and M. Poirot, "Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly," (in eng), *Curr Opin Pharmacol*, vol. 12, no. 6, pp. 673-6, Dec 2012, doi: 10.1016/j.coph.2012.10.004.
- [218] R. Radisauskas, I. Kuzmickiene, E. Milinaviciene, and R. Everatt, "Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence," (in eng), *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, vol. 52, no. 2, pp. 89-98, 2016, doi: 10.1016/j.medici.2016.03.002.
- [219] T. Murai, "Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment," (in eng), *Biological chemistry*, vol. 396, no. 1, pp. 1-11, Jan 2015, doi: 10.1515/hsz-2014-0194.
- [220] U. Ravnskov, P. J. Rosch, and K. S. McCully, "Statins do not protect against cancer: quite the opposite," (in eng), *J Clin Oncol*, vol. 33, no. 7, pp. 810-1, Mar 1 2015, doi: 10.1200/jco.2014.58.9564.
- [221] S. F. Nielsen, B. G. Nordestgaard, and S. E. Bojesen, "Statin use and reduced cancer-related mortality," (in eng), *The New England journal of medicine*, vol. 368, no. 6, pp. 576-7, Feb 7 2013, doi: 10.1056/NEJMc1214827.
- [222] P. Huang *et al.*, "Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling," (in eng), *Cell*, vol. 166, no. 5, pp. 1176-1187.e14, Aug 25 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.003.
- [223] G. Luchetti *et al.*, "Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling," (in eng), *eLife*, vol. 5, Oct 5 2016, doi: 10.7554/eLife.20304.
- [224] Y. Jia, Y. Wang, and J. Xie, "The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation," (in eng), *Arch Toxicol*, vol. 89, no. 2, pp. 179-191, 2015, doi: 10.1007/s00204-014-1433-1.
- [225] J. Vaquero, T. H. Nguyen Ho-Bouldoires, A. Claperon, and L. Fouassier, "Role of the PDZ-scaffold protein NHERF1/EBP50 in cancer biology: from signaling regulation to clinical relevance," (in eng), *Oncogene*, vol. 36, no. 22, pp. 3067-3079, Jun 1 2017, doi: 10.1038/onc.2016.462.
- [226] K. S. George and S. Wu, "Lipid raft: A floating island of death or survival," (in eng), *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 259, no. 3, pp. 311-9, Mar 15 2012, doi: 10.1016/j.taap.2012.01.007.
- [227] X. Ding, W. Zhang, S. Li, and H. Yang, "The role of cholesterol metabolism in cancer," (in eng), *Am J Cancer Res*, vol. 9, no. 2, pp. 219-227, 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30906624>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6405981/>.
- [228] X. Gao and J. Zhang, "Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains," (in eng), *Molecular biology of the cell*, vol. 19, no. 10, pp. 4366-73, Oct 2008, doi: 10.1091/mbc.E08-05-0449.
- [229] T. Murai, Y. Maruyama, K. Mio, H. Nishiyama, M. Suga, and C. Sato, "Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 3, pp. 1999-2007, Jan 21 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.184010.
- [230] J. H. Jeon, S. K. Kim, H. J. Kim, J. Chang, C. M. Ahn, and Y. S. Chang, "Lipid raft modulation inhibits NSCLC cell migration through delocalization of the focal adhesion complex," (in eng),

- Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 69, no. 2, pp. 165-71, Aug 2010, doi: 10.1016/j.lungcan.2009.10.014.
- [231] H. Yamaguchi, Y. Takeo, S. Yoshida, Z. Kouchi, Y. Nakamura, and K. Fukami, "Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells," (in eng), *Cancer Res*, vol. 69, no. 22, pp. 8594-602, Nov 15 2009, doi: 10.1158/0008-5472.can-09-2305.
 - [232] H. Raghu, P. K. Sodadasu, R. R. Malla, C. S. Gondi, N. Estes, and J. S. Rao, "Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 10, p. 647, Nov 24 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-647.
 - [233] B. Yeganeh *et al.*, "Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease," (in eng), *Pharmacology & therapeutics*, vol. 143, no. 1, pp. 87-110, Jul 2014, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.02.007.
 - [234] P. J. Casey and M. C. Seabra, "Protein prenyltransferases," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 10, pp. 5289-92, Mar 8 1996, doi: 10.1074/jbc.271.10.5289.
 - [235] L. L. Vedin, S. A. Lewandowski, P. Parini, J. A. Gustafsson, and K. R. Steffensen, "The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells," (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 4, pp. 575-9, Apr 2009, doi: 10.1093/carcin/bgp029.
 - [236] M. F. Tavazoie *et al.*, "LXR/ApoE Activation Restricts Innate Immune Suppression in Cancer," (in eng), *Cell*, vol. 172, no. 4, pp. 825-840.e18, Feb 8 2018, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.026.
 - [237] M. Voisin *et al.*, "Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 44, pp. E9346-e9355, Oct 31 2017, doi: 10.1073/pnas.1707965114.
 - [238] M. Poirrot, R. Soules, A. Mallinger, F. Dalenc, and S. Silvente-Poirrot, "Chemistry, biochemistry, metabolic fate and mechanism of action of 6-oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol (OCDO), a tumor promoter and cholesterol metabolite," *Biochimie*, vol. 153, pp. 139-149, 2018/10/01/ 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.008>.
 - [239] S. Silvente-Poirrot, F. Dalenc, and M. Poirrot, "The Effects of Cholesterol-Derived Oncometabolites on Nuclear Receptor Function in Cancer," *Cancer Research*, 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1487.
 - [240] J. W. Clendening *et al.*, "Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 34, pp. 15051-6, Aug 24 2010, doi: 10.1073/pnas.0910258107.
 - [241] G. Sorrentino *et al.*, "Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway," (in eng), *Nature cell biology*, vol. 16, no. 4, pp. 357-66, Apr 2014, doi: 10.1038/ncb2936.
 - [242] A. A. Al-Haidari, I. Syk, and H. Thorlacius, "HMG-CoA reductase regulates CCL17-induced colon cancer cell migration via geranylgeranylation and RhoA activation," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 446, no. 1, pp. 68-72, Mar 28 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.078.
 - [243] D. N. Brown *et al.*, "Squalene epoxidase is a bona fide oncogene by amplification with clinical relevance in breast cancer," (in eng), *Sci Rep*, vol. 6, p. 19435, Jan 18 2016, doi: 10.1038/srep19435.
 - [244] F. Dong, Z. Mo, W. Eid, K. C. Courtney, and X. Zha, "Akt inhibition promotes ABCA1-mediated cholesterol efflux to ApoA-I through suppressing mTORC1," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e113789, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0113789.
 - [245] T. Porstmann *et al.*, "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth," (in eng), *Cell metabolism*, vol. 8, no. 3, pp. 224-36, Sep 2008, doi: 10.1016/j.cmet.2008.07.007.
 - [246] J. He, H. Shin, X. Wei, A. K. Kadegowda, R. Chen, and S. K. Xie, "NPC1L1 knockout protects against colitis-associated tumorigenesis in mice," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 15, p. 189, Mar 27 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1230-0.

- [247] B. Shirouchi *et al.*, "Inhibition of Niemann-Pick C1-Like 1 by Ezetimibe Reduces Dietary 5 β ,6 β -Epoxycholesterol Absorption in Rats," *Cardiovascular Drugs and Therapy*, vol. 33, no. 1, pp. 35-44, 2019/02/01 2019, doi: 10.1007/s10557-019-06854-4.
- [248] B. H. Lee *et al.*, "Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1," (in eng), *Cancer Res*, vol. 73, no. 3, pp. 1211-8, Feb 1 2013, doi: 10.1158/0008-5472.can-12-3128.
- [249] B. Smith and H. Land, "Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene," (in eng), *Cell Rep*, vol. 2, no. 3, pp. 580-90, Sep 27 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.011.
- [250] A. Colell, C. García-Ruiz, J. M. Lluís, O. Coll, M. Mari, and J. C. Fernández-Checa, "Cholesterol Impairs the Adenine Nucleotide Translocator-mediated Mitochondrial Permeability Transition through Altered Membrane Fluidity," *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.M210943200 vol. 278, no. 36, pp. 33928-33935, 2003. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/278/36/33928.abstract>.
- [251] J. Montero *et al.*, "Mitochondrial Cholesterol Contributes to Chemotherapy Resistance in Hepatocellular Carcinoma," *Cancer Research*, vol. 68, no. 13, p. 5246, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6161.
- [252] V. Rottiers and A. M. Naar, "MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders," (in eng), *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 13, no. 4, pp. 239-50, Mar 22 2012, doi: 10.1038/nrm3313.
- [253] S. B. Patel, G. A. Graf, and R. E. Temel, "ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 59, no. 7, pp. 1103-1113, Jul 2018, doi: 10.1194/jlr.R084244.
- [254] P. de Medina *et al.*, "Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties," (in eng), *Nature communications*, vol. 4, p. 1840, 2013, doi: 10.1038/ncomms2835.
- [255] S. Silvente-Poirot, P. de Medina, M. Record, and M. Poirot, "From tamoxifen to dendrogenin A: The discovery of a mammalian tumor suppressor and cholesterol metabolite," *Biochimie*, vol. 130, pp. 109-114, 2016/11/01/ 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.016>.
- [256] G. Segala *et al.*, "Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers," (in eng), *Nature communications*, vol. 8, no. 1, p. 1903, Dec 4 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01948-9.
- [257] M. Poirot and S. Silvente-Poirot, "The tumor-suppressor cholesterol metabolite, dendrogenin A, is a new class of LXR modulator activating lethal autophagy in cancers," (in eng), *Biochemical pharmacology*, vol. 153, pp. 75-81, Jul 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.046.
- [258] E. Yamada, "The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse," (in eng), *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, vol. 1, no. 5, pp. 445-58, Sep 25 1955, doi: 10.1083/jcb.1.5.445.
- [259] R. Hnasko and M. Lisanti, "The Biology of Caveolae: Lessons from Caveolin Knockout Mice and Implications for Human Disease," *Molecular interventions*, vol. 3, pp. 445-64, 01/01 2004, doi: 10.1124/mi.3.8.445.
- [260] T. V. Kurzchalia *et al.*, "VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles," (in eng), *The Journal of cell biology*, vol. 118, no. 5, pp. 1003-14, Sep 1992, doi: 10.1083/jcb.118.5.1003.
- [261] P. Liu, M. Rudick, and R. G. Anderson, "Multiple functions of caveolin-1," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 44, pp. 41295-8, Nov 1 2002, doi: 10.1074/jbc.R200020200.
- [262] K. S. Song *et al.*, "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 25, pp. 15160-5, Jun 21 1996, doi: 10.1074/jbc.271.25.15160.
- [263] S. Li *et al.*, "Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation," *FEBS Letters*, vol. 434, no. 1-2, pp. 127-134, 1998/08/28 1998, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00945-4.

- [264] A. M. Fra, E. Williamson, K. Simons, and R. G. Parton, "De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no. 19, pp. 8655-8659, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.19.8655.
- [265] B. Razani *et al.*, "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities," (in eng), no. 0021-9258 (Print), 2001
- [266] J. E. Schnitzer, J. Liu, and P. Oh, "Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 24, pp. 14399-404, Jun 16 1995, doi: 10.1074/jbc.270.24.14399.
- [267] J. R. Henley, E. W. Krueger, B. J. Oswald, and M. A. McNiven, "Dynamin-mediated internalization of caveolae," (in eng), *The Journal of cell biology*, vol. 141, no. 1, pp. 85-99, Apr 6 1998, doi: 10.1083/jcb.141.1.85.
- [268] M. Murata, J. Peränen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia, and K. Simons, "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no. 22, pp. 10339-10343, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.22.10339.
- [269] S. Li, J. Couet, and M. P. Lisanti, "Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 271, no. 46, pp. 29182-29190, 1996, doi: 10.1074/jbc.271.46.29182.
- [270] C. Thiele, M. J. Hannah, F. Fahrenholz, and W. B. Huttner, "Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles," *Nature Cell Biology*, vol. 2, no. 1, pp. 42-49, 2000/01/01 2000, doi: 10.1038/71366.
- [271] T. M. Williams and M. P. Lisanti, "The caveolin proteins," (in eng), *Genome Biol*, vol. 5, no. 3, pp. 214-214, 2004, doi: 10.1186/gb-2004-5-3-214.
- [272] A. Bist, P. E. Fielding, and C. J. Fielding, "Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 20, pp. 10693-8, Sep 30 1997, doi: 10.1073/pnas.94.20.10693.
- [273] A. Pol, R. Luetterforst, M. Lindsay, S. Heino, E. Ikonen, and R. G. Parton, "A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance," (in eng), *The Journal of cell biology*, vol. 152, no. 5, pp. 1057-1070, 2001, doi: 10.1083/jcb.152.5.1057.
- [274] Y. C. Lin, C. Ma, W. C. Hsu, H. F. Lo, and V. C. Yang, "Molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells," (in eng), *Cardiovascular research*, vol. 75, no. 3, pp. 575-83, Aug 1 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.04.012.
- [275] P. E. Fielding and C. J. Fielding, "Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol," (in eng), *Biochemistry*, vol. 34, no. 44, pp. 14288-92, Nov 7 1995, doi: 10.1021/bi00044a004.
- [276] C. J. Fielding and P. E. Fielding, "Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol," (in eng), *Advanced drug delivery reviews*, vol. 49, no. 3, pp. 251-64, Jul 28 2001.
- [277] S. Matveev, D. R. van der Westhuyzen, and E. J. Smart, "Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 40, no. 9, pp. 1647-54, Sep 1999.
- [278] G. A. Graf, P. M. Connell, D. R. van der Westhuyzen, and E. J. Smart, "The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 17, pp. 12043-8, Apr 23 1999, doi: 10.1074/jbc.274.17.12043.

- [279] C. Fu, J. He, C. Li, J. Y. Shyy, and Y. Zhu, "Cholesterol increases adhesion of monocytes to endothelium by moving adhesion molecules out of caveolae," (in eng), *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1801, no. 7, pp. 702-10, Jul 2010, doi: 10.1016/j.bbaliip.2010.04.001.
- [280] W. T. Chao, S. H. Tsai, Y. C. Lin, W. W. Lin, and V. C. Yang, "Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 332, no. 3, pp. 743-9, Jul 8 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.019.
- [281] P. G. Frank, H. Lee, D. S. Park, N. N. Tandon, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis," (in eng), *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 24, no. 1, pp. 98-105, Jan 2004, doi: 10.1161/01.atv.0000101182.89118.e5.
- [282] S. Y. Ding, M. J. Lee, R. Summer, L. Liu, S. K. Fried, and P. F. Pilch, "Pleiotropic effects of cavin-1 deficiency on lipid metabolism," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 289, no. 12, pp. 8473-83, Mar 21 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.546242.
- [283] V. P. Sanon, D. Sawaki, C. H. Mjaatvedt, and C. Jourdan-Le Saux, "Myocardial tissue caveolae," (in eng), *Comprehensive Physiology*, vol. 5, no. 2, pp. 871-86, Apr 2015, doi: 10.1002/cphy.c140050.
- [284] J. R. Glenney, Jr., "Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus," (in eng), no. 0021-9258 (Print).
- [285] A. J. Koleske, D. Baltimore, and M. P. Lisanti, "Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no. 5, pp. 1381-1385, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.5.1381.
- [286] B. Razani, Y. Altschuler, L. Zhu, R. G. Pestell, K. E. Mostov, and M. P. Lisanti, "Caveolin-1 Expression Is Down-Regulated in Cells Transformed by the Human Papilloma Virus in a p53-Dependent Manner. Replacement of Caveolin-1 Expression Suppresses HPV-Mediated Cell Transformation," *Biochemistry*, vol. 39, no. 45, pp. 13916-13924, 2000/11/01 2000, doi: 10.1021/bi001489b.
- [287] D. S. Park *et al.*, "Evidence That Myc Isoforms Transcriptionally Repress Caveolin-1 Gene Expression via an INR-Dependent Mechanism," *Biochemistry*, vol. 40, no. 11, pp. 3354-3362, 2001/03/01 2001, doi: 10.1021/bi002787b.
- [288] Y. Lavie and M. Liscovitch, "Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences," *Glycoconjugate Journal*, vol. 17, no. 3, pp. 253-259, 2000/03/01 2000, doi: 10.1023/A:1026553626537.
- [289] J. Hult *et al.*, "The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1," (in eng), no. 0021-9258 (Print).
- [290] M. Drab *et al.*, "Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice," *Science*, vol. 293, no. 5539, p. 2449, 2001, doi: 10.1126/science.1062688.
- [291] F. Capozza *et al.*, "Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 162, no. 6, pp. 2029-2039, 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64335-0.
- [292] S. E. Elsheikh *et al.*, "Caveolin 1 and Caveolin 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 99, no. 2, pp. 327-334, 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604463.
- [293] E. K. Sloan, R. L. Stanley Kl Fau - Anderson, and R. L. Anderson, "Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis," (in eng), no. 0950-9232 (Print).
- [294] E. K. Sloan *et al.*, "Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 174, no. 6, pp. 2035-2043, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080924.
- [295] G. Fiucci, R. Ravid D Fau - Reich, M. Reich R Fau - Liscovitch, and M. Liscovitch, "Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells," (in eng), no. 0950-9232 (Print).
- [296] J. Roche, "The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 2, p. 52, 2018, doi: 10.3390/cancers10020052.

- [297] M. K. Jolly *et al.*, "Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis," (in eng), *Frontiers in oncology*, vol. 5, p. 155, 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00155.
- [298] R. Y. Huang, P. Guilford, and J. P. Thiery, "Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition," (in eng), *Journal of cell science*, vol. 125, no. Pt 19, pp. 4417-22, Oct 1 2012, doi: 10.1242/jcs.099697.
- [299] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition," (in eng), *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 15, no. 3, pp. 178-196, 2014, doi: 10.1038/nrm3758.
- [300] J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease," (in eng), *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 871-90, Nov 25 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [301] A. Kourtidis, S. P. Ngok, and P. Z. Anastasiadis, "p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression," (in eng), *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 116, pp. 409-32, 2013, doi: 10.1016/b978-0-12-394311-8.00018-2.
- [302] A. J. Ridley, "Life at the leading edge," (in eng), *Cell*, vol. 145, no. 7, pp. 1012-22, Jun 24 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010.
- [303] M. A. McNiven, "Breaking away: matrix remodeling from the leading edge," (in eng), *Trends in cell biology*, vol. 23, no. 1, pp. 16-21, Jan 2013, doi: 10.1016/j.tcb.2012.08.009.
- [304] J. Haynes, J. Srivastava, N. Madson, T. Wittmann, and D. L. Barber, "Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression," (in eng), *Molecular biology of the cell*, vol. 22, no. 24, pp. 4750-64, Dec 2011, doi: 10.1091/mbc.E11-02-0119.
- [305] M. Yilmaz and G. Christofori, "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion," (in eng), *Cancer metastasis reviews*, vol. 28, no. 1-2, pp. 15-33, Jun 2009, doi: 10.1007/s10555-008-9169-0.
- [306] A. Whale, F. N. Hashim, S. Fram, G. E. Jones, and C. M. Wells, "Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases," (in eng), *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, vol. 16, pp. 849-64, Jan 1 2011.
- [307] P. Z. Anastasiadis and A. B. Reynolds, "Regulation of Rho GTPases by p120-catenin," (in eng), *Current opinion in cell biology*, vol. 13, no. 5, pp. 604-10, Oct 2001.
- [308] D. St Johnston and J. Ahringer, "Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity," (in eng), *Cell*, vol. 141, no. 5, pp. 757-74, May 28 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.05.011.
- [309] C. Navarro *et al.*, "Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement," (in eng), *Oncogene*, vol. 24, no. 27, pp. 4330-9, Jun 23 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208632.
- [310] Y. Qin, C. Capaldo, B. M. Gumbiner, and I. G. Macara, "The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin," (in eng), *The Journal of cell biology*, vol. 171, no. 6, pp. 1061-71, Dec 19 2005, doi: 10.1083/jcb.200506094.
- [311] G. Moreno-Bueno, F. Portillo, and A. Cano, "Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer," (in eng), *Oncogene*, vol. 27, no. 55, pp. 6958-69, Nov 24 2008, doi: 10.1038/onc.2008.346.
- [312] W. J. Nelson, "Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity," (in eng), *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no. 1, p. a000513, Jul 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a000513.
- [313] M. J. Wheelock, Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, and K. R. Johnson, "Cadherin switching," (in eng), *Journal of cell science*, vol. 121, no. Pt 6, pp. 727-35, Mar 15 2008, doi: 10.1242/jcs.000455.

- [314] E. Theveneau and R. Mayor, "Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells," (in eng), *Current opinion in cell biology*, vol. 24, no. 5, pp. 677-84, Oct 2012, doi: 10.1016/j.ceb.2012.08.002.
- [315] S. M. Hansen, V. Berezin, and E. Bock, "Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin," (in eng), *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 65, no. 23, pp. 3809-21, Nov 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8290-0.
- [316] D. M. Toivola, G. Z. Tao, A. Habtezion, J. Liao, and M. B. Omary, "Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments," (in eng), *Trends in cell biology*, vol. 15, no. 11, pp. 608-17, Nov 2005, doi: 10.1016/j.tcb.2005.09.004.
- [317] M. G. Mendez, S. Kojima, and R. D. Goldman, "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition," (in eng), *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 24, no. 6, pp. 1838-51, Jun 2010, doi: 10.1096/fj.09-151639.
- [318] S. Maschler *et al.*, "Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization," (in eng), *Oncogene*, vol. 24, no. 12, pp. 2032-41, Mar 17 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208423.
- [319] N. Mise, R. Savai, H. Yu, J. Schwarz, N. Kaminski, and O. Eickelberg, "Zyxin is a transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin alpha5beta1," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 37, pp. 31393-405, Sep 7 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.357624.
- [320] D. Sheppard, "Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta," (in eng), *Cancer metastasis reviews*, vol. 24, no. 3, pp. 395-402, Sep 2005, doi: 10.1007/s10555-005-5131-6.
- [321] P. Nistico, M. J. Bissell, and D. C. Radisky, "Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases," (in eng), *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 4, no. 2, Feb 1 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011908.
- [322] D. C. Radisky *et al.*, "Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability," (in eng), *Nature*, vol. 436, no. 7047, pp. 123-7, Jul 7 2005, doi: 10.1038/nature03688.
- [323] M. Jorda *et al.*, "Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor," (in eng), *Journal of cell science*, vol. 118, no. Pt 15, pp. 3371-85, Aug 1 2005, doi: 10.1242/jcs.02465.
- [324] N. Dave *et al.*, "Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 14, pp. 12024-32, Apr 8 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.168625.
- [325] K. E. Hoot *et al.*, "Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 118, no. 8, pp. 2722-32, Aug 2008, doi: 10.1172/jci33713.
- [326] R. Derynck and Y. E. Zhang, "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling," (in eng), *Nature*, vol. 425, no. 6958, pp. 577-84, Oct 9 2003, doi: 10.1038/nature02006.
- [327] S. E. Moody *et al.*, "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence," (in eng), *Cancer cell*, vol. 8, no. 3, pp. 197-209, Sep 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.07.009.
- [328] C. Pena *et al.*, "SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue," (in eng), *Oncogene*, vol. 28, no. 49, pp. 4375-85, Dec 10 2009, doi: 10.1038/onc.2009.285.
- [329] K. Blehnschmidt, S. Sassen, B. Schmalfeldt, T. Schuster, H. Hofler, and K. F. Becker, "The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 98, no. 2, pp. 489-95, Jan 29 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604115.

- [330] D. Olmeda, M. Jorda, H. Peinado, A. Fabra, and A. Cano, "Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness," (in eng), *Oncogene*, vol. 26, no. 13, pp. 1862-74, Mar 22 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1209997.
- [331] U. Cavallaro and G. Christofori, "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer," (in eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 4, no. 2, pp. 118-32, Feb 2004, doi: 10.1038/nrc1276.
- [332] W. Birchmeier and J. Behrens, "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness," (in eng), *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1198, no. 1, pp. 11-26, May 27 1994, doi: 10.1016/0304-419x(94)90003-5.
- [333] S. Hirohashi, "Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 153, no. 2, pp. 333-9, Aug 1998, doi: 10.1016/s0002-9440(10)65575-7.
- [334] F. Kroepil *et al.*, "Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 13, pp. 145-145, 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-145.
- [335] B. Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, "Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells," (in eng), *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 11, no. 22, pp. 8006-14, Nov 15 2005, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-05-0632.
- [336] C.-Y. Liu, H.-H. Lin, M.-J. Tang, and Y.-K. Wang, "Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation," (in eng), *Oncotarget*, vol. 6, no. 18, pp. 15966-15983, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3862.
- [337] J. E. Eichner, S. T. Dunn, G. Perveen, D. M. Thompson, K. E. Stewart, and B. C. Stroehla, "Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review," *American Journal of Epidemiology*, vol. 155, no. 6, pp. 487-495, 2002, doi: 10.1093/aje/155.6.487.
- [338] H. Y. Mok, K. von Bergmann, and S. M. Grundy, "Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 20, no. 3, pp. 389-98, Mar 1979.
- [339] J. M. Dietschy, S. D. Turley, and D. K. Spady, "Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 34, no. 10, pp. 1637-59, Oct 1993.
- [340] J. M. Dietschy and S. D. Turley, "Cholesterol metabolism in the brain," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 12, no. 2, 2001. [Online]. Available: https://journals.lww.com/co-lipidology/Fulltext/2001/04000/Cholesterol_metabolism_in_the_brain.3.aspx.
- [341] C. M. Adams *et al.*, "Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 50, pp. 52772-80, Dec 10 2004, doi: 10.1074/jbc.M410302200.
- [342] Y. Gong, J. N. Lee, P. C. Lee, J. L. Goldstein, M. S. Brown, and J. Ye, "Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake," (in eng), *Cell metabolism*, vol. 3, no. 1, pp. 15-24, Jan 2006, doi: 10.1016/j.cmet.2005.11.014.
- [343] L. P. Sun, L. Li, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, "Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 28, pp. 26483-90, Jul 15 2005, doi: 10.1074/jbc.M504041200.
- [344] L. P. Sun, J. Seemann, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 16, pp. 6519-26, Apr 17 2007, doi: 10.1073/pnas.0700907104.

- [345] A. J. Brown, L. Sun, J. D. Feramisco, M. S. Brown, and J. L. Goldstein, "Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism," (in eng), *Molecular cell*, vol. 10, no. 2, pp. 237-45, Aug 2002.
- [346] L. Zeng *et al.*, "Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 47, pp. 48801-7, Nov 19 2004, doi: 10.1074/jbc.M407817200.
- [347] K. J. Rayner *et al.*, "MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis," (in eng), *Science*, vol. 328, no. 5985, pp. 1570-3, Jun 18 2010, doi: 10.1126/science.1189862.
- [348] P. A. Alphonse and P. J. Jones, "Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators," (in eng), *Lipids*, vol. 51, no. 5, pp. 519-36, May 2016, doi: 10.1007/s11745-015-4096-7.
- [349] S. Berger, G. Raman, R. Vishwanathan, P. F. Jacques, and E. J. Johnson, "Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis," (in eng), *Am J Clin Nutr*, vol. 102, no. 2, pp. 276-94, Aug 2015, doi: 10.3945/ajcn.114.100305.
- [350] M. S. Afonso, R. M. Machado, M. S. Lavrador, E. C. R. Quintao, K. J. Moore, and A. M. Lottenberg, "Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis," (in eng), *Nutrients*, vol. 10, no. 6, p. 760, 2018, doi: 10.3390/nu10060760.
- [351] B. L. Song, N. B. Javitt, and R. A. DeBose-Boyd, "Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol," (in eng), *Cell metabolism*, vol. 1, no. 3, pp. 179-89, Mar 2005, doi: 10.1016/j.cmet.2005.01.001.
- [352] L. J. Sharpe and A. J. Brown, "Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 288, no. 26, pp. 18707-15, Jun 28 2013, doi: 10.1074/jbc.R113.479808.
- [353] A. Radhakrishnan, Y. Ikeda, H. J. Kwon, M. S. Brown, and J. L. Goldstein, "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 16, pp. 6511-8, Apr 17 2007, doi: 10.1073/pnas.0700899104.
- [354] J. L. Goldstein, R. A. DeBose-Boyd, and M. S. Brown, "Protein sensors for membrane sterols," (in eng), *Cell*, vol. 124, no. 1, pp. 35-46, Jan 13 2006, doi: 10.1016/j.cell.2005.12.022.
- [355] L. Zhang *et al.*, "Inhibition of cholesterol biosynthesis through RNF145-dependent ubiquitination of SCAP," (in eng), *eLife*, vol. 6, Oct 25 2017, doi: 10.7554/eLife.28766.
- [356] I. Ikeda, "Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols," (in eng), *Journal of oleo science*, vol. 64, no. 1, pp. 9-18, 2015, doi: 10.5650/jos.ess14221.
- [357] S. W. Altmann *et al.*, "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption," (in eng), *Science*, vol. 303, no. 5661, pp. 1201-4, Feb 20 2004, doi: 10.1126/science.1093131.
- [358] T. M. Nguyen, J. K. Sawyer, K. L. Kelley, M. A. Davis, and L. L. Rudel, "Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 53, no. 1, pp. 95-104, Jan 2012, doi: 10.1194/jlr.M018820.
- [359] J. Iqbal and M. M. Hussain, "Intestinal lipid absorption," (in eng), *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 296, no. 6, pp. E1183-94, Jun 2009, doi: 10.1152/ajpendo.90899.2008.
- [360] L. Yu *et al.*, "Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 25, pp. 16237-42, Dec 10 2002, doi: 10.1073/pnas.252582399.
- [361] L. Yu, J. York, K. von Bergmann, D. Lutjohann, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs, "Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 18, pp. 15565-70, May 2 2003, doi: 10.1074/jbc.M301311200.

- [362] X. Hu *et al.*, "LXRbeta activation increases intestinal cholesterol absorption, leading to an atherogenic lipoprotein profile," (in eng), *Journal of internal medicine*, vol. 272, no. 5, pp. 452-64, Nov 2012, doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02529.x.
- [363] K. J. Moore, F. J. Sheedy, and E. A. Fisher, "Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance," (in eng), *Nat Rev Immunol*, vol. 13, no. 10, pp. 709-721, 2013, doi: 10.1038/nri3520.
- [364] G. Brufau, A. K. Groen, and F. Kuipers, "Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion," (in eng), *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, no. 8, pp. 1726-33, Aug 2011, doi: 10.1161/atvbaha.108.181206.
- [365] E. A. Huwait, N. N. Singh, D. R. Michael, T. S. Davies, J. W. Moss, and D. P. Ramji, "Protein Kinase C Is Involved in the Induction of ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression by Liver X Receptor/Retinoid X Receptor Agonist in Human Macrophages," (in eng), *Journal of cellular biochemistry*, vol. 116, no. 9, pp. 2032-8, Sep 2015, doi: 10.1002/jcb.25157.
- [366] C. J. Fielding and P. E. Fielding, "Molecular physiology of reverse cholesterol transport," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 36, no. 2, pp. 211-28, Feb 1995.
- [367] A. Jonas, K. E. Kezdy, and J. H. Wald, "Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 264, no. 9, pp. 4818-24, Mar 25 1989.
- [368] D. L. Sparks, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips, "The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 36, pp. 25839-47, Dec 25 1992.
- [369] L. R. Marques *et al.*, "Reverse Cholesterol Transport: Molecular Mechanisms and the Non-medical Approach to Enhance HDL Cholesterol," (in eng), *Front Physiol*, vol. 9, pp. 526-526, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00526.
- [370] E. A. Fisher, J. E. Feig, B. Hewing, S. L. Hazen, and J. D. Smith, "High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport," (in eng), *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 32, no. 12, pp. 2813-2820, 2012, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300133.
- [371] H. Qian, X. Zhao, P. Cao, J. Lei, N. Yan, and X. Gong, "Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1," (in eng), *Cell*, vol. 169, no. 7, pp. 1228-1239.e10, Jun 15 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.020.
- [372] O. Chambenoit, Y. Hamon, D. Marguet, H. Rigneault, M. Rosseneu, and G. Chimini, "Specific Docking of Apolipoprotein A-I at the Cell Surface Requires a Functional ABCA1 Transporter," *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.M010265200 vol. 276, no. 13, pp. 9955-9960, 2001. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/276/13/9955.abstract>.
- [373] S. E. Panagotopoulos, S. R. Witting, E. M. Horace, D. Y. Hui, J. N. Maiorano, and W. S. Davidson, "The Role of Apolipoprotein A-I Helix 10 in Apolipoprotein-mediated Cholesterol Efflux via the ATP-binding Cassette Transporter ABCA1," *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.M207005200 vol. 277, no. 42, pp. 39477-39484, 2002. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/277/42/39477.abstract>.
- [374] Y. Yamauchi, M. Hayashi, S. Abe-Dohmae, and S. Yokoyama, "Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 48, pp. 47890-7, Nov 28 2003, doi: 10.1074/jbc.M306258200.
- [375] N. Wang and R. Tall Alan, "Regulation and Mechanisms of ATP-Binding Cassette Transporter A1-Mediated Cellular Cholesterol Efflux," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, no. 7, pp. 1178-1184, 2003/07/01 2003, doi: 10.1161/01.ATV.0000075912.83860.26.
- [376] K. N. Liadaki *et al.*, "Binding of High Density Lipoprotein (HDL) and Discoidal Reconstituted HDL to the HDL Receptor Scavenger Receptor Class B Type I: EFFECT OF LIPID ASSOCIATION AND APOA-I MUTATIONS ON RECEPTOR BINDING," *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.M002310200 vol. 275, no. 28, pp. 21262-21271, 2000. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/275/28/21262.abstract>.

- [377] J. A. Glomset, "The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction," (in eng), *Journal of lipid research*, vol. 9, no. 2, pp. 155-67, Mar 1968.
- [378] C. Cavelier, I. Lorenzi, L. Rohrer, and A. von Eckardstein, "Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1," (in eng), *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1761, no. 7, pp. 655-66, Jul 2006, doi: 10.1016/j.bbali.2006.04.012.
- [379] D. J. Rader, "Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 116, no. 12, pp. 3090-100, Dec 2006, doi: 10.1172/jci30163.
- [380] J. F. Oram, R. M. Lawn, M. R. Garvin, and D. P. Wade, "ABCA1 Is the cAMP-inducible Apolipoprotein Receptor That Mediates Cholesterol Secretion from Macrophages," *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.M006738200 vol. 275, no. 44, pp. 34508-34511, 2000. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/275/44/34508.abstract>.
- [381] I. Tabas, S. Marathe, G. A. Keesler, N. Beatini, and Y. Shiratori, "Evidence That the Initial Up-regulation of Phosphatidylcholine Biosynthesis in Free Cholesterol-loaded Macrophages Is an Adaptive Response That Prevents Cholesterol-induced Cellular Necrosis: PROPOSED ROLE OF AN EVENTUAL FAILURE OF THIS RESPONSE IN FOAM CELL NECROSIS IN ADVANCED ATHEROSCLEROSIS," *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.271.37.22773 vol. 271, no. 37, pp. 22773-22781, 1996. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/271/37/22773.abstract>.
- [382] N. Wang *et al.*, "A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 111, no. 1, pp. 99-107, 2003, doi: 10.1172/JCI16808.
- [383] E. M. Rubin, R. M. Krauss, E. A. Spangler, J. G. Verstuyft, and S. M. Clift, "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI," (in eng), *Nature*, vol. 353, no. 6341, pp. 265-7, Sep 19 1991, doi: 10.1038/353265a0.
- [384] A. S. Plump, C. J. Scott, and J. L. Breslow, "Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 20, pp. 9607-9611, 1994, doi: 10.1073/pnas.91.20.9607.
- [385] N. Duverger *et al.*, "Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits," (in eng), *Circulation*, vol. 94, no. 4, pp. 713-7, Aug 15 1996, doi: 10.1161/01.cir.94.4.713.
- [386] R. K. Tangirala, K. Tsukamoto, S. H. Chun, D. Usher, E. Pure, and D. J. Rader, "Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice," (in eng), *Circulation*, vol. 100, no. 17, pp. 1816-22, Oct 26 1999, doi: 10.1161/01.cir.100.17.1816.
- [387] Y. Zhang, I. Zanotti, P. Reilly Muredach, M. Glick Jane, H. Rothblat George, and J. Rader Daniel, "Overexpression of Apolipoprotein A-I Promotes Reverse Transport of Cholesterol From Macrophages to Feces In Vivo," *Circulation*, vol. 108, no. 6, pp. 661-663, 2003/08/12 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000086981.09834.E0.
- [388] P. Sirniö *et al.*, "Decreased serum apolipoprotein A1 levels are associated with poor survival and systemic inflammatory response in colorectal cancer," (in eng), *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, pp. 5374-5374, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05415-9.
- [389] X. Lin, S. Hong, J. Huang, Y. Chen, Y. Chen, and Z. Wu, "Plasma apolipoprotein A1 levels at diagnosis are independent prognostic factors in invasive ductal breast cancer," (in eng), *Discovery medicine*, vol. 23, no. 127, pp. 247-258, Apr 2017.
- [390] J. X. Liu *et al.*, "Apolipoprotein A1 and B as risk factors for development of intraocular metastasis in patients with breast cancer," (in eng), *Cancer management and research*, vol. 11, pp. 2881-2888, 2019, doi: 10.2147/cmar.s191352.
- [391] R. W. Mahley, "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology," *Science*, vol. 240, no. 4852, p. 622, 1988, doi: 10.1126/science.3283935.

- [392] R. J. Havel, "Familial dysbetalipoproteinemia. New aspects of pathogenesis and diagnosis," (in eng), *The Medical clinics of North America*, vol. 66, no. 2, pp. 441-54, Mar 1982, doi: 10.1016/s0025-7125(16)31429-8.
- [393] Y. Huang, "A β -independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 16, no. 6, pp. 287-294, 2010/06/01/ 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.04.004>.
- [394] J. H. Stengard, K. M. Weiss, and C. F. Sing, "An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E," (in eng), *Human genetics*, vol. 103, no. 2, pp. 234-41, Aug 1998, doi: 10.1007/s004390050811.
- [395] G. Utermann, "Apolipoprotein E polymorphism in health and disease," (in eng), *American heart journal*, vol. 113, no. 2 Pt 2, pp. 433-40, Feb 1987, doi: 10.1016/0002-8703(87)90610-7.
- [396] F. Schiele *et al.*, "Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project," (in eng), *Atherosclerosis*, vol. 152, no. 2, pp. 475-88, Oct 2000, doi: 10.1016/s0021-9150(99)00501-8.
- [397] D. M. Hallman *et al.*, "The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations," (in eng), *Am J Hum Genet*, vol. 49, no. 2, pp. 338-349, 1991. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1867194>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683282/>.
- [398] Y. Huang and R. W. Mahley, "Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases," (in eng), *Neurobiology of disease*, vol. 72 Pt A, pp. 3-12, Dec 2014, doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.025.
- [399] R. W. Mahley and Y. Huang, "Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond," (in eng), *Curr Opin Lipidol*, vol. 10, no. 3, pp. 207-217, 1999/06// 1999, doi: 10.1097/00041433-199906000-00003.
- [400] C. F. Sing and J. Davignon, "Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation," (in eng), *Am J Hum Genet*, vol. 37, no. 2, pp. 268-285, 1985. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3985008>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1684560/>.
- [401] K. H. Weisgraber, "Apolipoprotein E: structure-function relationships," (in eng), *Advances in protein chemistry*, vol. 45, pp. 249-302, 1994.
- [402] E. J. Schaefer *et al.*, "Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham Offspring Study," *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, vol. 14, no. 7, pp. 1105-1113, 1994/07/01 1994, doi: 10.1161/01.ATV.14.7.1105.
- [403] A. T. Remaley *et al.*, "Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 280, no. 3, pp. 818-23, Jan 26 2001, doi: 10.1006/bbrc.2000.4219.
- [404] Z. H. Huang, M. L. Fitzgerald, and T. Mazzone, "Distinct cellular loci for the ABCA1-dependent and ABCA1-independent lipid efflux mediated by endogenous apolipoprotein E expression," (in eng), *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, no. 1, pp. 157-62, Jan 2006, doi: 10.1161/01.ATV.0000193627.12516.1d.
- [405] F. Matsuura, N. Wang, W. Chen, X. C. Jiang, and A. R. Tall, "HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 116, no. 5, pp. 1435-42, May 2006, doi: 10.1172/jci27602.
- [406] C. Langer *et al.*, "Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages," (in eng), *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 78, no. 4, pp. 217-27, 2000.

- [407] M. F. Linton, J. B. Atkinson, and S. Fazio, "Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation," (in eng), *Science*, vol. 267, no. 5200, pp. 1034-7, Feb 17 1995, doi: 10.1126/science.7863332.
- [408] H. Minagawa *et al.*, "Mechanism underlying apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture," (in eng), *J Neurosci Res*, vol. 87, no. 11, pp. 2498-2508, 2009, doi: 10.1002/jnr.22073.
- [409] R. W. Mahley, "Apolipoprotein E: Remarkable Protein Sheds Light on Cardiovascular and Neurological Diseases," *Clinical Chemistry*, vol. 63, no. 1, p. 14, 2017, doi: 10.1373/clinchem.2016.255695.
- [410] E. Bon *et al.*, "SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer," (in eng), *Nature communications*, vol. 7, pp. 13648-13648, 2016, doi: 10.1038/ncomms13648.
- [411] M. Pinault *et al.*, "Development of a novel HPTLC-based method for the simultaneous quantification of clinically relevant lipids from cells and tissue extracts," *bioRxiv*, p. 779603, 2019, doi: 10.1101/779603.
- [412] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," (in eng), *Canadian journal of biochemistry and physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911-7, Aug 1959, doi: 10.1139/o59-099.
- [413] A. B. Montpellier, "Système label-free xCELLigence," 2016.
- [414] A. B. Inc. "What is Real-Time Cell Analysis?" <https://www.aceabio.com/about/real-time-cell-analysis/> (accessed).
- [415] "Cell Invasion and Migration: xCELLigence RTCA DP is a Truly Quantitative Alternate to the Subjective Transwell Assay " <https://www.aceabio.com/applications/cell-invasion-and-migration/> (accessed).
- [416] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method," (in eng), *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 25, no. 4, pp. 402-8, Dec 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [417] S. Zazo *et al.*, "Generation, characterization, and maintenance of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer cell lines," (in eng), *Am J Cancer Res*, vol. 6, no. 11, pp. 2661-2678, 2016. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904779>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126281/>.
- [418] <https://www.proteinatlas.org/> (accessed 25/10/19, 2019).
- [419] A. Von Eckardstein *et al.*, "ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 9, pp. 1555-1561, 2001/07/01 2001, doi: 10.1096/fj.00-0798com.
- [420] N. Wang, D. L. Silver, C. Thiele, and A. R. Tall, "ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 26, pp. 23742-23747, 2001. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/276/26/23742.abstract>.
- [421] P. E. Fielding, K. Nagao, H. Hakamata, G. Chimini, and C. J. Fielding, "A Two-Step Mechanism for Free Cholesterol and Phospholipid Efflux from Human Vascular Cells to Apolipoprotein A-1," *Biochemistry*, vol. 39, no. 46, pp. 14113-14120, 2000/11/01 2000, doi: 10.1021/bi0004192.
- [422] T. J. F. Nieland *et al.*, "Cross-inhibition of SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol transport by the small molecules BLT-4 and glyburide," *Journal of Lipid Research*, vol. 45, no. 7, pp. 1256-1265, 2004. [Online]. Available: <http://www.jlr.org/content/45/7/1256.abstract>.
- [423] R. Sato, "Functions of Cholesterol Metabolites," *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 61, no. Supplement, pp. S151-S153, 2015, doi: 10.3177/jnsv.61.S151.
- [424] V. Charlton-Menys and P. N. Durrington, "Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules," *Experimental Physiology*, vol. 93, no. 1, pp. 27-42, 2008/01/01 2008, doi: 10.1113/expphysiol.2006.035147.

- [425] A. Kloudova, F. P. Guengerich, and P. Soucek, "The Role of Oxysterols in Human Cancer," (in eng), *Trends Endocrinol Metab*, vol. 28, no. 7, pp. 485-496, 2017, doi: 10.1016/j.tem.2017.03.002.
- [426] J. Silva, A. Beckedorf, and E. Bieberich, "Osteoblast-derived oxysterol is a migration-inducing factor for human breast cancer cells," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 28, pp. 25376-85, Jul 11 2003, doi: 10.1074/jbc.M301233200.
- [427] C. Röhrli and H. Stangl, "Cholesterol metabolism-physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum," (in eng), *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, vol. 168, no. 11-12, pp. 280-285, 2018, doi: 10.1007/s10354-018-0626-2.
- [428] M. Kwong, Y. W. Kan, and J. Y. Chan, "The CNC basic leucine zipper factor, Nrf1, is essential for cell survival in response to oxidative stress-inducing agents. Role for Nrf1 in gamma-gcs(l) and gss expression in mouse fibroblasts," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 274, no. 52, pp. 37491-8, Dec 24 1999, doi: 10.1074/jbc.274.52.37491.
- [429] S. B. Widenmaier *et al.*, "NRF1 Is an ER Membrane Sensor that Is Central to Cholesterol Homeostasis," (in eng), *Cell*, vol. 171, no. 5, pp. 1094-1109.e15, Nov 16 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.10.003.
- [430] Q. Wu *et al.*, "27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth," (in eng), *Cell Rep*, vol. 5, no. 3, pp. 637-45, Nov 14 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.006.
- [431] R. Lappano *et al.*, "The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor alpha-mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes," (in eng), *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16631, Jan 31 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016631.
- [432] V. Mutemberezi, O. Guillemot-Legris, and G. G. Muccioli, "Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators," (in eng), *Progress in lipid research*, vol. 64, pp. 152-169, Oct 2016, doi: 10.1016/j.plipres.2016.09.002.
- [433] C. Hong and P. Tontonoz, "Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery," (in eng), *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 13, no. 6, pp. 433-44, Jun 2014, doi: 10.1038/nrd4280.
- [434] A. L. I. El Roz, J.-M. Bard, J.-M. Huvelin, and H. Nazih, "LXR Agonists and ABCG1-dependent Cholesterol Efflux in MCF-7 Breast Cancer Cells: Relation to Proliferation and Apoptosis," *Anticancer Research*, vol. 32, no. 7, pp. 3007-3013, 2012. [Online]. Available: <http://ar.iijournals.org/content/32/7/3007.abstract>.
- [435] C. D. DuSell, M. Umetani, P. W. Shaul, D. J. Mangelsdorf, and D. P. McDonnell, "27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator," (in eng), *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 22, no. 1, pp. 65-77, Jan 2008, doi: 10.1210/me.2007-0383.
- [436] J. Maric, R. S. Kiss, V. Franklin, and Y. L. Marcel, "Intracellular Lipidation of Newly Synthesized Apolipoprotein A-I in Primary Murine Hepatocytes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 39942-39949, 2005. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/280/48/39942.abstract>.
- [437] G. Taraboletti, L. Perin, B. Bottazzi, A. Mantovani, R. Giavazzi, and M. Salmona, "Membrane fluidity affects tumor-cell motility, invasion and lung-colonizing potential," *International Journal of Cancer*, vol. 44, no. 4, pp. 707-713, 1989/10/15 1989, doi: 10.1002/ijc.2910440426.
- [438] W. Zhao *et al.*, "Candidate Antimetastasis Drugs Suppress the Metastatic Capacity of Breast Cancer Cells by Reducing Membrane Fluidity," (in eng), *Cancer Res*, vol. 76, no. 7, pp. 2037-49, Apr 1 2016, doi: 10.1158/0008-5472.can-15-1970.
- [439] M. Zamanian-Daryoush and J. A. DiDonato, "Apolipoprotein A-I and Cancer," (in eng), *Frontiers in pharmacology*, vol. 6, pp. 265-265, 2015, doi: 10.3389/fphar.2015.00265.

- [440] Z. Zhang *et al.*, "Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer," (in eng), *Cancer Res*, vol. 64, no. 16, pp. 5882-90, Aug 15 2004, doi: 10.1158/0008-5472.can-04-0746.
- [441] L. E. Moore *et al.*, "Evaluation of apolipoprotein A1 and posttranslationally modified forms of transthyretin as biomarkers for ovarian cancer detection in an independent study population," (in eng), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 15, no. 9, pp. 1641-6, Sep 2006, doi: 10.1158/1055-9965.epi-05-0980.
- [442] H. Tuft Stavnes, D. A. Nymoene, T. E. Hetland Falkenthal, J. Kaern, C. G. Trope, and B. Davidson, "APOA1 mRNA expression in ovarian serous carcinoma effusions is a marker of longer survival," (in eng), *Am J Clin Pathol*, vol. 142, no. 1, pp. 51-7, Jul 2014, doi: 10.1309/ajcpd8nbshxrql7.
- [443] M. Ehmann *et al.*, "Identification of potential markers for the detection of pancreatic cancer through comparative serum protein expression profiling," (in eng), *Pancreas*, vol. 34, no. 2, pp. 205-14, Mar 2007, doi: 10.1097/01.mpa.0000250128.57026.b2.
- [444] F. J. van Duijnhoven *et al.*, "Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition," (in eng), *Gut*, vol. 60, no. 8, pp. 1094-102, Aug 2011, doi: 10.1136/gut.2010.225011.
- [445] S. J. Chang *et al.*, "The association between lipid profiles and breast cancer among Taiwanese women," (in eng), *Clinical chemistry and laboratory medicine*, vol. 45, no. 9, pp. 1219-23, 2007, doi: 10.1515/cclm.2007.263.
- [446] D. M. Lane, K. K. Boatman, and W. J. McConathy, "Serum lipids and apolipoproteins in women with breast masses," (in eng), *Breast Cancer Res Treat*, vol. 34, no. 2, pp. 161-9, May 1995, doi: 10.1007/bf00665788.
- [447] M. Zamanian-Daryoush *et al.*, "The cardioprotective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 288, no. 29, pp. 21237-52, Jul 19 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.468967.
- [448] F. Su *et al.*, "Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 46, pp. 19997-20002, Nov 16 2010, doi: 10.1073/pnas.1009010107.
- [449] F. Gao *et al.*, "L-5F, an apolipoprotein A-I mimetic, inhibits tumor angiogenesis by suppressing VEGF/basic FGF signaling pathways," (in eng), *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, vol. 3, no. 4, pp. 479-89, Apr 2011, doi: 10.1039/c0ib00147c.
- [450] E. Ganapathy *et al.*, "D-4F, an apoA-I mimetic peptide, inhibits proliferation and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer cells by upregulating the antioxidant enzyme MnSOD," (in eng), *Int J Cancer*, vol. 130, no. 5, pp. 1071-81, Mar 1 2012, doi: 10.1002/ijc.26079.
- [451] C. Danilo, J. L. Gutierrez-Pajares, M. A. Mainieri, I. Mercier, M. P. Lisanti, and P. G. Frank, "Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development," (in eng), *Breast Cancer Res*, vol. 15, no. 5, pp. R87-R87, 2013, doi: 10.1186/bcr3483.
- [452] M. Rotheneder and G. M. Kostner, "Effects of low- and high-density lipoproteins on the proliferation of human breast cancer cells in vitro: differences between hormone-dependent and hormone-independent cell lines," (in eng), *Int J Cancer*, vol. 43, no. 5, pp. 875-9, May 15 1989, doi: 10.1002/ijc.2910430523.
- [453] W. M. Cao *et al.*, "A Mutant High-Density Lipoprotein Receptor Inhibits Proliferation of Human Breast Cancer Cells," *Cancer Research*, vol. 64, no. 4, p. 1515, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0675.
- [454] P. G. Frank *et al.*, "Stabilization of Caveolin-1 by Cellular Cholesterol and Scavenger Receptor Class B Type I," *Biochemistry*, vol. 41, no. 39, pp. 11931-11940, 2002/10/01 2002, doi: 10.1021/bi0257078.

- [455] Y. Wang *et al.*, "The diagnostic value of apolipoprotein E in malignant pleural effusion associated with non-small cell lung cancer," (in eng), *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, vol. 421, pp. 230-5, Jun 5 2013, doi: 10.1016/j.cca.2013.03.013.
- [456] W. P. Su, Y. T. Chen, W. W. Lai, C. C. Lin, J. J. Yan, and W. C. Su, "Apolipoprotein E expression promotes lung adenocarcinoma proliferation and migration and as a potential survival marker in lung cancer," (in eng), *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 71, no. 1, pp. 28-33, Jan 2011, doi: 10.1016/j.lungcan.2010.04.009.
- [457] S. K. Jayakar *et al.*, "Apolipoprotein E Promotes Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 187, no. 10, pp. 2259-2272, 2017, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.06.016.
- [458] Z. Zhao *et al.*, "Apolipoprotein E Overexpression Is Associated With Tumor Progression and Poor Survival in Colorectal Cancer," (in eng), *Front Genet*, vol. 9, pp. 650-650, 2018, doi: 10.3389/fgene.2018.00650.
- [459] Y. C. Chen *et al.*, "Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer," (in eng), *Cancer Res*, vol. 65, no. 1, pp. 331-7, Jan 1 2005.
- [460] P. J. Browning *et al.*, "Apolipoprotein E (ApoE), a novel heparin-binding protein inhibits the development of Kaposi's sarcoma-like lesions in BALB/c nu/nu mice," (in eng), *J Exp Med*, vol. 180, no. 5, pp. 1949-1954, 1994, doi: 10.1084/jem.180.5.1949.
- [461] T. Vogel *et al.*, "Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation," (in eng), *Journal of cellular biochemistry*, vol. 54, no. 3, pp. 299-308, Mar 1994, doi: 10.1002/jcb.240540306.
- [462] A. L. I. El Roz, J.-M. Bard, S. Valin, J.-M. Huvelin, and H. Nazih, "Macrophage Apolipoprotein E and Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells: Role of LXR," *Anticancer Research*, vol. 33, no. 9, pp. 3783-3789, 2013. [Online]. Available: <http://ar.iijournals.org/content/33/9/3783.abstract>.
- [463] S.-A. Ha *et al.*, "Dual action of apolipoprotein E-interacting HCCR-1 oncoprotein and its implication for breast cancer and obesity," (in eng), *J Cell Mol Med*, vol. 13, no. 9B, pp. 3868-3875, 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00652.x.
- [464] Y. Lombardo, A. de Giorgio, C. R. Coombes, J. Stebbing, and L. Castellano, "Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines," (in eng), *J Vis Exp*, no. 97, p. 52671, 2015, doi: 10.3791/52671.
- [465] J. Manuel Iglesias *et al.*, "Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin," (in eng), *PloS one*, vol. 8, no. 10, pp. e77281-e77281, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0077281.
- [466] A. K. Witkiewicz *et al.*, "An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 174, no. 6, pp. 2023-34, Jun 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080873.
- [467] X.-L. Qian *et al.*, "Caveolin-1: a multifaceted driver of breast cancer progression and its application in clinical treatment," (in eng), *OncoTargets and therapy*, vol. 12, pp. 1539-1552, 2019, doi: 10.2147/OTT.S191317.
- [468] P. G. Frank, M. W. Cheung, S. Pavlides, G. Llaverias, D. S. Park, and M. P. Lisanti, "Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis," (in eng), *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 291, no. 2, pp. H677-86, Aug 2006, doi: 10.1152/ajpheart.01092.2005.
- [469] F. Wang, H. M. Gu, and D. W. Zhang, "Caveolin-1 and ATP binding cassette transporter A1 and G1-mediated cholesterol efflux," (in eng), *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, vol. 14, no. 2, pp. 142-8, 2014.
- [470] E. Ikonen and R. G. Parton, "Caveolins and Cellular Cholesterol Balance," *Traffic*, vol. 1, no. 3, pp. 212-217, 2000/03/01 2000, doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.010303.x.
- [471] M. Bosch *et al.*, "Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility," (in eng), *Current biology : CB*, vol. 21, no. 8, pp. 681-6, Apr 26 2011, doi: 10.1016/j.cub.2011.03.030.

- [472] P. G. Frank *et al.*, "Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I," (in eng), *Biochemistry*, vol. 41, no. 39, pp. 11931-40, Oct 1 2002, doi: 10.1021/bi0257078.
- [473] A. Campos, R. Burgos-Ravanal, M. F. Gonz lez, R. Huilcaman, L. Lobos Gonz lez, and A. F. G. Quest, "Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis," (in eng), *Biomolecules*, vol. 9, no. 8, p. 314, 2019, doi: 10.3390/biom9080314.
- [474] K. Quann *et al.*, "Caveolin-1 is a negative regulator of tumor growth in glioblastoma and modulates chemosensitivity to temozolomide," (in eng), *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 12, no. 10, pp. 1510-20, May 15 2013, doi: 10.4161/cc.24497.
- [475] C. Racine, M. Belanger, H. Hirabayashi, M. Boucher, J. Chakir, and J. Couet, "Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 255, no. 3, pp. 580-6, Feb 24 1999, doi: 10.1006/bbrc.1999.0236.
- [476] S. W. Lee, C. L. Reimer, P. Oh, D. B. Campbell, and J. E. Schnitzer, "Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells," (in eng), *Oncogene*, vol. 16, no. 11, pp. 1391-7, Mar 1998, doi: 10.1038/sj.onc.1201661.
- [477] F. C. Bender, M. A. Reymond, C. Bron, and A. F. Quest, "Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity," (in eng), *Cancer Res*, vol. 60, no. 20, pp. 5870-8, Oct 15 2000.
- [478] B. Torrejon, I. Cristobal, F. Rojo, and J. Garcia-Foncillas, "Caveolin-1 is Markedly Downregulated in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer," (in eng), *World journal of surgery*, vol. 41, no. 10, pp. 2625-2630, Oct 2017, doi: 10.1007/s00268-017-4065-9.
- [479] M. C. Manara *et al.*, "CD99 acts as an oncosuppressor in osteosarcoma," (in eng), *Molecular biology of the cell*, vol. 17, no. 4, pp. 1910-21, Apr 2006, doi: 10.1091/mbc.e05-10-0971.
- [480] K. Wiechen *et al.*, "Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 159, no. 5, pp. 1635-43, Nov 2001, doi: 10.1016/s0002-9440(10)63010-6.
- [481] L. Li *et al.*, "Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells," (in eng), *Cancer Res*, vol. 61, no. 11, pp. 4386-92, Jun 1 2001.
- [482] L. Lobos-Gonzalez *et al.*, "E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells," (in eng), *Pigment cell & melanoma research*, vol. 26, no. 4, pp. 555-70, Jul 2013, doi: 10.1111/pcmr.12085.
- [483] H. Urra *et al.*, "Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells," (in eng), *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e33085, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033085.
- [484] V. A. Torres *et al.*, "E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 21, pp. 7703-17, Nov 2007, doi: 10.1128/mcb.01991-06.
- [485] K. M. Bailey and J. Liu, "Caveolin-1 up-regulation during epithelial to mesenchymal transition is mediated by focal adhesion kinase," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 20, pp. 13714-24, May 16 2008, doi: 10.1074/jbc.M709329200.
- [486] R. Wang *et al.*, "Caveolin 1 knockdown inhibits the proliferation, migration and invasion of human breast cancer BT474 cells," (in eng), *Molecular medicine reports*, vol. 9, no. 5, pp. 1723-8, May 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2018.
- [487] X. Gai, Z. Lu, K. Tu, Z. Liang, and X. Zheng, "Caveolin-1 is up-regulated by GLI1 and contributes to GLI1-driven EMT in hepatocellular carcinoma," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e84551, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0084551.
- [488] P. Liu, W. P. Li, T. Machleidt, and R. G. Anderson, "Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells," (in eng), *Nature cell biology*, vol. 1, no. 6, pp. 369-75, Oct 1999, doi: 10.1038/14067.

- [489] S. A. Tahir *et al.*, "Secreted Caveolin-1 Stimulates Cell Survival/Clonal Growth and Contributes to Metastasis in Androgen-insensitive Prostate Cancer," *Cancer Research*, vol. 61, no. 10, p. 3882, 2001. [Online]. Available: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/10/3882.abstract>.
- [490] R. Bartz, J. Zhou, J. T. Hsieh, Y. Ying, W. Li, and P. Liu, "Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of caveolin-1 negative LNCaP cells in vivo," (in eng), *Int J Cancer*, vol. 122, no. 3, pp. 520-5, Feb 1 2008, doi: 10.1002/ijc.23142.
- [491] F. Felicetti *et al.*, "Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma," (in eng), *Int J Cancer*, vol. 125, no. 7, pp. 1514-22, Oct 1 2009, doi: 10.1002/ijc.24451.
- [492] A. Sengupta, S. Mateo-Lozano, O. M. Tirado, and V. Notario, "Auto-stimulatory action of secreted caveolin-1 on the proliferation of Ewing's sarcoma cells," (in eng), *International journal of oncology*, vol. 38, no. 5, pp. 1259-65, May 2011, doi: 10.3892/ijo.2011.963.
- [493] M. Logozzi *et al.*, "High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients," (in eng), *PLoS one*, vol. 4, no. 4, pp. e5219-e5219, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0005219.
- [494] D. A. Harris, S. H. Patel, M. Gucek, A. Hendrix, W. Westbroek, and J. W. Taraska, "Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement," (in eng), *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0117495, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0117495.
- [495] A. Campos *et al.*, "Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines," (in eng), *Nanomedicine (London, England)*, vol. 13, no. 20, pp. 2597-2609, Oct 2018, doi: 10.2217/nnm-2018-0094.
- [496] C. Du *et al.*, "Caveolin-1 limits the contribution of BKCa channel to MCF-7 breast cancer cell proliferation and invasion," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 15, no. 11, pp. 20706-20722, 2014, doi: 10.3390/ijms151120706.
- [497] P. Lajoie *et al.*, "Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells," (in eng), *The Journal of cell biology*, vol. 179, no. 2, pp. 341-56, Oct 22 2007, doi: 10.1083/jcb.200611106.
- [498] Y.-N. Liang *et al.*, "Combined caveolin-1 and epidermal growth factor receptor expression as a prognostic marker for breast cancer," (in eng), *Oncol Lett*, vol. 15, no. 6, pp. 9271-9282, 2018, doi: 10.3892/ol.2018.8533.
- [499] Z. C. Nwosu, M. P. Ebert, S. Dooley, and C. Meyer, "Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective," (in eng), *Mol Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 71-71, 2016, doi: 10.1186/s12943-016-0558-7.
- [500] R. Rostoker *et al.*, "Highly specific role of the insulin receptor in breast cancer progression," (in eng), *Endocr Relat Cancer*, vol. 22, no. 2, pp. 145-157, 2015, doi: 10.1530/ERC-14-0490.
- [501] A. Schlegel, C. Wang, B. S. Katzenellenbogen, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti, "Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 47, pp. 33551-6, Nov 19 1999, doi: 10.1074/jbc.274.47.33551.
- [502] P. Jézéquel *et al.*, "bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 131, no. 3, pp. 765-775, 2012/02/01 2012, doi: 10.1007/s10549-011-1457-7.
- [503] J. R. Prasanthi, A. Huls, S. Thomasson, A. Thompson, E. Schommer, and O. Ghribi, "Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells," (in eng), *Mol Neurodegener*, vol. 4, pp. 1-1, 2009, doi: 10.1186/1750-1326-4-1.
- [504] M. A. Kennedy *et al.*, "Characterization of the Human ABCG1 Gene: LIVER X RECEPTOR ACTIVATES AN INTERNAL PROMOTER THAT PRODUCES A NOVEL TRANSCRIPT ENCODING AN ALTERNATIVE FORM OF THE PROTEIN," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 39438-39447, 2001. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/276/42/39438.abstract>.

- [505] S. L. Sabol, H. B. Brewer, and S. Santamarina-Fojo, "The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver," *Journal of lipid research*, vol. 46, no. 10, pp. 2151-2167, 2005. [Online]. Available: <http://www.jlr.org/content/46/10/2151.abstract>.
- [506] D. M. Vigushin *et al.*, "The nuclear oxysterol receptor LXR α is expressed in the normal human breast and in breast cancer," *Medical Oncology*, vol. 21, no. 2, pp. 123-131, 2004/06/01 2004, doi: 10.1385/MO:21:2:123.
- [507] D. Schaeffer, J. A. Somarelli, G. Hanna, G. M. Palmer, and M. A. Garcia-Blanco, "Cellular migration and invasion uncoupled: increased migration is not an inexorable consequence of epithelial-to-mesenchymal transition," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 34, no. 18, pp. 3486-3499, 2014, doi: 10.1128/MCB.00694-14.
- [508] O. Ilina and P. Friedl, "Mechanisms of collective cell migration at a glance," *Journal of cell science*, vol. 122, no. 18, p. 3203, 2009, doi: 10.1242/jcs.036525.
- [509] F. Frezard and A. Garnier-Suillerot, "Permeability of lipid bilayer to anthracycline derivatives. Role of the bilayer composition and of the temperature," (in eng), *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1389, no. 1, pp. 13-22, Jan 5 1998, doi: 10.1016/s0005-2760(97)00070-2.
- [510] A. C. Alves *et al.*, "Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from in vitro and in silico studies," (in eng), *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 6343, Jul 24 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06445-z.
- [511] L. Cedo *et al.*, "ApoA-I mimetic administration, but not increased apoA-I-containing HDL, inhibits tumour growth in a mouse model of inherited breast cancer," (in eng), *Sci Rep*, vol. 6, p. 36387, Nov 3 2016, doi: 10.1038/srep36387.
- [512] A. B. Awad, A. C. Downie, C. Fink, and U. Kim, "Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice," *Anticancer research*, vol. 20, pp. 821-4, 03/01 2000.
- [513] G. Llaverias *et al.*, "Role of Cholesterol in the Development and Progression of Breast Cancer," *Am J Pathol*, vol. 178, no. 1, pp. 402-412, 2011/01/01/ 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.005>.
- [514] A. Baek *et al.*, "The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells," *Nature communications*, vol. 8, 12/01 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00910-z.
- [515] S. Yang, J. J. Zhang, and X. Y. Huang, "Mouse models for tumor metastasis," (in eng), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 928, pp. 221-8, 2012, doi: 10.1007/978-1-62703-008-3_17.
- [516] G. M. Hargrove, A. Junco, and N. C. Wong, "Hormonal regulation of apolipoprotein AI," (in eng), *Journal of molecular endocrinology*, vol. 22, no. 2, pp. 103-11, Apr 1999, doi: 10.1677/jme.0.0220103.
- [517] A. H. Taylor *et al.*, "Glucocorticoid increases rat apolipoprotein A-I promoter activity," *Journal of lipid research*, vol. 37, no. 10, pp. 2232-2243, 1996. [Online]. Available: <http://www.jlr.org/content/37/10/2232.abstract>.
- [518] K. Murao, Y. Wada, T. Nakamura, A. H. Taylor, A. D. Mooradian, and N. C. W. Wong, "Effects of Glucose and Insulin on Rat Apolipoprotein A-I Gene Expression," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 30, pp. 18959-18965, 1998. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/273/30/18959.abstract>.
- [519] M. J. Haas, D. Reinacher, J. P. Li, N. C. Wong, and A. D. Mooradian, "Regulation of apoA1 gene expression with acidosis: requirement for a transcriptional repressor," (in eng), *Journal of molecular endocrinology*, vol. 27, no. 1, pp. 43-57, Aug 2001, doi: 10.1677/jme.0.0270043.
- [520] X.-L. Zheng, S. Matsubara, C. Diao, M. D. Hollenberg, and N. C. W. Wong, "Epidermal Growth Factor Induction of Apolipoprotein A-I Is Mediated by the Ras-MAP Kinase Cascade and Sp1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 17, pp. 13822-13829, 2001. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/276/17/13822.abstract>.

- [521] J. Y. J. Wu, Y. Wu, S. K. Reaves, Y. R. Wang, P. P. Lei, and K. Y. Lei, "Apolipoprotein A-I gene expression is regulated by cellular zinc status in Hep G2 cells," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 277, no. 3, pp. C537-C544, 1999/09/01 1999, doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.3.C537.
- [522] M. J. Haas, R. Sawaf, M. H. Horani, F. Gobal, N. C. Wong, and A. D. Mooradian, "Effect of chromium on apolipoprotein A-I expression in HepG2 cells," (in eng), *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 19, no. 4, pp. 353-7, Apr 2003, doi: 10.1016/s0899-9007(02)00960-7.
- [523] H. K. Reeve, "Evolutionarily stable communication between kin: a general model," (in eng), *Proc Biol Sci*, vol. 264, no. 1384, pp. 1037-1040, 1997, doi: 10.1098/rspb.1997.0143.
- [524] P. Tontonoz and B. M. Spiegelman, "Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma," (in eng), *Annual review of biochemistry*, vol. 77, pp. 289-312, 2008, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- [525] L. Yue, N. Rasouli, G. Ranganathan, P. A. Kern, and T. Mazzone, "Divergent Effects of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonists and Tumor Necrosis Factor α on Adipocyte ApoE Expression," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 46, pp. 47626-47632, 2004. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/279/46/47626.abstract>.

Publications

Apolipoprotein-Mediated Regulation of Lipid Metabolism Differentially Affects Breast Cancer Cell Properties

Céline Ben Hassen¹, Jorge L. Gutierrez-Pajares¹, Cyrille Guimaraes¹, Roseline Guibon^{1,2}, Michelle Pinault¹, Gaëlle Fromont^{1,2}, and Philippe G. Frank^{1*}

x

¹ University of Tours INSERM UMR1069 "Nutrition, Growth and Cancer", Faculty of Medicine, France

² Department of Pathology, CHU-University of Tours, Tours, France

xt

Submitted to Breast Cancer
Research

***Corresponding author:** Philippe G. Frank, INSERM UMR1069, Université François Rabelais de Tours, 37032 Tours Cedex, France
E-mail: Philippe.Frank@univ-tours.fr

Running title: (5 words max): ApoA-I and ApoE in Breast Cancer

Abstract

The highest incidence of breast cancer is in the western world. Several aspects of the Western lifestyle are known risk factors for breast cancer. In particular, previous studies have shown that cholesterol levels can play an important role in the regulation of tumor progression. To test this hypothesis, we modulated cholesterol metabolism in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 using a genetic approach. Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apolipoprotein E (apoE) were expressed in these cell lines to modulate cholesterol metabolism. Our results show that both apolipoproteins can regulate cholesterol metabolism, and can control the Epithelial-to-Mesenchymal Transition process. However, these effects were different depending on the cell type. Our results show that expressing apoA-I or apoE stimulates proliferation, migration, and tumor growth of MCF-7 cells. However, apoA-I and apoE reduce proliferation and migration of MDA-MB-231 cells. These data suggest that modulating sterol metabolism may be most effective at limiting tumor progression in triple-negative models cancer.

Introduction

The highest incidence of breast cancer is in the western world. Several aspects of Western lifestyles are known risk factors for breast cancer. Diets high in saturated fat, early menarche, low parity, and advanced age at first pregnancy are established risk factors for breast cancer [1]. All of these risks are more common in western countries. Importantly, only 10% of breast cancer cases have a genetic origin [1]. As a consequence, in the Western world, environmental factors appear to have a far greater contribution to breast cancer incidence than genetic factors. Many studies have now suggested an important role for several dietary nutrients in the progression and development of breast cancer [2]. Epidemiological studies have suggested that elevated plasma cholesterol levels are associated with an increased risk of mortality and increased risk of breast cancer after menopause. In pre-menopausal women, recent reports have proposed a protective role for high-density lipoprotein (HDL) against breast cancer [3, 4]. This observation is consistent with studies showing that the use of lipid-lowering drugs in older women is associated with a reduction in breast cancer development [5]. Therefore, modulating cholesterol metabolism in breast cancer cells may alter cancer progression.

Our previous studies have shown that increased plasma cholesterol levels are associated with increased tumor burden and accelerated tumor formation in a mouse breast cancer model (PyMTTg). They also indicate that the metabolism of cholesterol and plasma lipoproteins is abnormal in PyMTTg mice that spontaneously develop tumors of the mammary gland [6]. However, the relationship between cholesterol / lipoproteins and the formation of tumors is still poorly understood. It is therefore essential to understand how the metabolism of plasma cholesterol and, more particularly, that of the lipoproteins that carry it, can affect breast cancer. Although cholesterol entry may promote tumor formation in human breast cancer cells, tumor cholesterol efflux may prevent the development of tumors or slow down their development. Supporting this hypothesis, we have studied the role of the membrane receptor SR-BI, which is

a transmembrane protein regulating cholesterol metabolism [7]. SR-BI binds to HDL and is responsible for the selective uptake of HDL-cholesteryl ester into the cell. Previous studies have shown that SR-BI expression is increased in tumor tissues obtained from patients with breast cancer. On the other hand, the expression of SR-BI is weak in the corresponding non-cancerous tissues [8]. We have shown that the elimination of SR-BI via an shRNA approach or its pharmacological inhibition allow to reduce proliferation , rate of invasion, and development of xenografts tumors from the human breast cancer lines MCF-7 and MDA-MB-231 in mice [9]. This effect appears to be independent of the presence of estrogen since the cells used were either triple negative (MDA-MB231) or ER + (MCF-7).

Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apolipoprotein E (apoE) are key proteins that have been shown to regulate cholesterol metabolism in various cells. For example, both proteins have been shown to promote cholesterol efflux in macrophages, which play an important role in the development of atherosclerosis. As a consequence, macrophage expression of apoA-I or apoE have associated with reduced atherosclerosis [10, 11]. To better understand the mechanism by which cholesterol regulates tumor progression, we expressed apoA-I and apoE in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231.

Material and Methods

Materials. The following antibodies were used: apoA-I (5F6) and apoE (1D7) antibodies were a kind gift from Dr. Yves L. Marcel. Caveolin-1 was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Germany) Anti-mouse secondary antibody was from Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France) and anti-rabbit secondary antibody was from BD Biosciences (San Jose, CA). All other reagents were analytical grade.

Cell culture. MCF-7 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC) (via LGC Standards, Molsheim, France) and MDA-MB-231 cells were as previously described [12]. MDA-MB-231 and MCF7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM, Lonza Bioscience, Singapour) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies, Saint Aubin, France) in an incubator kept at 37°C with 5% CO₂. Stably transfected cells were obtained by transfection of GFP, human apoA-I, and human apoE cDNA-containing plasmids (pReceiver-M68; GeneCopoeia, Inc., Rockville, MD) using endofectin (GeneCopoeia, Inc.). Cells were selected with 1.5 µg/ml puromycin.

Proliferation assays. Proliferation studies were performed using the xCELLigence RTCA DP system (ACEA Biosciences, San Diego, CA). Briefly, after background determination following the manufacturer's instructions, cells were seeded at 2,000 cells/well for both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The impedance value of each well was automatically monitored by the xCELLigence system for a duration of 96 h and expressed as the cell index value. The rate of cell growth was determined by calculating the slope of the line between two given time points.

Proliferation was also determined manually by counting the cells. Cells were seeded in 96-well plates in the media indicated for each experimental condition. At the end of the incubation,

culture media was removed and cells were washed and trypsinized. Cells were counted using an hemocytometer.

Migration and invasion assays. For Transwell migration studies, experiments were performed using the xCELLigence RTCA DP system (ACEA Biosciences). Briefly, media in the bottom well contained DMEM 5%FBS. After background determination, cells (in media containing 0.5% FBS) were added to the top well at 40,000 cells/well. Migration was monitored via real-time impedance measurements for 24 h. Experiments were performed according to the manufacturer's instructions.

Sterol content determination. Cells were grown to confluence in T175 flasks in complete media (DMEM, 10% FBS). After three washes with PBS, cells were scraped, collected, and centrifuged for 5 min at 800 rpm. An aliquot was kept for protein quantification and the remainder was used for lipid quantification. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) as per the manufacturer's instruction. For lipid extractions, lipids from the cell pellets were extracted using the method Bligh and Dyer [13]. Free and esterified cholesterol quantification was performed by HPTLC as previously described [14]. Cellular cholesterol levels were calculated by dividing the cholesterol content by the total protein content.

Sterol and oxysterol quantifications were performed by gas chromatography (GC). Using saponified lipid extracts, obtained after Bligh and Dyer extraction of cellular extracts. Lipid alcohol groups were acetylated by hot ethanoyl chloride to allow their analysis on a GC ZB5 column (internal diameter: 0.25 mm; film thickness: 0.30 µm; length: 30 m; Phenomenex, Le Pecq, France). Sterol standards (cholesterol, desmosterol, 22-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol) and phytosterols (beta-sitosterol, campesterol,

stigmasterol) were acetylated and used as reference standards. Identity confirmation of the peak in the chromatogram was performed by Mass Spectrometry.

Fluorescence microscopy. For epifluorescence microscopy imaging, cells were seeded for 24 h on coverslips and then fixed with a 2% solution of formaldehyde (in phosphate-buffered saline containing calcium and magnesium, PBS/CM, Fisher Scientific) for 30 min. After washing with PBS/CM solution, cells were permeabilized with a 0.1% Triton X-100 solution in PBS/CM/0.2% BSA (solution A) for 10 min. Cells were then incubated in the presence of 50 mM NH₄Cl in PBS/CM for 10 min to reduce autofluorescence. Detection of apoA-I (antibody 5F6) or apoE (antibody 1D7) was carried out in solution A. After several washes with solution A, cells were incubated in the presence of the secondary antibody (Fragment Rhodamine Red-X-AffiniPure F(ab')₂; Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK). After several washes with solution A, coverslips were sealed on microscope slides in the presence of Slowfade diamond antifade containing DAPI (Fischer Scientific). Cells were observed on a Nikon TI-S microscope and analyzed with NIS-BR software (Nikon, France).

For confocal microscopy imaging, cells were seeded for 24 h on coverslips and then fixed with a 2% formaldehyde solution (in DPBS/CM, Fisher Scientific) for 30 min. After washing with PBS/CM solution, cells were permeabilized with a 0.1% Triton X-100 solution in PBS/CM/0.2% BSA (solution A) for 10 min. Cells were then incubated in the presence of 50 mM NH₄Cl in PBS/CM for 10 min to reduce autofluorescence. Detection of caveolin-1 (antibody N20) was carried out in solution A. After several washes with solution A, cells were incubated in the presence of the secondary antibody (Fragment Rhodamine Red-X-AffiniPure F(ab')₂; Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK). After several washes with solution A, coverslips were sealed on microscope slides in the presence of Slowfade diamond antifade

containing DAPI (Fischer Scientific). Cells were observed on a Leica SP8 gSTED (Leica) High Resolution Laser Scanning confocal microscope using the LAS-X v2.0 software (Leica).

Immunoblot analysis. Cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich), prepared and analyzed as previously described [15]. Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Membranes were blocked in 5% milk powder in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T). Primary antibodies were diluted in 1% BSA in TBS-T and incubated for either 1 hour at room temperature or overnight at 4°C. Membranes were washed three times in TBS-T, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour at room temperature. Membranes were washed three times in TBS-T, and visualized using the Pierce Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Fisher Scientific, Inc).

Cellular mRNA quantification by qPCR. Total cellular mRNA were purified with the NucleoSpin® RNA Plus kit, according to the protocol established by the manufacturer (Macherey-Nagel, Hoerdlt, France). After quantification, mRNA were reverse transcribed using an RT kit, according to the manufacturer's instructions (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France) using a LabCycler 48 Thermocycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany). cDNA were kept at -80°C. To quantify mRNAs, a qPCR was performed using the TB Green™ Premix Ex Taq™ kit (Takara Bio Europe) according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed in Hard-Shell® 96-well low-profile skirted PCR plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using a CFX Connect™ thermocycler (Bio-Rad) at a T_m of 60–62°C. Relative quantification was obtained by calculating the ratio between the values obtained for each gene of interest and the reference gene (GAPDH). Melting curves were routinely performed to determine the specificity of the qPCR reaction. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used for

analysis. Sequences of the primer used are indicated in **Table 1**.

Determination of cellular membrane fluidity modifications. Confluent cells were mechanically detached by flushing with PBS. A suspension of 500,000 cells/ml in PBS was incubated for 15 min at 37°C with 5 µM di-4-ANE probe (Sigma-Aldrich). 488 nm was used for excitation of di-4-ANEPPDHQ, and emission was collected between 500–700 nm (Flexstation, Molecular Device, Wokingham, UK). The Generalized Polarization (GP) value was determined as followed: $GP = (I_{560} - I_{650}) / (I_{560} + I_{650})$, where I_{560} and I_{650} represent the fluorescence intensities (areas) at 560 and 650 nm, respectively.

Animal Studies. All mice were housed and maintained at the University of Tours (Medical campus). Mice used in this study were athymic nude mice obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Animal protocols used for these studies were approved by the Val de Loire Animal Ethics Committee. MCF7 cells (5×10^6) were orthotopically injected into the mammary fat pad of 6-8 week-old athymic nude mice implanted the previous day with slow release 17β-estradiol pellets (0.36mg/pellet, 60 days; Innovative Research of America, Sarasota, FL). To follow tumor growth, mice were imaged once a week. For each imaging session, mice received a single intraperitoneal injection of luciferin at 150 mg/kg and were held conscious for 10 minutes post-injection. Mice were anesthetized by isoflurane (~3% via inhalation) before imaging studies. Animals were then transferred to a Caliper IVIS Lumina imager (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) for bioimaging.

Molecular Subtype Association and Survival Analysis. Gene expression correlations targeted analysis was applied on published genomic data for patients classified in the same

molecular subtype [16, 17]. For these studies, we used GenExMiner, as previously described [18, 19].

Statistical Analyses. All values were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The Prism 7.0 program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was used for statistical analysis. Statistical significance was examined using the Student's t test or ANOVA when appropriate (if not, the non-parametric equivalents). Unless otherwise indicated, results are representative of three independent experiments.

Results

ApoA-I and ApoE Expression regulate Cellular Cholesterol distribution in MCF-7 and MDA-MB231

The results presented in **Figure 1** are based upon data generated by the TCGA Research Network [20]. A graphical presentation was obtained using the Firebrowse tool. ApoA-I is not detected in tumors obtained from breast cancer patients and most other tumor types and the corresponding healthy tissues. Only liver tumors and normal livers obtained from human patients expressed significant levels of apoA-I mRNA (**Figure 1A**). Expression levels of apoE, although more elevated than those of apoA-I, also remain very low in healthy and cancerous tissues, except for the liver (**Figure 1B**).

In a Panel of 60 Diverse Human Cancer Cell Lines (NCI-60) used by the Developmental Therapeutics Program of the U.S. National Cancer Institute, we also found that both apoA-I (**Figure 2B**) and apoE (**Figure 2B**) mRNA levels are low [21, 22], with the exception of the T-47D cell line and melanoma cell lines for apoE.

Therefore, to modulate cellular cholesterol metabolism in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, we expressed apoA-I and apoE. MDA-MB-231 and MCF-7 were transfected with GFP (control), human apoA-I, or human apoE cDNA-containing plasmids. Transfected cells were then selected and amplified. Expression of apoA-I or apoE was verified by qPCR (**Suppl. Figure 1A**) and immunofluorescence (**Suppl. Figure 1B**).

We first examined cholesterol levels in both cell lines. In both cases, we found that neither apoA-I nor apoE expression remarkably affected esterified or free cholesterol levels in MCF-7 cells (**Figure 3A**). In MDA-MB-231, apoA-I was responsible for a marginally significant increase in esterified cholesterol ($p = 0,0507$).

We also examined whether other sterols (cholesterol, desmosterol, 22-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol) levels were affected in these cell lines. These

sterols have previously been shown to affect cholesterol metabolism and cellular properties of cancer cells [23]. While no changes in the different sterol levels were observed in MCF-7 cells, apoA-I increased total oxysterol levels in MDA-MB-231 cells (**Figure 3B-C**).

However, when cellular free cholesterol distribution was examined by fluorescence microscopy using the filipin probe, differences were observed. In MCF-7 expressing apoA-I or apoE, the intracellular free cholesterol content was greater than in the MCF-7 control cells. On the other hand, in MDA-MB-231 expressing apoA-I or apoE, free cholesterol association with the plasma membrane was enhanced compared to the GFP-expressing cell line (**Figure 3D**).

Determination of cell membrane fluidity changes

Since cholesterol content of biological membranes is an important regulator of membrane fluidity [24], we determined whether apolipoprotein expression could affect membrane fluidity in the different cell lines. In MCF-7 cells, measurements of membrane fluidity using the di-4-ANE probe indicated that apoA-I expression could significantly increase membrane fluidity in this context (**Figure 4**). A similar but not significant trend was observed for apoE in MCF-7 cells. However, no effect was observed in MDA-MB-231 cells.

ApoA-I and apoE increase proliferation of MCF-7 but not of MDA-MB-231 cells

To determine the impact of apoA-I and apoE on cancer cells, proliferation of the transfected cells was examined using the xCELLigence RTCA DP system (ACEA Biosciences). Measuring the proliferation under these conditions, we observed that MCF-7 cells expressing apoA-I or apoE proliferated faster than control cells. MCF-7 expressing apoE displayed the most elevated proliferation rate. These results therefore indicate that apoA-I and apoE stimulate the proliferation of MCF-7 cells (**Figure 5AB**). Very similar results were observed when proliferation was measured by counting cells manually (**suppl Figure 2A**). For MDA-MB-231,

the reverse observations were made. Expression of either apoA-I or apoE in MDA-MB-231 was associated with a reduction of cellular proliferation compared to control cells. In that case, apoA-I expression was the most effective at decreasing proliferation of MDA-MB-231 cells (**Figure 5CD**). Very similar results were observed when proliferation was measured by counting cells manually (**suppl Figure 2B**).

ApoA-I and apoE increase migration of MCF-7 cells but decrease that of MDA-MB-231 cells

Transwell assays and wound healing studies were used to test the effect of apoA-I and apoE on the regulation of cellular migration. For MCF-7 cells, despite their intrinsic reduced ability to migrate, expression of either apoA-I or apoE was associated with a remarkable increased in the migration of MCF-7 cells (**Figure 6AB**) in Transwell assays. However, both apoA-I and apoE could reduce MDA-MB-231 cellular migration in Transwell assays (**Figure 6CD**)

ApoA-I and apoE prime MCF-7 for Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)

Cancer progression depends on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process, which allows the de-differentiation of epithelial cells to a mesenchymal-like phenotype and increases cancer cell proliferation and migration [25]. While the MCF-7 cell line remains an epithelial cell line, MDA-MB-231 already has a mesenchymal phenotype, therefore accelerated EMT in MCF-7 cells may be responsible for the increased proliferative and migratory potential of these cells expressing apoA-I and apoE. To verify the state of the EMT in our cell lines, we analyzed by qPCR mRNA levels of key genes involved in the EMT process (**Figure 7**). At the mRNA level, decrease in E-cadherin expression in MCF-7 cells expressing apoA-I or apoE was significant (**Figure 7A**). In MCF-7 cells expressing apoA-I, there were also no significant changes in the expression of fibronectin (marker of extracellular matrix adhesion), of vimentin (mesenchymal marker) or ZEB1 (TEM marker). SNAIL2 (TEM marker) mRNA levels were

marginally significantly increased. In MCF-7 cells expressing apoE, there was an increase in the expression of vimentin, fibronectin, and SNAIL2, but no change in ZEB1 expression was observed. Taken together, these results suggest a stimulation of the EMT in MCF-7 cells expressing either apoA-1 or apoE.

In MDA-MB-231 cells, we observed alterations supporting the idea that either apoA-I or apoE inhibits the EMT (**Figure 7B**). Accordingly, we found that MDA-MB-231 cells expressing apoA-I displayed reduced levels of SNAIL2, ZEB1, and fibronectin. No change in the expression of E-cadherin was observed. In MDA-MB-231 cells expressing apoE, if no changes in the expression of E-cadherin or vimentin were observed, SNAIL2, ZEB1, and fibronectin mRNA levels were found to be significantly decreased.

Regulation of EMT induced by TGF β in MCF-7 cells

TGF β is a well-known inducer of EMT [26]. To determine the effect of TGF β on EMT in MCF-7 cells, we incubated these cell lines with TGF β for 24h and examined by qPCR the transcription levels of specific mRNA of key genes involved in the EMT process (**Figure 8**). As previously observed, SNAIL2 levels were increased by apoA-I and apoE expression, and cell incubation with TGF β was associated with increased SNAIL levels in apoE-expressing cells. Importantly, ZEB1 was also induced by TGF β in apoE-expressing cells. Taken together, these data suggest that apoA-I and apoE can act as inducer of the EMT process in MCF-7 cells.

Modulation of the expression of gene implicated in the regulation of cholesterol metabolism

To determine if the observed effects could be associated with alteration in the regulation of cholesterol metabolism-regulating genes, we examined at the mRNA level their expression (**Figure 9**). In MCF-7 cells expressing apoA-I (**Figure 9A**), CAV1 and ABCA1 levels were increased. On the other hand, SR-BI, VLDLR, HMGCR, and ABCG1 levels were reduced. In

MCF-7 cells expressing apoE, ABCA1 and CAV1 levels were significantly increased. While those of VLDLR, SR-BI, ABCG1, and HMGCR were not affected (**Figure 9A**).

In MDA-MB-231 cells expressing apoA-I (**Figure 9B**), SR-BI mRNA levels were slightly increased. Expression of ABCG1 levels was remarkably increased. In apoE-expressing cells, CAV1, SR-BI, and ABCG1 levels remained unchanged. However, the expression of VLDLR, LDLR, and HMGCR increased ((**Figure 9A**)). Regarding caveolin-1, while no difference in expression levels was observed, confocal microscopy of MDA-MB-231 cells show an increased plasma membrane localization of this protein (**Suppl. Figure 3**). Low expression levels of caveolin-1 in MCF-7 did not allow us to detect this protein under the same conditions.

Taken together, these data suggest that apoA-I or apoE expression can induce major changes in the regulation cholesterol metabolism-regulating genes.

Effect of apoA-I and apoE on tumor formation in vivo

To determine the role of apoA-I and apoE in tumor growth of MCF7 cells, the different MCF7 cell lines were orthotopically injected into the mammary fat pad of athymic nude mice after implantation with slow release 17 β -estradiol pellets. Tumor growth was followed by bioluminescence analysis for 60 days after injection. Tumor growth curves presented **Figure 10** indicate that, as predicted by in vitro experiments, tumor growth was significantly enhanced with MCF-7 expressing apoA-I or apoE.

Discussion

Our study demonstrates for the first time that apoA-I and apoE expression in two different types of human breast cancer cell lines can have very different consequences on the cancer properties of these cell lines. We observed that apoA-I and apoE increase the aggressive potential of a luminal A model but decrease the aggressiveness of a triple negative model.

In the present study, we have shown that apoA-I and apoE can modulate cholesterol distribution in MCF-7 cells and in MDA-MB-231 cells. However, the effects that we observed were dependent on the cell line. In MCF-7 cells, both apolipoproteins appear to reduce or limit cholesterol transfer to the plasma membrane. However, in MDA-MB-231 cells, the reverse effect was observed. This important observation combined with the very different effects of apolipoproteins on cellular proliferation and migration potential in the two cell lines suggest that these cell types present with intrinsic cholesterol metabolism differences. In fact, while free cholesterol levels appear to be very similar (**Figure 3A**), we observed a trend toward an increased in cholesteryl ester in MDA-MB-231. This finding is consistent with previous studies that have identified increased intratumoral accumulation of cholesteryl ester in the aggressive triple negative [27] and correlated with increased cellular proliferation. Taken together, these data suggest that a modulation of cholesterol metabolism will have more significant effects in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells. Data from the Panel of 60 Diverse Human Cancer Cell Lines (NCI-60) used by the Developmental Therapeutics Program of the U.S. National Cancer Institute also suggest important differences in the expression of two important proteins involved in the regulation of cholesterol efflux. While ABCA1 mRNA levels appears to be more elevated in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells, the reverse is observed for ABCG1. This observation is important since ABCA1 expression is important for the lipid-association of apoA-I (and probably apoE) in other cell types such as the hepatocyte [28]. On the other hand, ABCG1 is more important for cholesterol efflux to HDL lipoproteins [29]. This observation is

important and may explain the increased transfer of cholesterol to the plasma membrane in MDA-MB-231. This transfer may be inefficient in MCF-7 leading to intracellular accumulation of free cholesterol.

Caveolin-1 is a protein that has been extensively characterized [30, 31] and was shown to play an important role in the regulation of various signaling pathways associated with cancer progression [32]. In MDA-MB-231, an increased localization at the plasma membrane may be associated with reduced signaling via various pathways such the MAPK and PI3kinase pathways. The latter pathways are important since they are known to regulate proliferation and migration of MDA-MB-231 cells. Therefore, increased plasma membrane localization of caveolin-1 may inhibit signaling via these pathways and reduce proliferation in our model MDA-MB-231 cells.

In MCF-7 cells, apoA-I and apoE expression was associated with increased proliferation and migration of these cells. Furthermore, we also show that these apolipoproteins facilitate the EMT process. It is possible that increased signaling via TGF β is involved in this pathway. Our data also suggest that increased caveolin-1 expression may be associated with increased proliferation of this cell line. Contrary to MDA-MB-231 cells, MCF-7 cells express the estrogen receptor (ER), and studies have demonstrated that caveolin-1 can potentiate signalization via ER [33]. The ER signaling pathway may also promote the EMT process as previously observed [34].

Our data also show important differences in term of sterol content for these two cell lines. It appears that in MCF-7 cells, most of the sterol population is represented by cholesterol. By contrast, in MDA-MB-231, desmosterol and phytosterols also represent a significant proportion of the sterol content. Importantly, MDA-MB-231 cells also contain significant levels of oxysterols. The levels of these oxysterols is increased as a whole in MDA-MB-231 cells expressing apoA-I in comparison to control MDA-MB-231 cells. Importantly, these oxysterols

have been shown to act as ligands for the activation of the nuclear receptors LXR [35]. These nuclear receptors play an important role in the regulation of cholesterol metabolism. Specifically, *ABCG1* is an important target gene of LXR, and we show that its mRNA levels are upregulated by apoA-I. In particular, 27- and 24-hydroxycholesterol are known activators of LXR α and LXR β [35]. However, other pathways are also regulated by these nuclear receptors. They include cell cycle regulatory pathways (decreased Skp2, cyclin A2, cyclin D1, increased p53), which allow a reduction in cellular proliferation of cancer cells [36]. Synthetic and natural activators have been used with success to limit cancer progression [36, 37]. Another endogenously produced activator of LXR α has been recently identified and shown to lead to lethal autophagy in cancer cells [38]. However, studies with 27- and 25-hydroxycholesterol have also shown that these oxysterols can act as selective estrogen receptor modulators. Therefore, depending on the type of oxysterol and the type of tumor, different profiles of sterols may be observed and may have different effects on the tumoral cells. For MCF-7 cells, it cannot be excluded that local increases in 27- and/or 25-hydroxycholesterol could activate ER and promote proliferation and migration of cells expressing apoA-I and apoE.

Our data also show that in MDA-MB-231 cells expressing apoA-I or apoE, we observed an important compensatory mechanism regarding the metabolism of cholesterol. If apoA-I and apoE are effective at promoting cholesterol efflux from the cells, it is expected that these cell lines will upregulate the transcription of genes responsible for uptake and synthesis of cholesterol. In agreement with this hypothesis, we observed increased mRNA levels of SRB1, VLDLR, LDLR, and HMGCR in MDA-MB-231 cells expressing apoA-I or apoE. On the contrary, if cholesterol efflux is inefficient, we should not observe any major change as is the case for MCF-7 cells. Taken together, these data suggest that apoA-I and apoE can modulate cholesterol metabolism in MDA-MB-231, probably by increasing cholesterol flux. However,

in MCF-7, these apolipoproteins cannot and their expression may further limit the intracellular flux of cholesterol.

Interestingly, we have also examined the importance of apoA-I and apoE in patients with different types of tumors (**Figure 11AB**). While apoA-I does not appear to have any effect on any adverse event (e.g., relapse, metastases) in patients carrying either basal-like or luminal A tumors, increased expression levels of apoE is associated with improved survival in patients with basal-like tumors (HR = 0,67 [0,52 – 0,87]) but with reduced survival in patients with luminal A tumors (HR = 1,46 [1,18 – 1,80]). For apoE, these observations are consistent with the present study in which we show that apoE limits proliferation and migration of MDA-MB-231 cells but increase proliferation and migration of MCF-7 cells. For apoA-I, its corresponding gene is found to be highly methylated in tissues other than the liver and the intestine, and it may therefore be difficult to detect any expression in the mammary tissue as shown in **Figure 1A**.

In conclusion, our study shows that effective modulation of cholesterol metabolism can limit cancer cell proliferation and migration. Interestingly, modulation of cholesterol metabolism by apoA-I and apoE is very effective in the triple negative cell line MDA-MBA-231 and may also improve treatment and survival of patients carrying these types of tumors.

Acknowledgement: JLGP was supported by Le Studium (Région Centre-Val de Loire, France). PGF was supported by grants from INCa PLBio (2018-145), the Lipids ARD2020-Biodrug project (Région Centre-Val de Loire, France), La Ligue contre le Cancer (Indre et Loire, Loir et Cher, and Vienne), by an Academic Research Grant from the Région Centre-Val de Loire (France) and by the Canceropole Grand-Ouest (Mature project).

References

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM: **ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.** *BMJ* 2000, **321**(7261):624-628.
2. Hilakivi-Clarke L, Wang C, Kalil M, Riggins R, Pestell RG: **Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2004, **11**(4):603-622.
3. Moorman PG, Hulka BS, Hiatt RA, Krieger N, Newman B, Vogelman JH, Orentreich N: **Association between high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer varies by menopausal status.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998, **7**(6):483-488.
4. Kim Y, Park SK, Han W, Kim DH, Hong YC, Ha EH, Ahn SH, Noh DY, Kang D, Yoo KY: **Serum high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer risk by menopausal status, body mass index, and hormonal receptor in Korea.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(2):508-515.
5. Cauley JA, Zmuda JM, Lui LY, Hillier TA, Ness RB, Stone KL, Cummings SR, Bauer DC: **Lipid-lowering drug use and breast cancer in older women: a prospective study.** *J Womens Health (Larchmt)* 2003, **12**(8):749-756.
6. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, Sotgia F, Lisanti MP, Frank PG: **Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer.** *Am J Pathol* 2011, **178**(1):402-412.
7. Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M: **Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae.** *JBiolChem* 1997, **272**(20):13242-13249.
8. Cao WM, Murao K, Imachi H, Yu X, Abe H, Yamauchi A, Niimi M, Miyauchi A, Wong NC, Ishida T: **A mutant high-density lipoprotein receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2004, **64**(4):1515-1521.
9. Danilo C, Gutierrez-Pajares JL, Mainieri MA, Mercier I, Lisanti MP, Frank PG: **Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development.** *Breast Cancer Res* 2013, **15**(5):R87.
10. Major AS, Dove DE, Ishiguro H, Su YR, Brown AM, Liu L, Carter KJ, Linton MF, Fazio S: **Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (ApoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in ApoAI((-/-)) mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21**(11):1790-1795.
11. Zanotti I, Pedrelli M, Poti F, Stomeo G, Gomaraschi M, Calabresi L, Bernini F: **Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, **31**(1):74-80.
12. Bonuccelli G, Tsigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE *et al*: **Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism.** *Cell Cycle* 2010, **9**(17):3506-3514.
13. Bligh EG, Dyer WJ: **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 1959, **37**(8):911-917.
14. Pinault M, Guimaraes C, Ben Hassen C, Gutierrez-Pajares JL, Chevalier S, Goupille C, Bernard-Savary P, Frank PG: **Development of a novel HPTLC-based method for the**

simultaneous quantification of clinically relevant lipids from cells and tissue extracts. *bioRxiv* 2019.

15. Williams TM, Sotgia F, Lee H, Hassan G, Di Vizio D, Bonuccelli G, Capozza F, Mercier I, Rui H, Pestell RG *et al*: **Stromal and epithelial caveolin-1 both confer a protective effect against mammary hyperplasia and tumorigenesis: caveolin-1 antagonizes cyclin d1 function in mammary epithelial cells.** *Am J Pathol* 2006, **169**(5):1784-1801.
16. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(19):10869-10874.
17. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L *et al*: **The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms.** *BMC Genomics* 2006, **7**:96.
18. Jezequel P, Campone M, Gouraud W, Guerin-Charbonnel C, Leux C, Ricolleau G, Campion L: **bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2012, **131**(3):765-775.
19. Jezequel P, Frenel JS, Campion L, Guerin-Charbonnel C, Gouraud W, Ricolleau G, Campone M: **bc-GenExMiner 3.0: new mining module computes breast cancer gene expression correlation analyses.** *Database (Oxford)* 2013, **2013**:bas060.
20. Institute TNC: **TCGA Research Network.** In.
21. Shankavaram UT, Varma S, Kane D, Sunshine M, Chary KK, Reinhold WC, Pommier Y, Weinstein JN: **CellMiner: a relational database and query tool for the NCI-60 cancer cell lines.** *BMC Genomics* 2009, **10**:277.
22. Reinhold WC, Sunshine M, Liu H, Varma S, Kohn KW, Morris J, Doroshow J, Pommier Y: **CellMiner: a web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set.** *Cancer Res* 2012, **72**(14):3499-3511.
23. Lin CY, Vedin LL, Steffensen KR: **The emerging roles of liver X receptors and their ligands in cancer.** *Expert Opin Ther Targets* 2016, **20**(1):61-71.
24. Cooper RA: **Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells.** *J Supramol Struct* 1978, **8**(4):413-430.
25. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL: **Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010, **15**(2):117-134.
26. Xu J, Lamouille S, Derynck R: **TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition.** *Cell Res* 2009, **19**(2):156-172.
27. de Gonzalo-Calvo D, Lopez-Vilaro L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vazquez T, Escuin D, Badimon L, Barnadas A, Lerma E, Llorente-Cortes V: **Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study.** *BMC Cancer* 2015, **15**:460.
28. Maric J, Kiss RS, Franklin V, Marcel YL: **Intracellular lipidation of newly synthesized apolipoprotein A-I in primary murine hepatocytes.** *J Biol Chem* 2005, **280**(48):39942-39949.
29. Phillips MC: **Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux.** *J Biol Chem* 2014, **289**(35):24020-24029.
30. Mercier I, Lisanti MP: **Caveolin-1 and breast cancer: a new clinical perspective.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **729**:83-94.

31. Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F: **Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth.** *Semin Cancer Biol* 2014, **25**:47-60.
32. Boscher C, Nabi IR: **Caveolin-1: role in cell signaling.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **729**:29-50.
33. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP: **Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha.** *J Biol Chem* 1999, **274**(47):33551-33556.
34. Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z, Afratis N, Karamanou K, Aletras AJ, Moustakas A, Theocharis AD, Karamanos NK: **Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells.** *Matrix Biol* 2015, **43**:42-60.
35. Mutemberezi V, Guillemot-Legris O, Muccioli GG: **Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators.** *Prog Lipid Res* 2016, **64**:152-169.
36. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR: **The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells.** *Carcinogenesis* 2009, **30**(4):575-579.
37. El Roz A, Bard JM, Huvelin JM, Nazih H: **LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis.** *Anticancer Res* 2012, **32**(7):3007-3013.
38. Poirot M, Silvente-Poirot S: **The tumor-suppressor cholesterol metabolite, dendrogin A, is a new class of LXR modulator activating lethal autophagy in cancers.** *Biochem Pharmacol* 2018.

Table

Table 1: Primers used for the qPCR and their sequence

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
ABCA1	ACCCACCCTATGAACAACATGA	GAGTCGGGTAACGGAAACAGG
ABCG1	CAGGAAGATTAGACACTGTGG	GAAAGGGGAATGGAGAGAAGA
ApoA-I	AGCTTGCTGAAGGTGGAGGT	ATCGAGTGAAGGACCTGGC
ApoE	GGTCGCTTTTGGGATTACCT	CATGGTCTCGTCCATCAGC
Cav1	ACCCACTCTTTGAAGCTGTTG	GAACCTGAAATTGGCACCAGG
E-cadhérine	TACGCCTGGGACTCCACCTA	CCAGAAACGGAGGCCTGAT
ERα	TGATGAAAGGTGGGATACGA	AAGGTTGGCAGCTCTCATGT
ERβ	TCCATGCGCCTGGCTAAC	CAGATGTTCCATGCCCTTGTTA
Fibronectine	CATCGAGCGGATCTGGCCC	GCAGCTGACTCCGTTGCCCA
GAPDH	TGGTCTCCTCTGACTTCAACA	AGCCAAATTCGTTGTCATACC
Her2	CTGCACCCACTCCTGTGTGCACCTG	CTGCCGTCGCTTGATGAGGATC
HMGCR	GTTCGGTGGCCTCTAGTGAG	GCATTGAAAAAGTCTTGACAAC
LDLR	GATAGTGACAATGTCTCACCAAG	CCTCACGCTACTGGGCTTC
LXRα	AGGGCTGCAAGGGATTCTTCC	TCTGACAGCACACACTCCTCCC
MMP1	CCTCGCTGGGAGCAAACA	TTGGCAAATCTGGCGTGTA
MMP2	CGTCTGTCCAGGATGACATC	ATGTCAGGAGAGGCCCCATA
MMP7	GCTGGCTCATGCCTTTGC	TCCTCATCGAAGTGAGCATCTC
MMP9	TTCCAGTACCGAGAGAAAGCCTAT	GGTCACGTAGCCCACTTGGT
MT1-MMP	CATGGGCAGCGATGAAGTCT	CCAGTATTTGTTCCCCTGTAGAAGTA
N-cadhérine	GGCGTTATGTGTGTATCTTCACTG	GCAGGCTCACTGCTCTCATA
SNAIL2	AGACCCTGGTTGCTTCAAGGA	CTCAGATTTGACCTGTCTGCAAA
SRB1	CGGCTCGGAGAGCGACTAC	GGGCTTATTCTCCATGATCACC
TIMP1	CGCTGACATCCGGTTCGT	TGTGGAAGTATCCGCAGACACT
TIMP2	GGGCACCAGGCCAAGTT	CGCACAGGAGCCATCACT
Vimentine	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT	GAGAAATCCTGCTCTCCTCGC
VLDLR	GGAGAAGATGAAGAAAACGTGG	CATCCTGGCCATTGCATAC
ZEB1	GAAAATGAGCAAAACCATGATCCT	CCCTGCCTCTGGTCCTCTTC

Figure legends

Figure 1: mRNA Levels in Various Types of Tumors and their Corresponding Normal Tissue. This figure shows RPKM mRNASeq expression profiles for each TCGA disease chart. The results are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>. This graphical presentation was obtained using the Firebrowse tool. Results for the following tissues (n= tumor samples; normal samples) are presented: following tissue BLCA: Bladder Urothelial Carcinoma (n=49 ; 11); BRCA: Breast invasive carcinoma (n=699 ; 88); COAD: Colon adenocarcinoma (n=10); COADREAD: Colorectal adenocarcinoma (n=75); ESCA: Esophageal carcinoma (n=185; 13); HNSC: Head and Neck squamous cell carcinoma (n= 236 ; 27); KIPAN: Pan-kidney cohort (KICH+KIRC+KIRP)(n=446; 68); KIRC: Kidney renal clear cell carcinoma (n=433 ; 68); KIRP: Kidney renal papillary cell carcinoma (n=13); LAML: Acute Myeloid Leukemia (n=176); LIHC: Liver hepatocellular carcinoma (n=17 ; 9); LUAD: Lung adenocarcinoma (n=120; 37); LUSC: Lung squamous cell carcinoma (n= 212; 17); OV: Ovarian serous cystadenocarcinoma (n=299); READ: Rectum adenocarcinoma (n=65); STAD: Stomach adenocarcinoma (n=272; 33); STES: Stomach and Esophageal carcinoma (457; 46); THCA: Thyroid carcinoma (n=3); UCEC: Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (n=259; 3). A grey box was drawn to indicate that no normal samples were available for that disease cohort.

A. mRNASeq profiles obtained for *apoA1*.

B. mRNASeq profiles obtained for *apoE*.

Figure 2: mRNA Levels of ApoA-I (A) and ApoE (B) in a Panel of 60 Diverse Human Cancer Cell Lines (NCI-60) used by the Developmental Therapeutics Program of the U.S. National Cancer Institute. mRNA levels were obtained via the CellMiner™, which is a web application available at <https://discover.nci.nih.gov/cellminer/home.do> [21, 22].

Figure 3: ApoA-I and apoE Alter Cholesterol Metabolism in Transfected MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

A. Measurement of cellular cholesterol content (total, free, esterified) in transfected MCF-7 and MDA-MB-231 cells by HPTLC.

Values represents means $\pm$ SD.

B-C. Measurement of sterol content in transfected MCF-7 (B) and MDA-MB-231 (C) cells by gas chromatography (GC).

After lipid extraction and saponification of the cellular extracts, cholesterol, desmosterol, 27-hydroxycholesterol, 22-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, beta-sitosterol, campesterol, and stigmasterol were quantified by GC. Values are means ($\pm$ SD).

D. Visualization of free cholesterol by filipin staining in transfected MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Free cholesterol was detected by fluorescence microscopy (DAPI channel) after cell incubation with filipin.

ns: difference with control not significant.

Figure 4: Membrane Fluidity Measurement.

A. Membrane Fluidity Measurement in MCF-7 cells.

B. Membrane Fluidity Measurement in MDA-MB-231 cells.

Measurement of membrane fluidity was performed using the di-4-ANE probe. Compared with a control condition, an increase in the GP value means that the plasma membrane is more rigid, whereas a decrease in the GP value means that the plasma membrane is more fluid.

ns: difference with control not significant. Significant difference compared to control cells (*P<0.05).

Figure 5: ApoA-I and apoE increase proliferation of MCF-7 but not of MDA-MB-231 cells.

A. Proliferation curve of the different MCF-7 cell lines.

B. Proliferation rate of the different MCF-7 cell lines.

C. Proliferation curve of the different MDA-MB-231 cell lines.

D. Proliferation rate of the different MDA-MB-231 cell lines.

Proliferation was measured by impedance measurements (xCELLigence) in real-time (A and C), and proliferation rate was then determined between the dashed lines for each cell line (C and D).

ns: difference with control not significant. Significant difference compared to control cells (*P<0.05).

Figure 6: ApoA-I and apoE increase migration of MCF-7 cells but decrease that of MDA-MB-231 cells.

A. Migration curve of the different MCF-7 cell lines.

B. Migration rate of the different MCF-7 cell lines.

C. Migration curve of the different MDA-MB-231 cell lines.

D. Migration rate of the different MDA-MB-231 cell lines.

Migration was obtained by creating a gradient of 1 (top well) to 10% (bottom well) serum. Migration was measured by impedance measurements (xCELLigence) in real-time (A and C), and migration rate was then determined between the dashed lines for each cell line (C and D). Significant difference compared to control cells (*P<0.05).

Figure 7: Expression of EMT Markers in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. EMT marker mRNA levels were determined after mRNA isolation from 90% confluent cell cultures. mRNA levels of E-cadherin, vimentin, fibronectin, SNAIL, and ZEB1 were quantified by RT-qPCR. Values are means ($\pm$ SD).

A. Expression of EMT Markers in MCF-7 cells.

B. Expression of EMT Markers in MDA-MB-231 cells.

ns: difference with control not significant. Significant difference compared to control cells (*P<0.05).

Figure 8: TGF β -signaling promote the EMT in MCF-7 cells. EMT marker mRNA levels were determined after mRNA isolation from MCF-7 cells grown in the presence of TGF β for 24 h. mRNA levels of E-cadherin, N-cadherin, fibronectin, SNAIL, ZEB1, vimentin, and SR-BI were quantified by RT-qPCR. Values are means ($\pm$ SD). mRNA were isolated from cells incubated under control conditions (ctrl, no TGF β) or with TGF β (+TGF β) in complete medium were obtained by incubating cells with vehicle alone or 10nM TGF β for 24 h, respectively.

¹ Significant difference compared to control cells (*P<0.05). ² Significant difference compared to non-TGF β -treated cells (*P<0.05)

Figure 9: Alteration in the regulation of cholesterol regulatory response. Cholesterol regulatory gene product mRNA levels were determined after mRNA isolation from 90%

confluent cell cultures. mRNA levels of APOA1, APOE, CAV1, SRB1, VLDLR, LDLR, ABCA1, ABCG1, HMGCR were quantified in MCF-7 cells (A) and MDA-MB-231 cells (B). Significant difference compared to control cells (* $P < 0.05$).

Figure 10: Effect of apoA-I and apoE on tumor formation in vivo. MCF7 cells (5×10^6) were orthotopically injected into the mammary gland fat pad of 9 week-old athymic nude mice implanted with slow release 17β -estradiol pellets (0.36mg/pellet, 60 days). Tumor growth was followed for the next 63 days by bioluminescence (BLI). BLI was used to follow tumor growth after luciferin injection, mice were imaged once a week. For each imaging session, mice received a single intraperitoneal injection of luciferin at 150 mg/kg and held conscious for 10 minutes post-injection ($n = 10$ for MCF-7-GFP and MCF-7-apoE, $n = 12$ for MCF-7-apoA-I). Significant difference compared to control cells (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)

Figure 11: A. Kaplan-Meier Relapse-free survival curves of breast cancer subtypes stratified by low/high apoE gene expression. B. Kaplan-Meier Relapse-free survival curves of breast cancer subtypes stratified by low/high apoE gene expression.

Supplementary Figure 1: Expression of ApoA-I and ApoE in Transfected MCF-7 and MDA-MB-231 Cells.

A. mRNA levels in transfected MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

mRNA levels of apoA-I and apoE were quantified by RT-qPCR.

B and C. Immunofluorescence detection of apoA-I and apoE in transfected MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

ApoA-I and apoE were detected by immunofluorescence using anti-apoA-I and anti-apoE antibodies and visualized by epifluorescence microscopy (scale = 10 μ m).

ns: difference with control not significant. Significant difference compared to control cells (* $P < 0.05$).

Supplementary Figure 2: ApoA-I and apoE increase proliferation of MCF-7 (A) but not of MDA-MB-231 (B) cells as determined by cell counting measurements.

Supplementary Figure 3: Immunostaining of caveolin-1 in MDA-MB-231 cells as evaluated by confocal microscopy.

ns: difference with control not significant. Significant difference compared to control cells (* $P < 0.05$).

Figure 1A

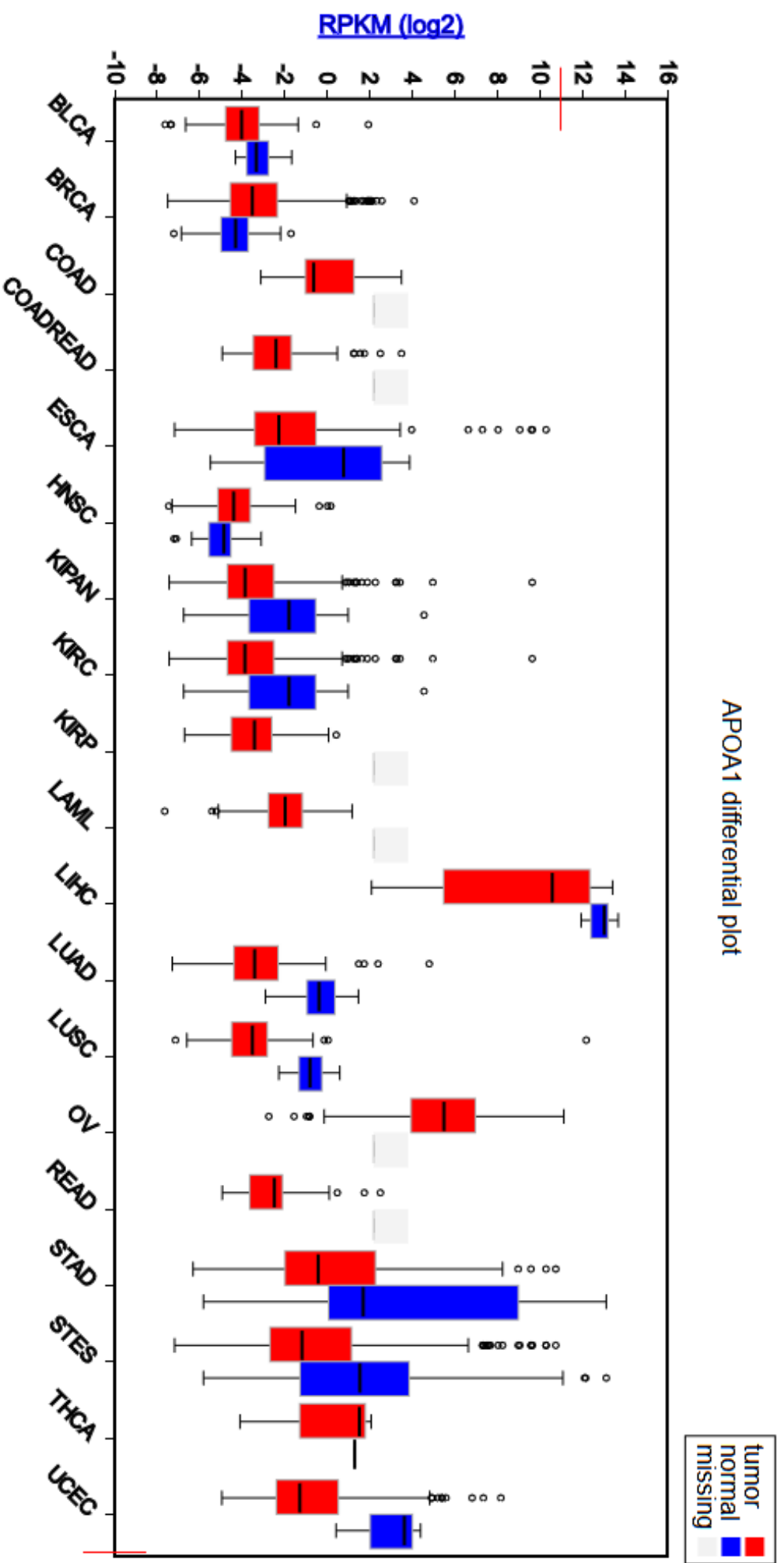
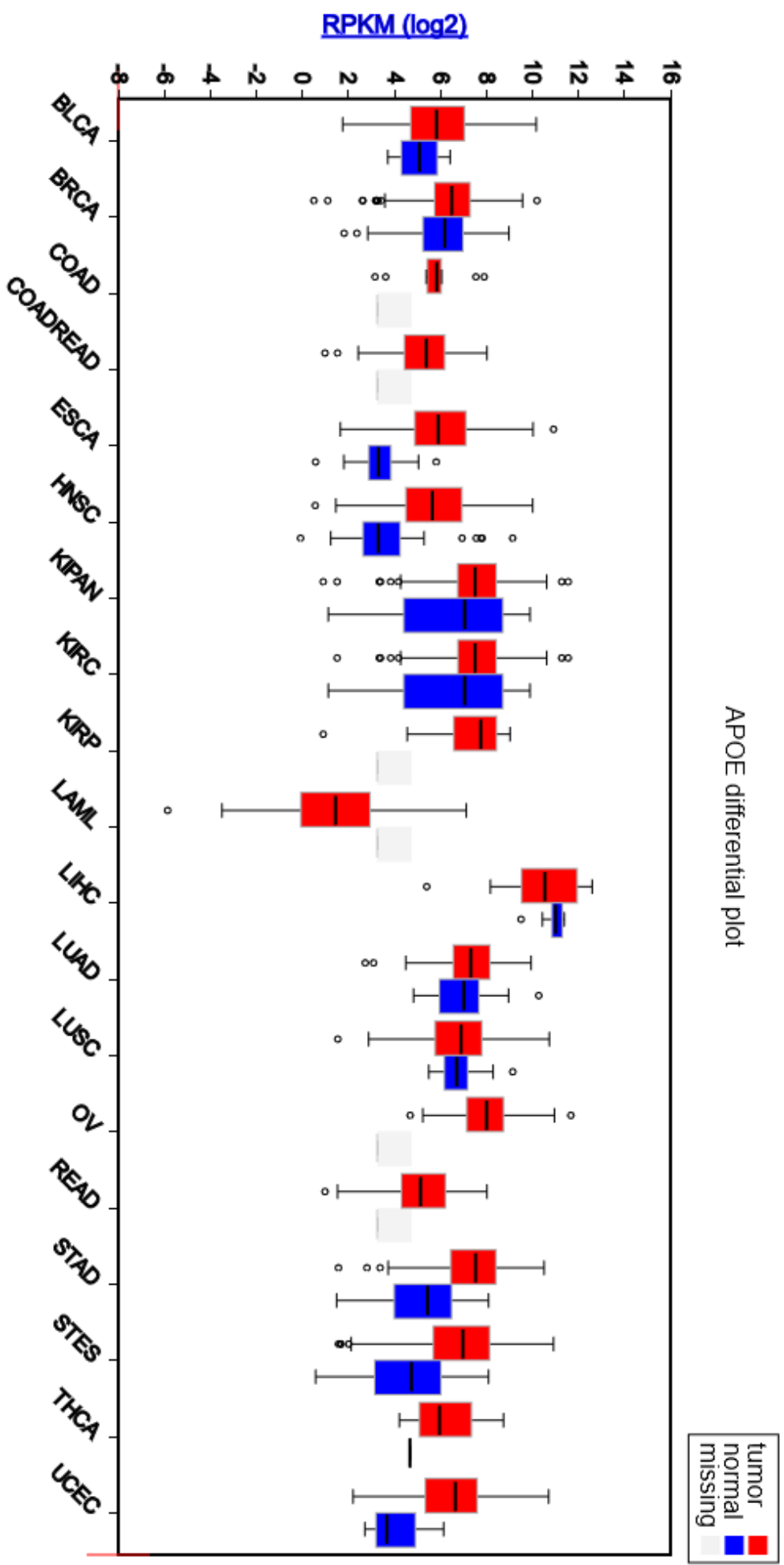
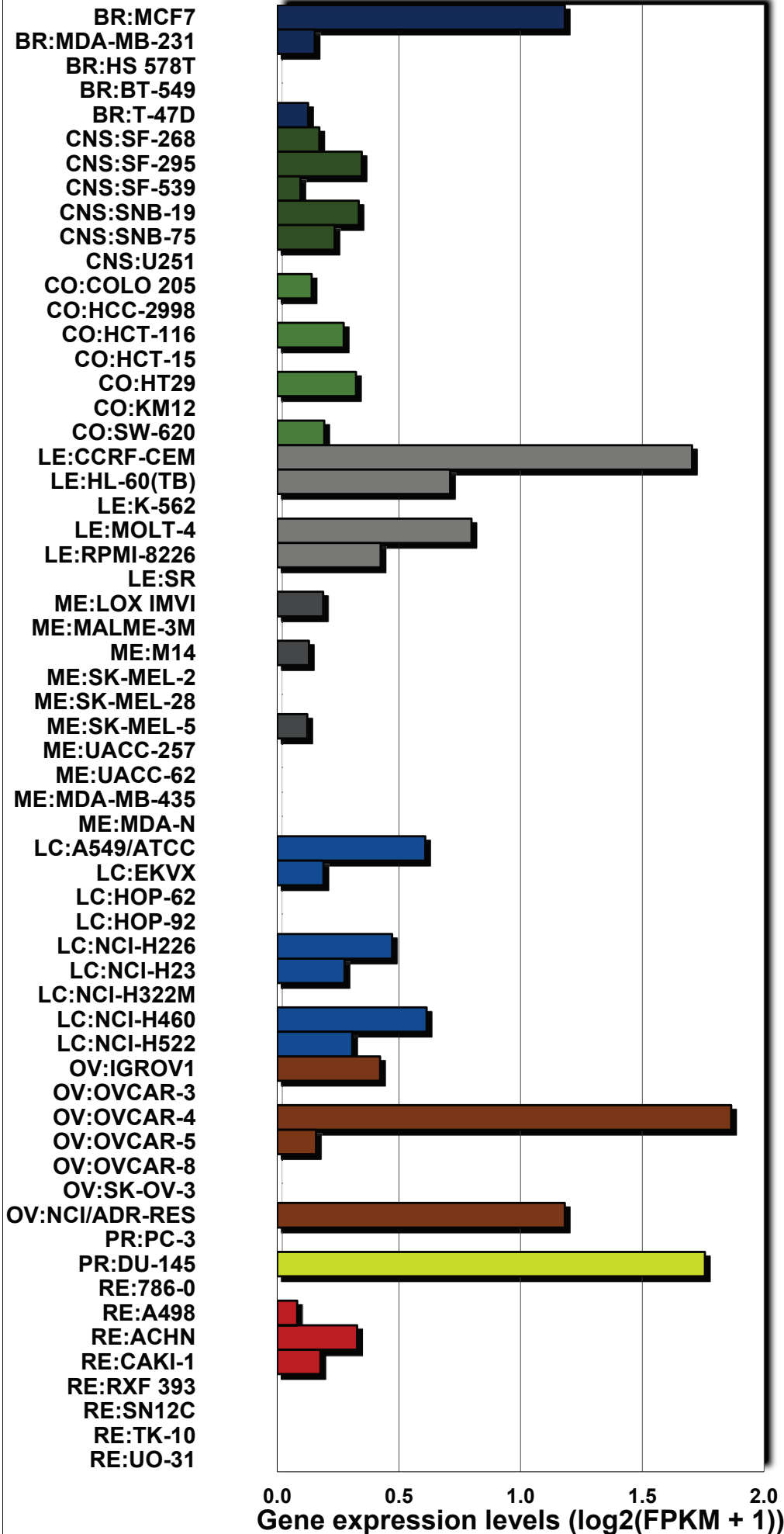


Figure 1B



APOA1

Figure 2A



APOE

Figure 2B

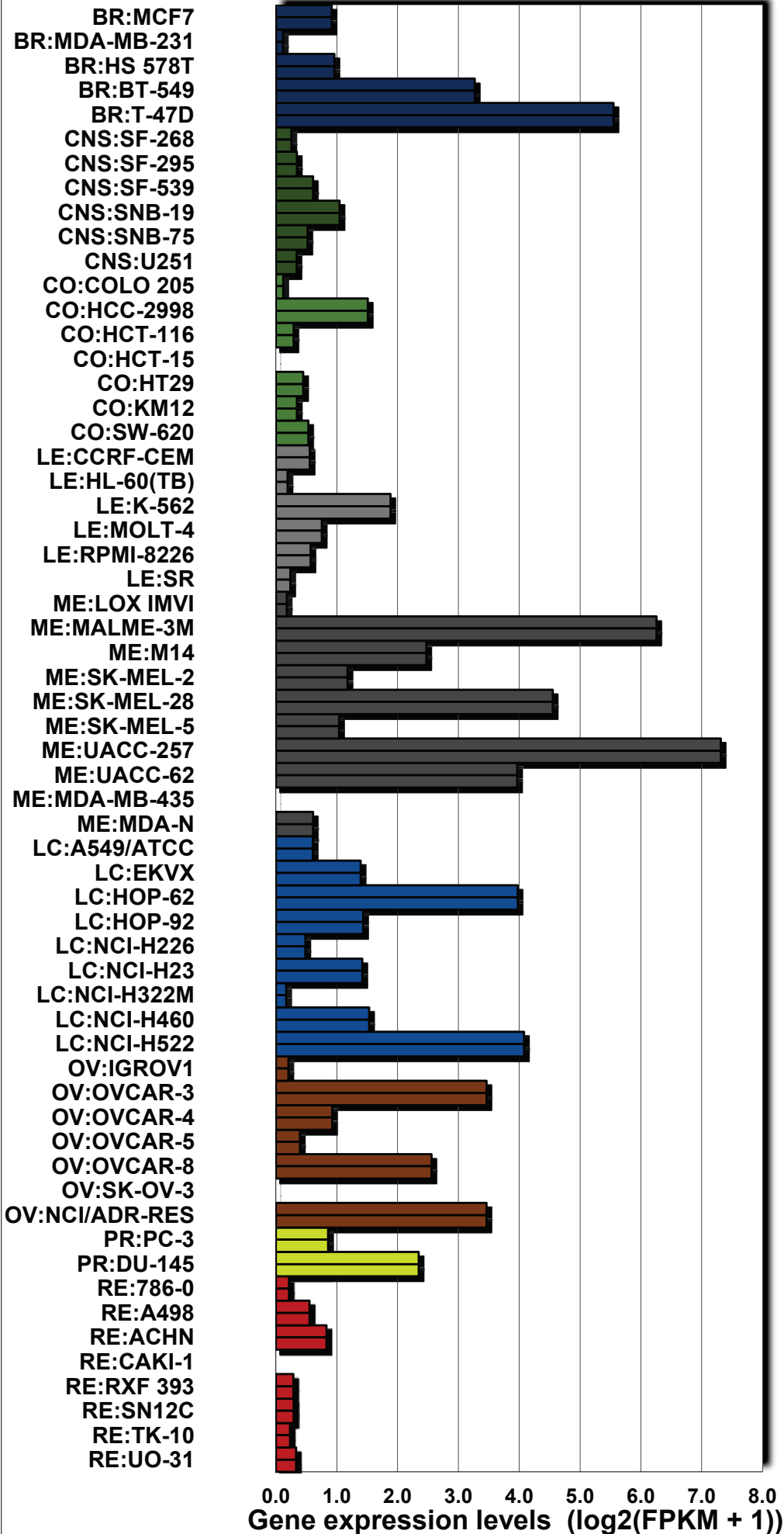


Figure 3A

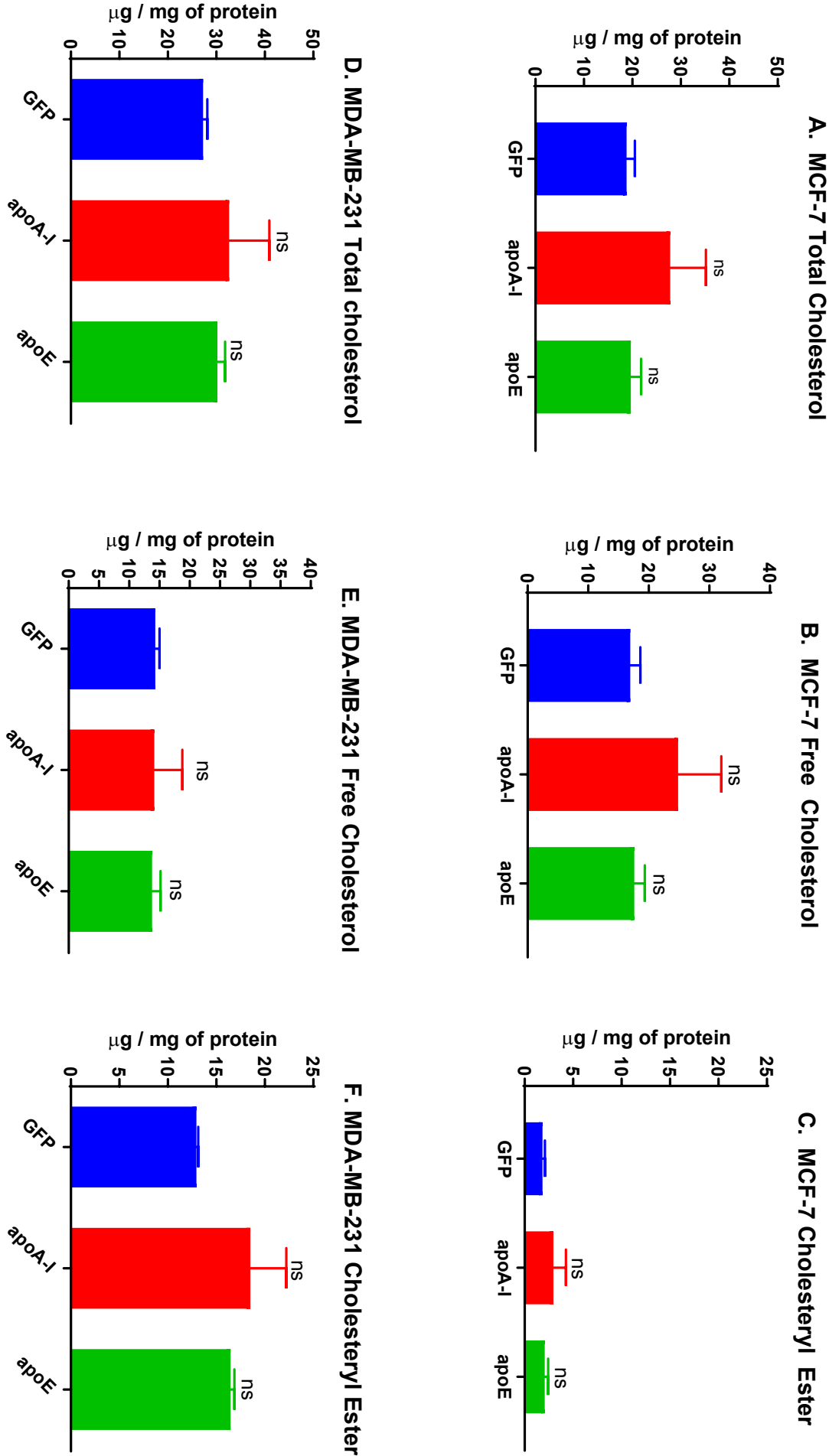


Figure 3B

MCF-7

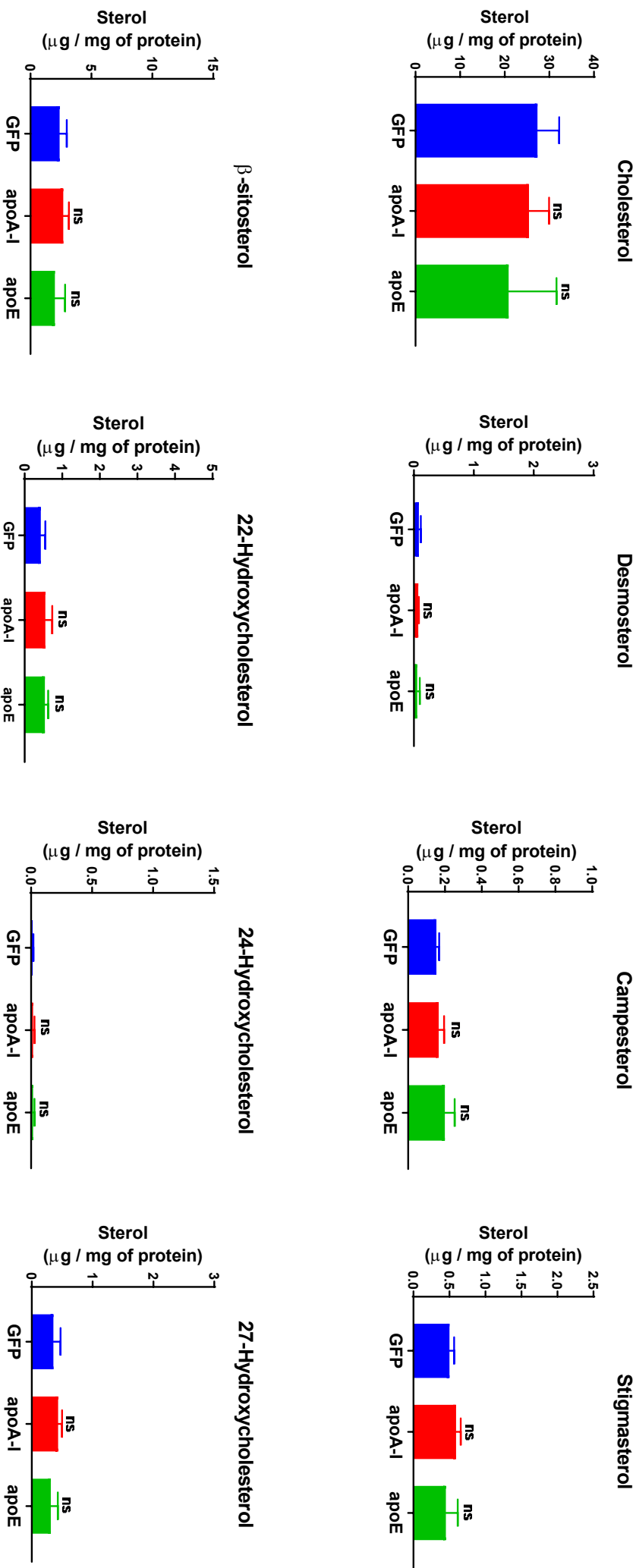
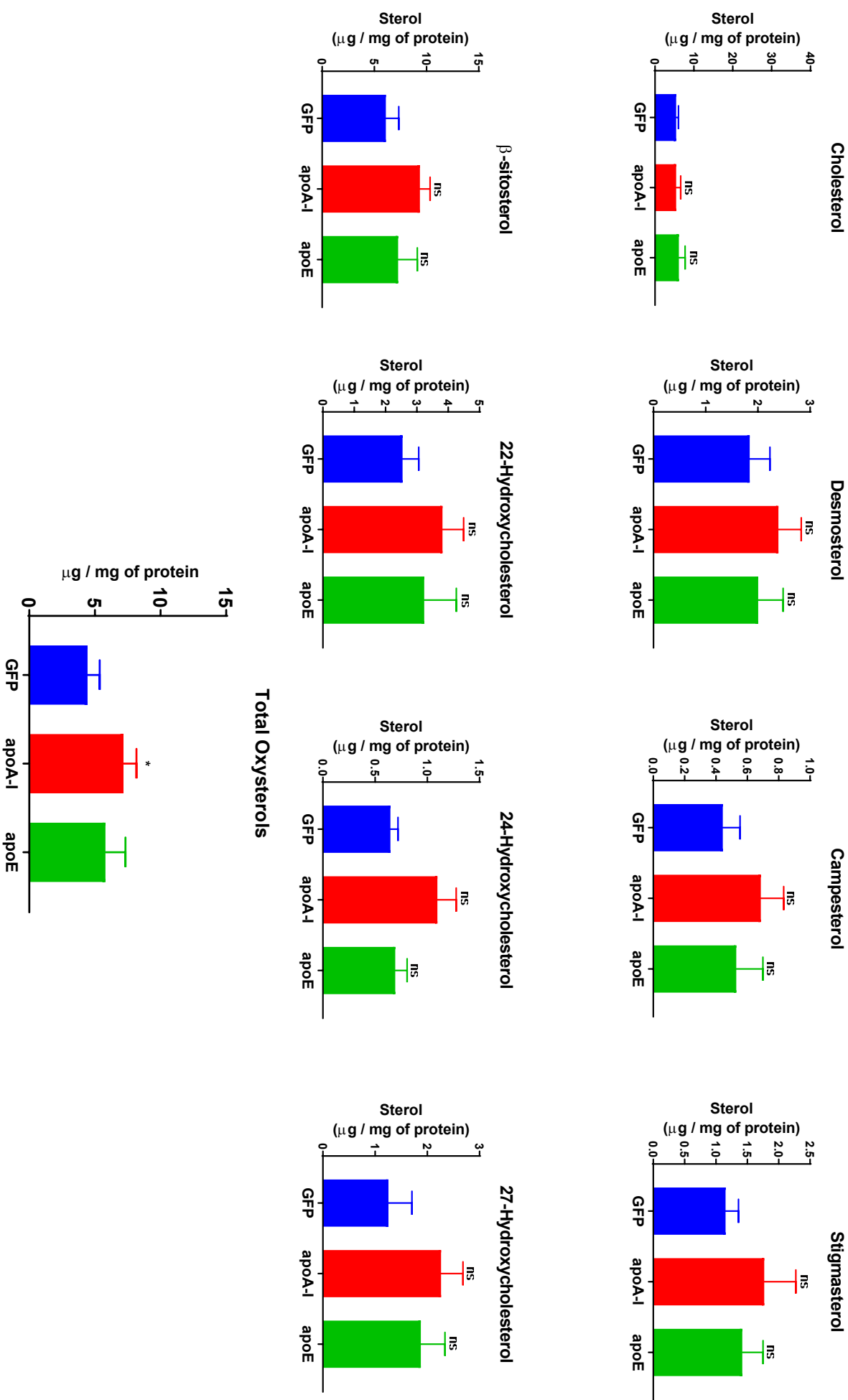


Figure 3C

MDA-MB-231

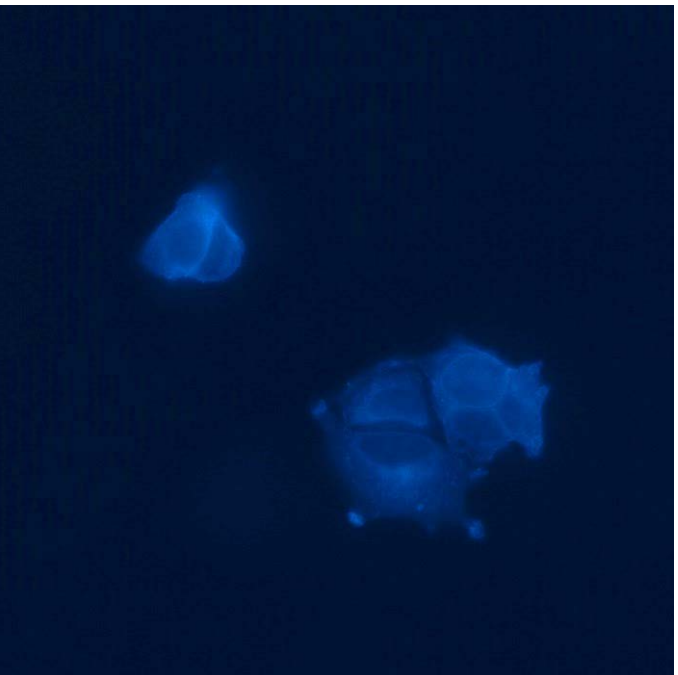


Filipin staining

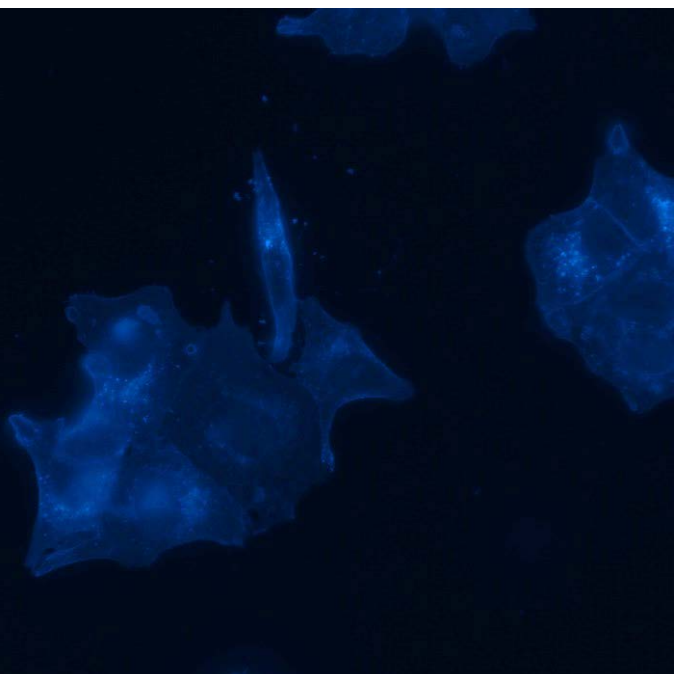
Figure 3D

MCF-7

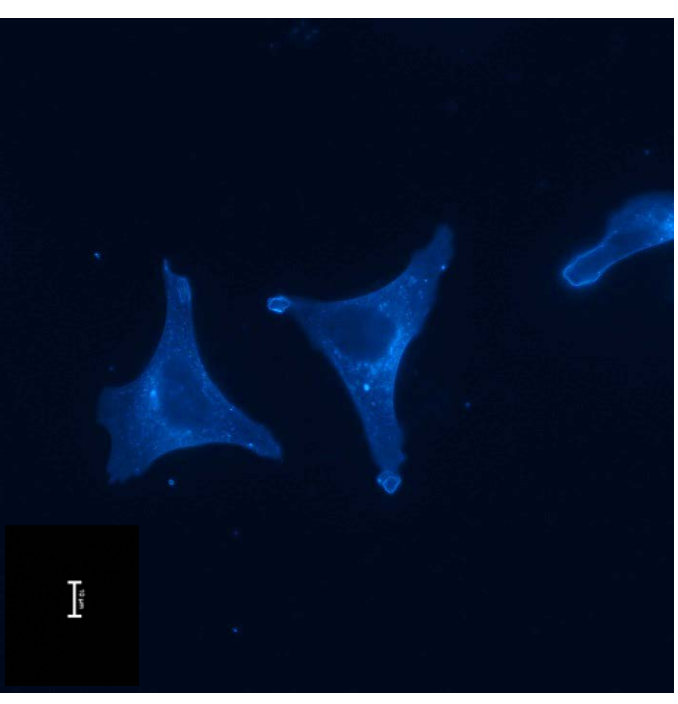
GFP



ApoA-I



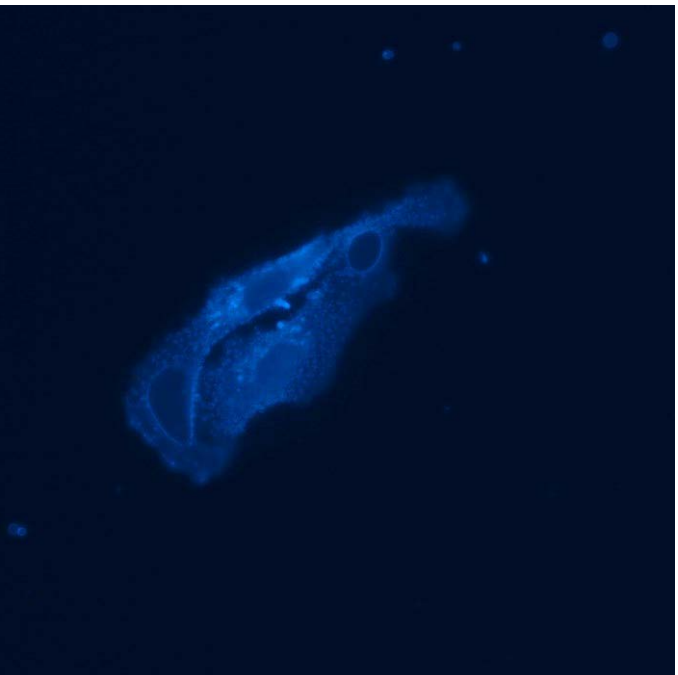
ApoE



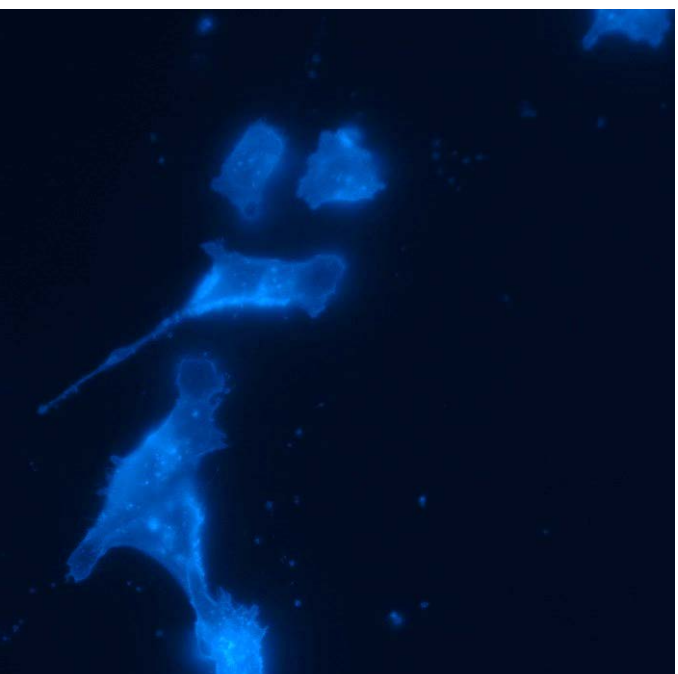
Filipin staining

MDA-MB-231

GFP



ApoA-I



ApoE

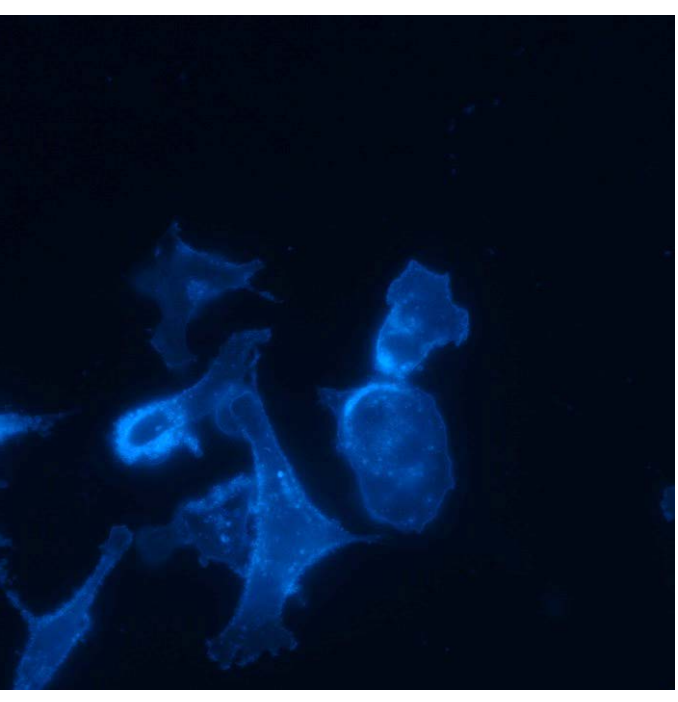


Figure 4

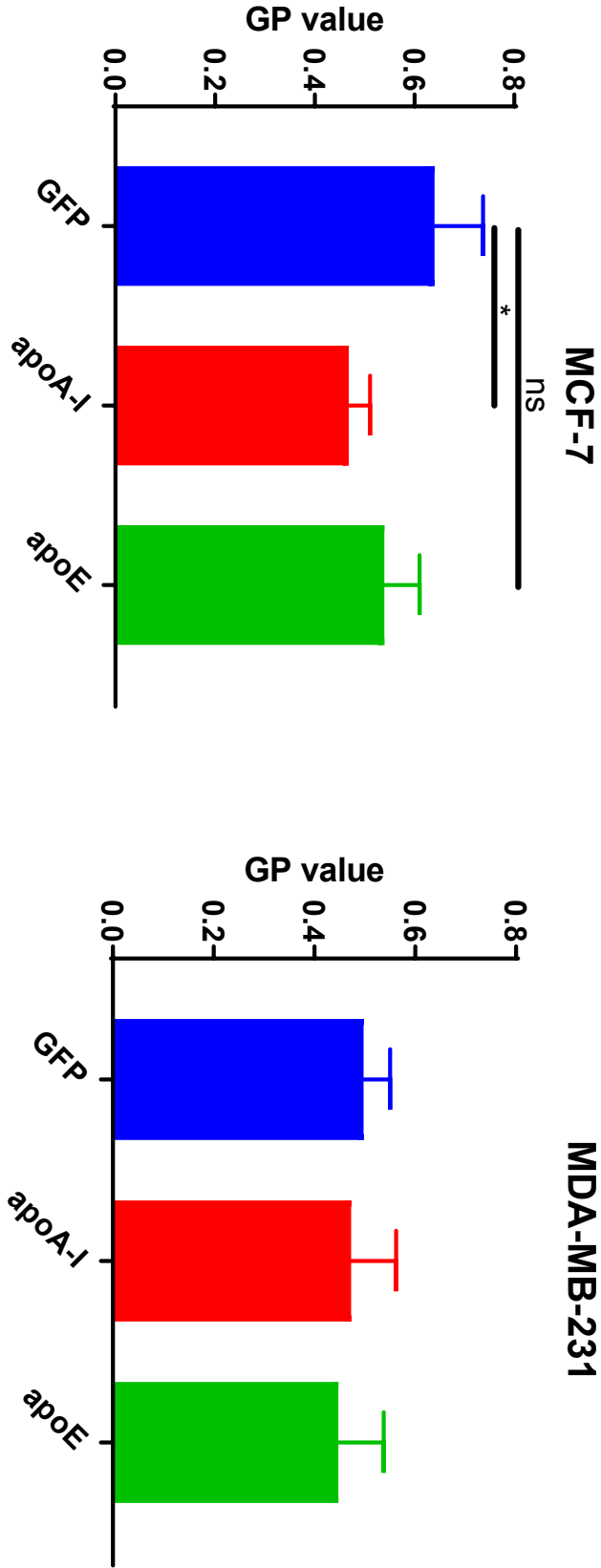
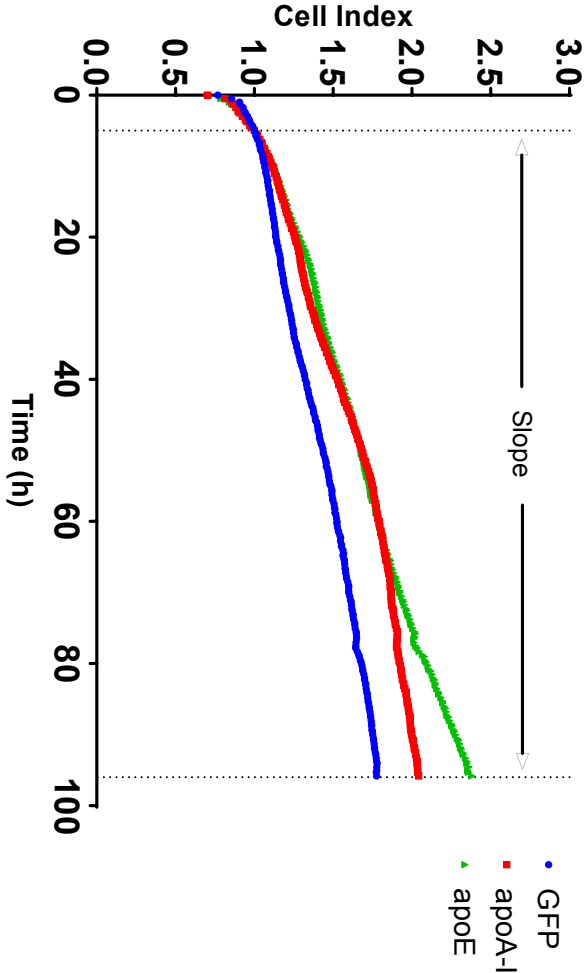
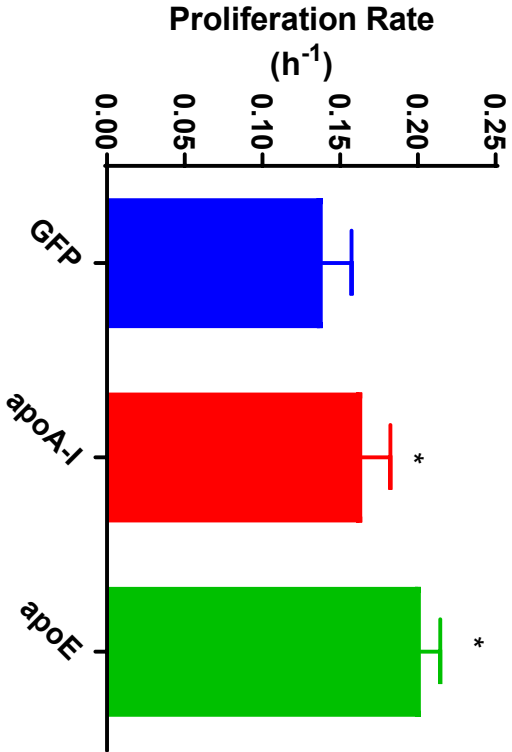


Figure 5

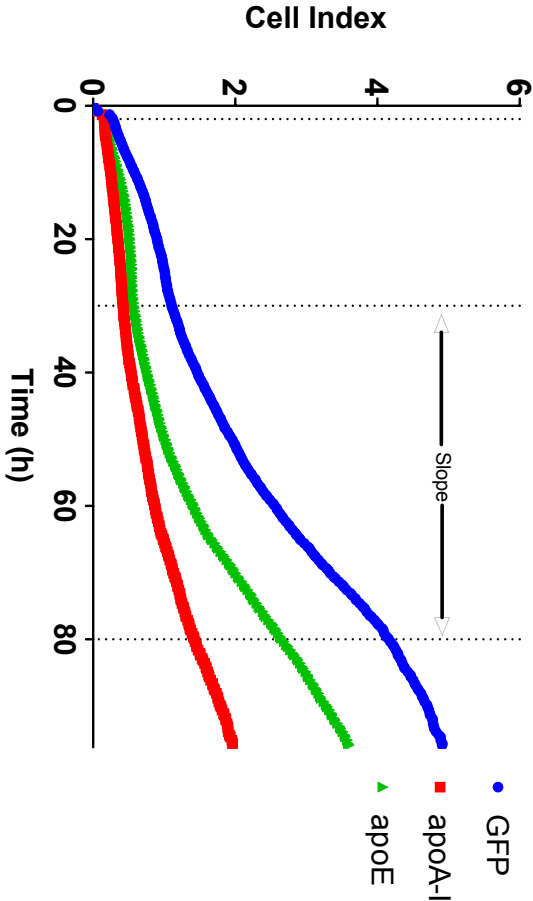
A. MCF-7 Proliferation



B. Rate of Proliferation
MCF-7



C. MDA-MB-231 Proliferation



D. Rate of Proliferation
MDA-MB-231

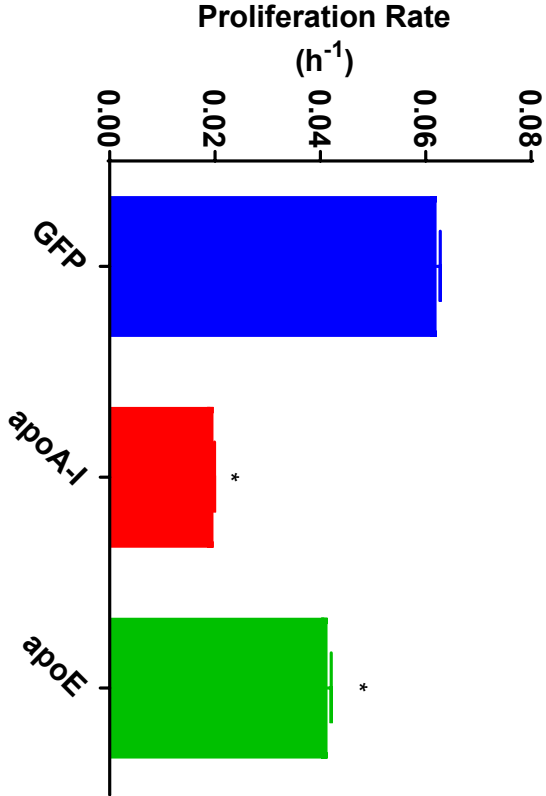
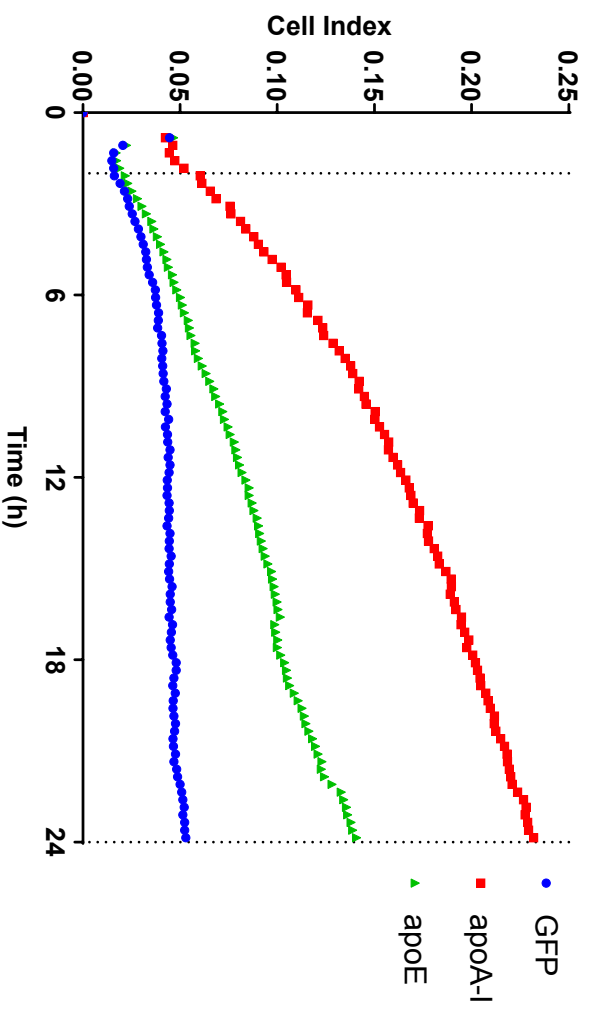
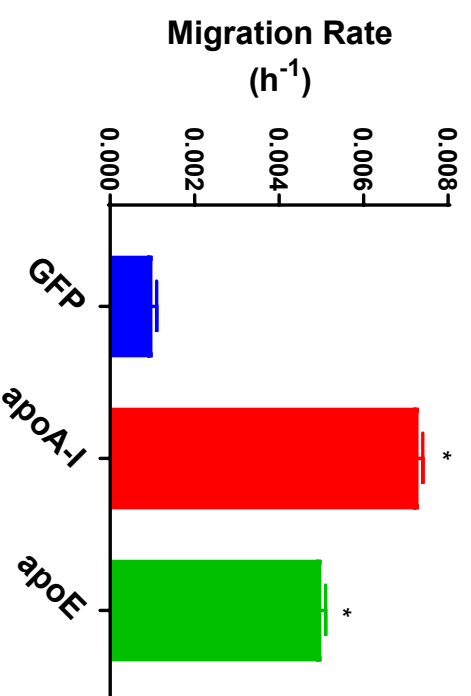


Figure 6

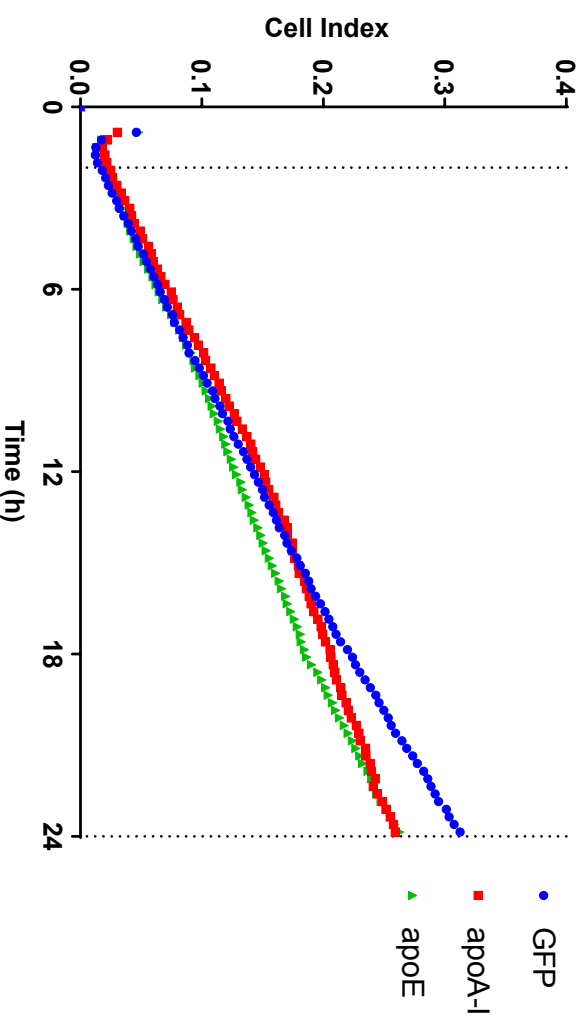
A. MCF-7 Migration



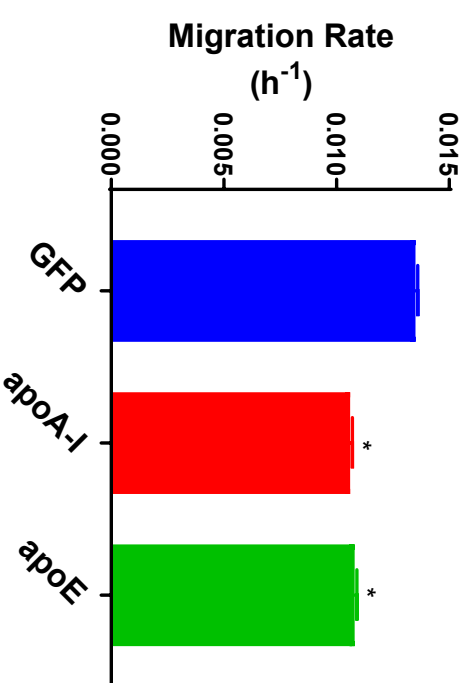
B. Rate of Migration
MCF-7



C. MDA-MB-231 Migration



D. Rate of Migration
MDA-MB-231



A. MCF-7



Figure 8

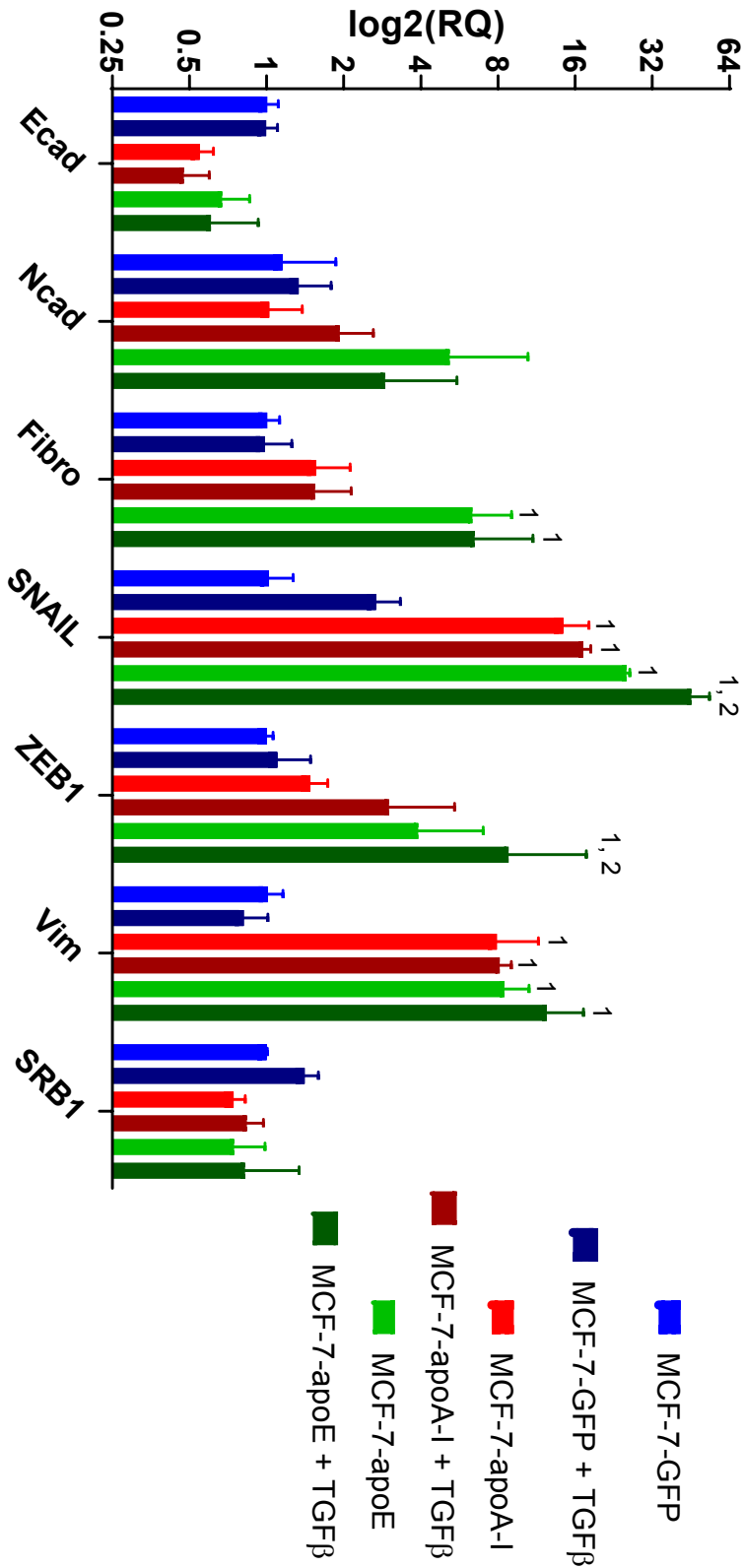


Figure 9

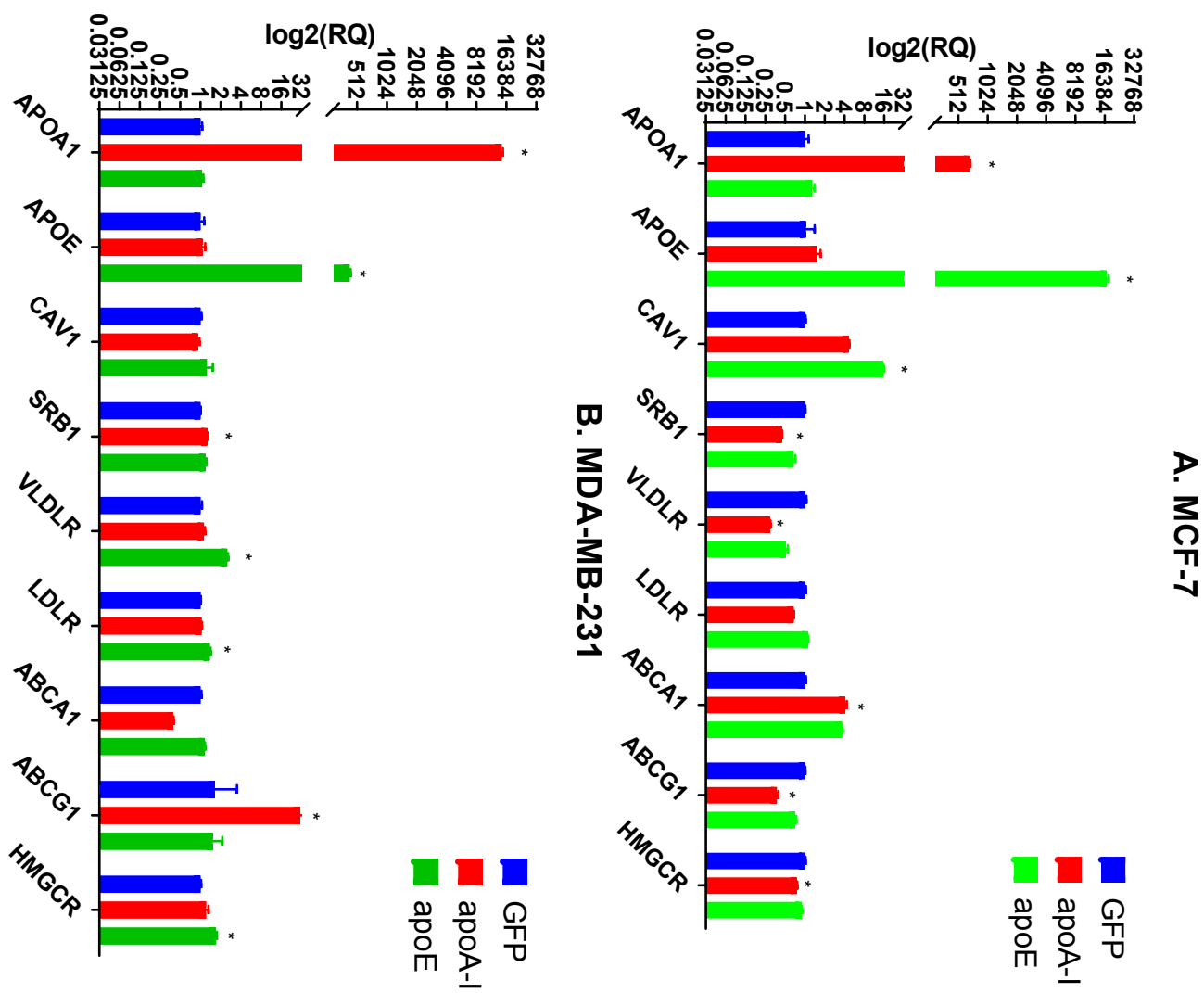


Figure 10

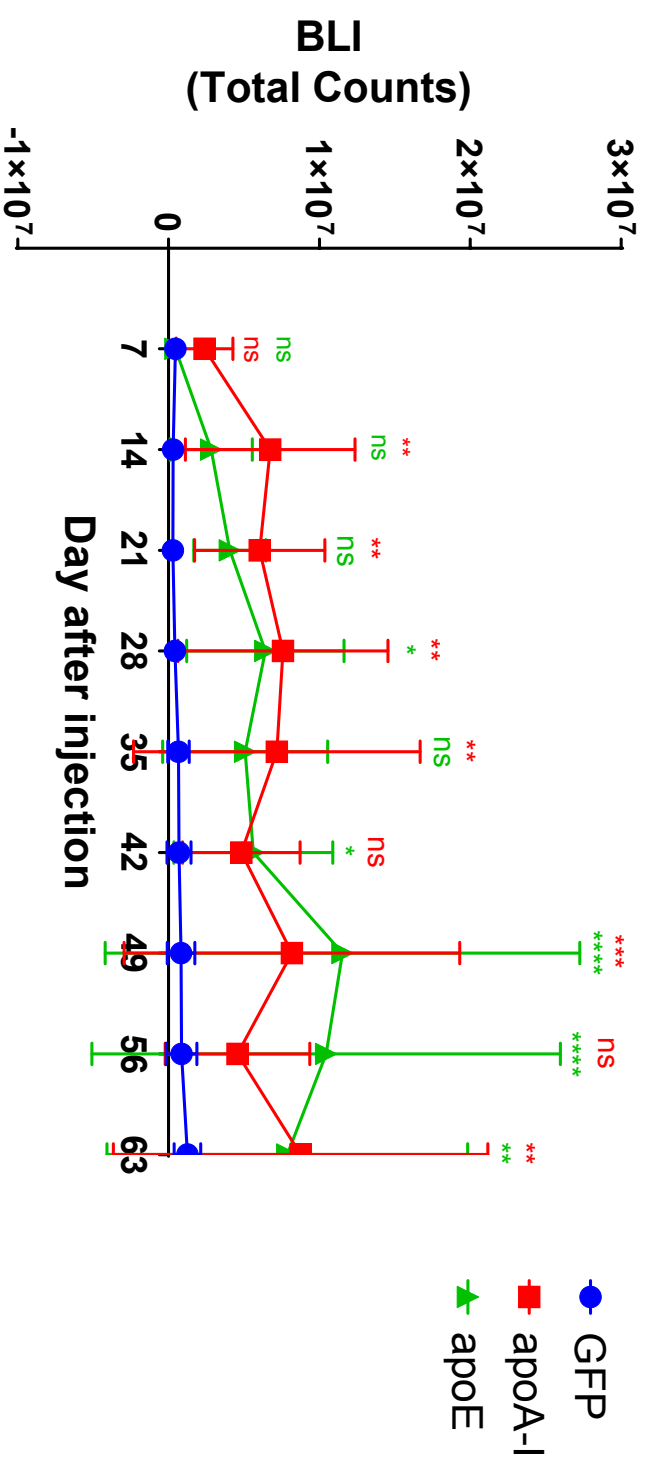


Figure 11A

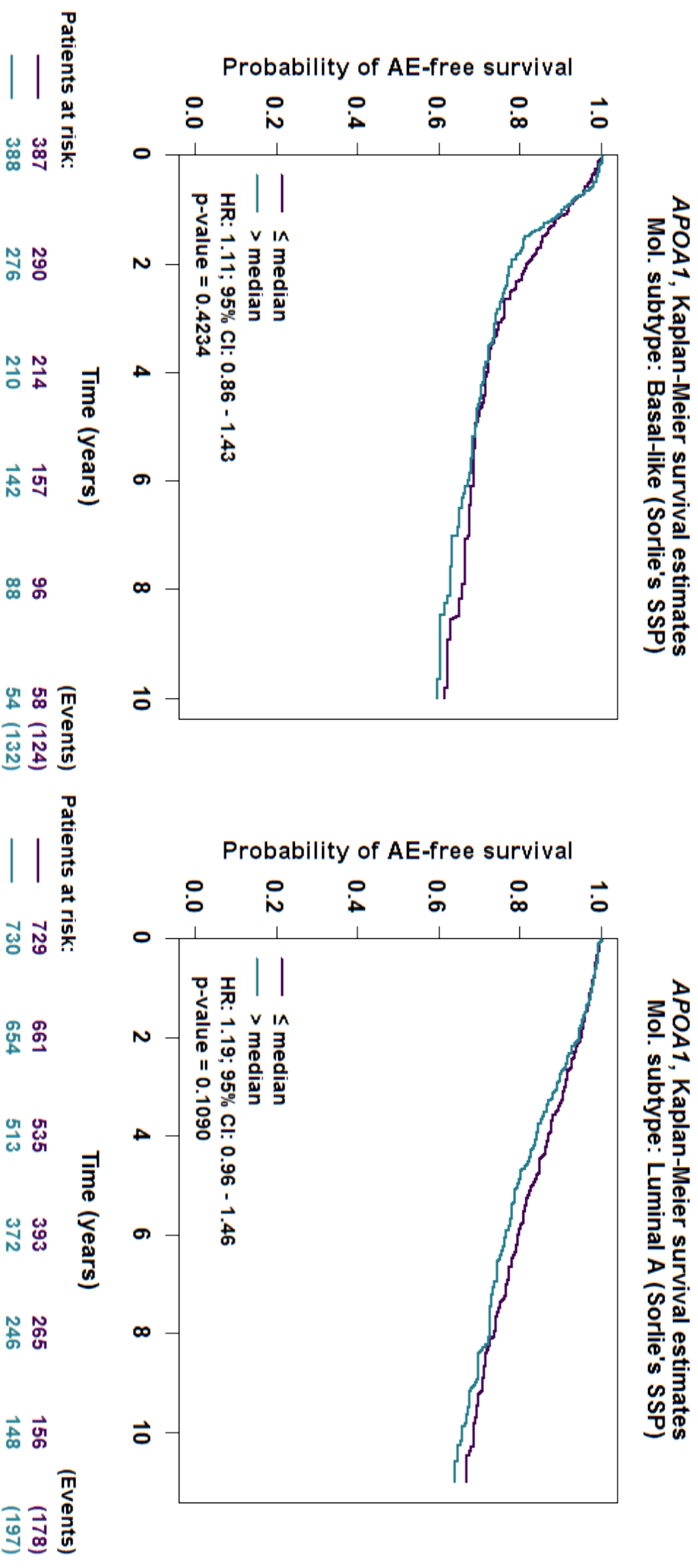
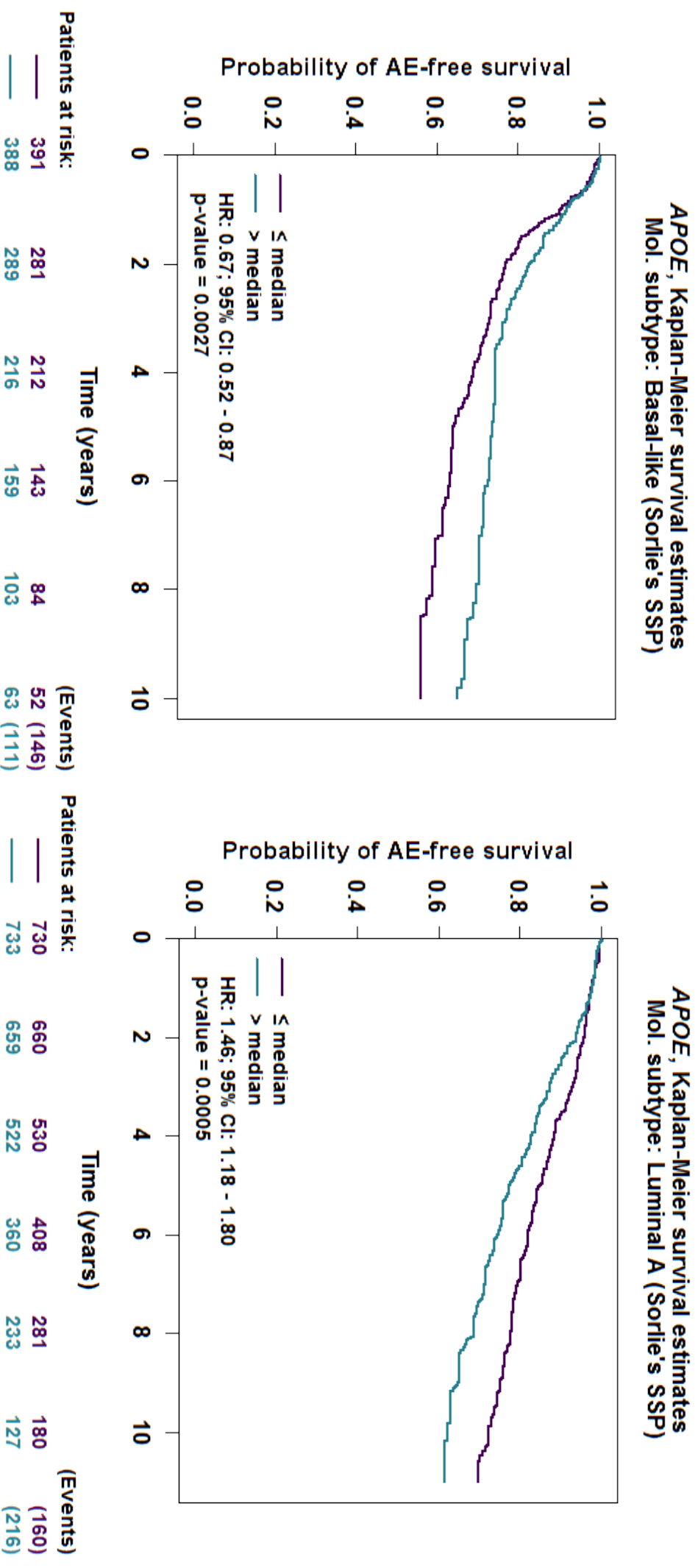
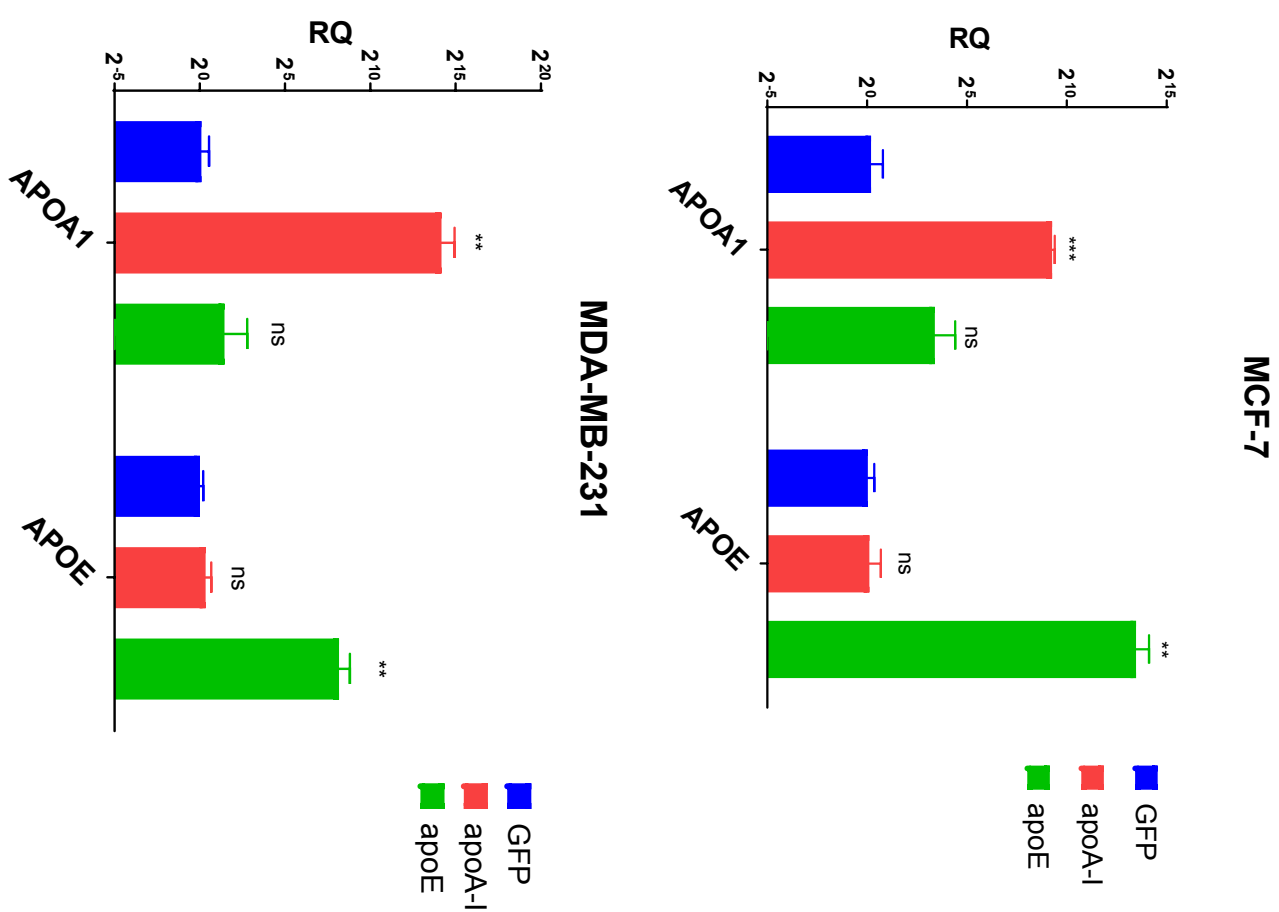


Figure 11B



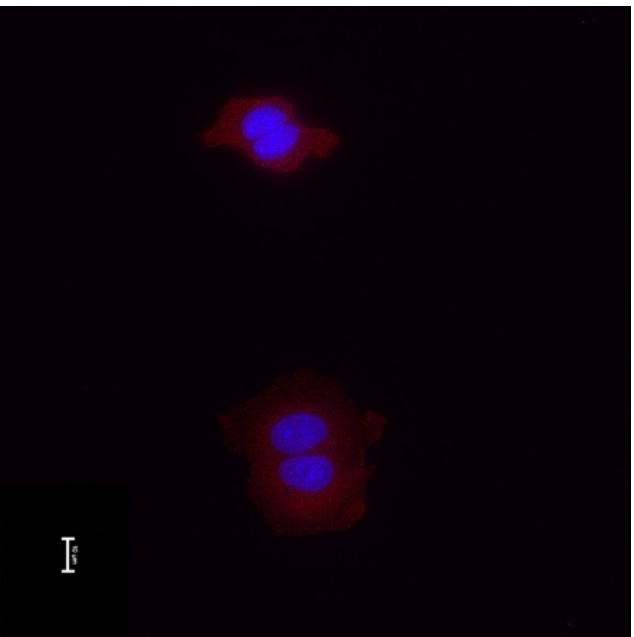
Suppl. Figure 1A



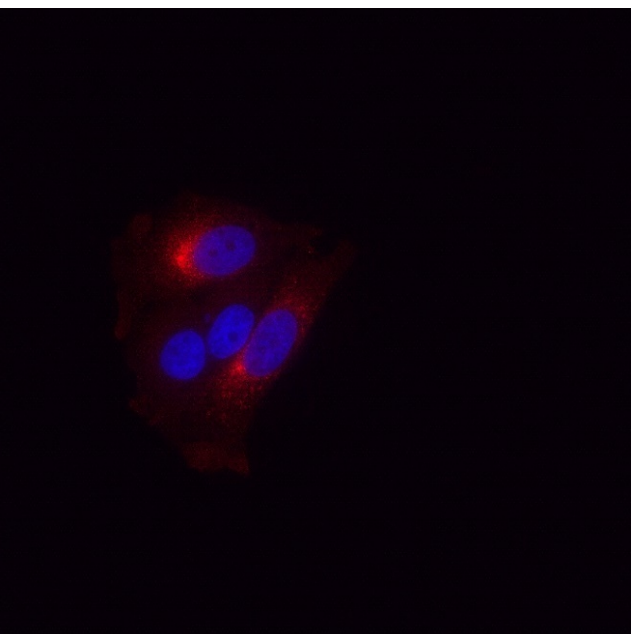
MCF-7

Suppl. Figure 1B

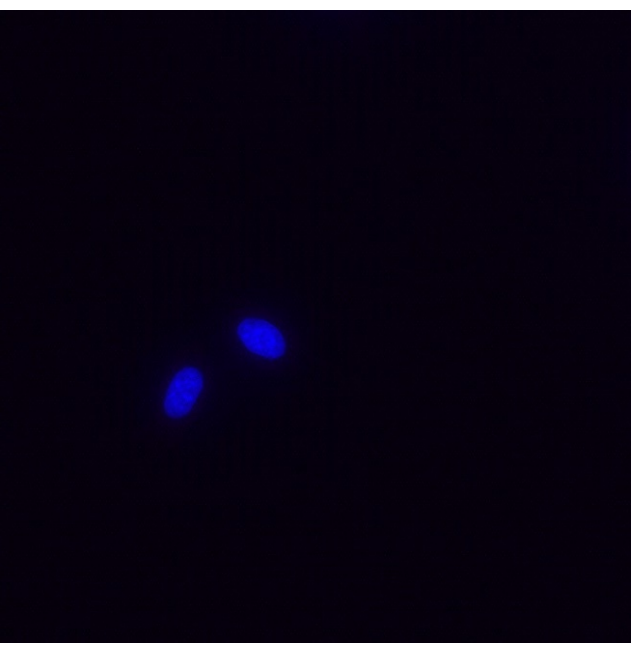
GFP



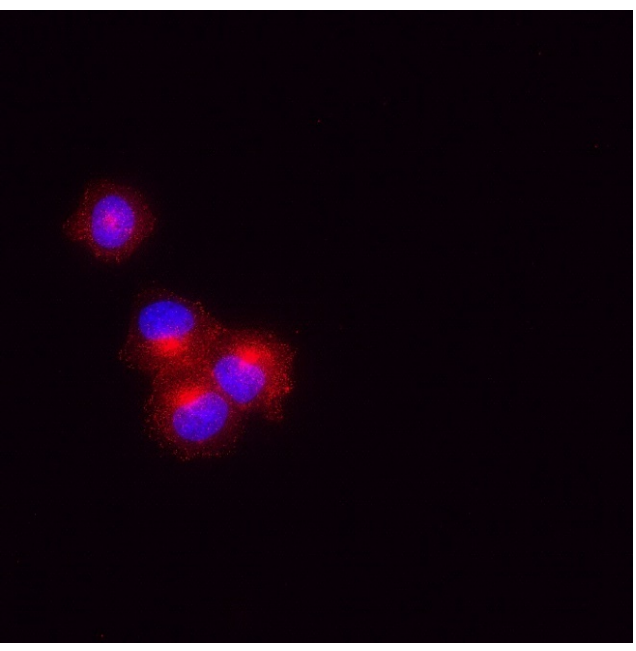
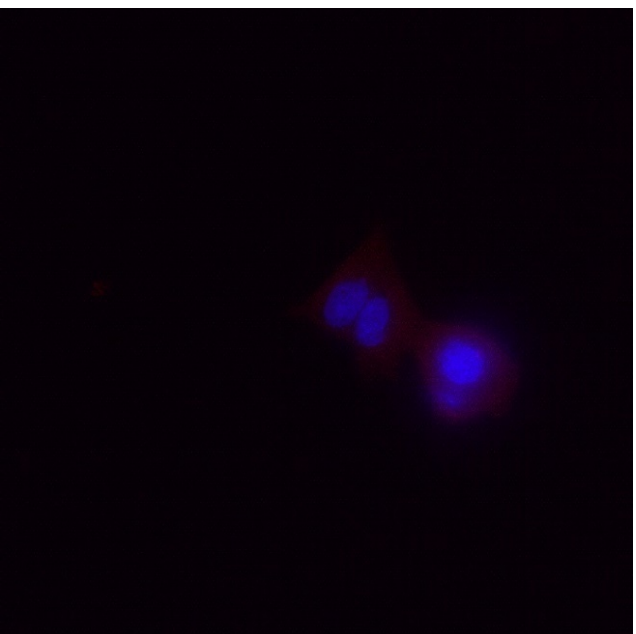
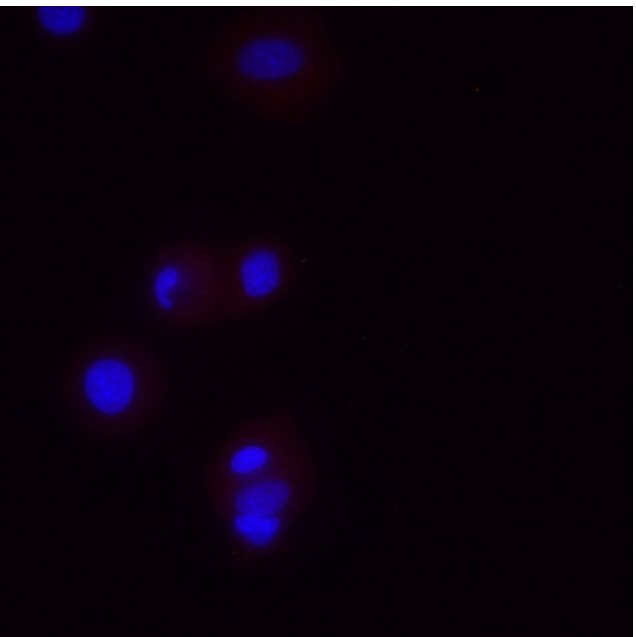
ApoA-I



ApoE



ApoE



MDA-MB-231

Suppl. Figure 1C

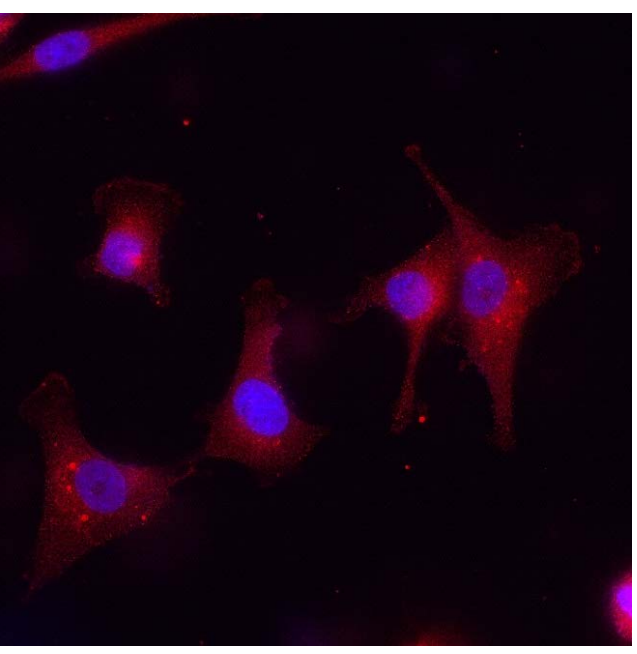
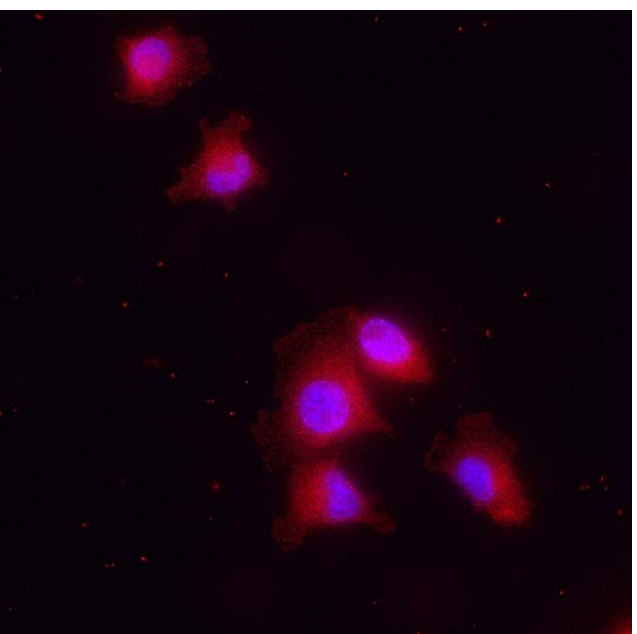
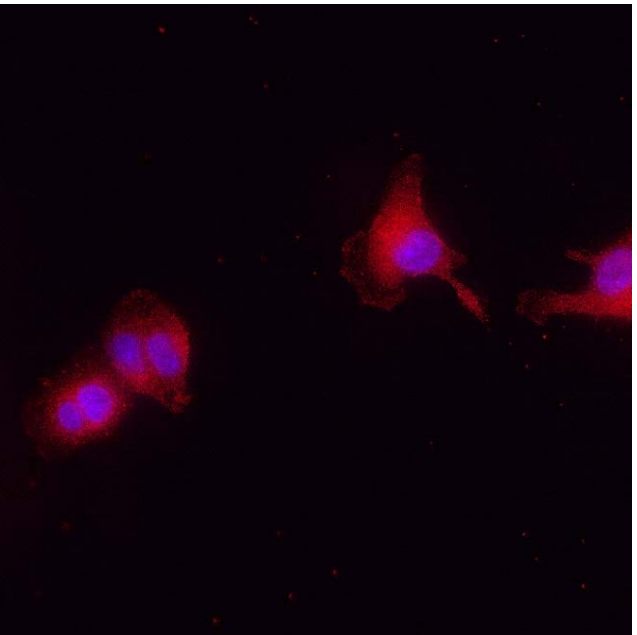
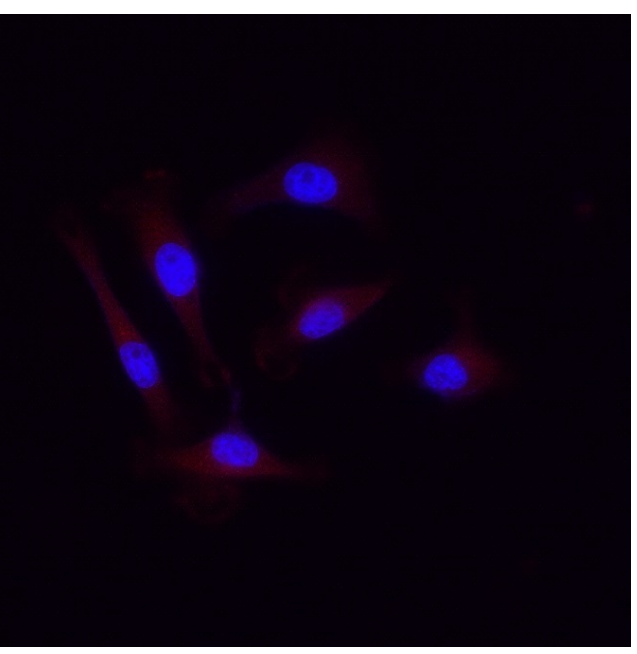
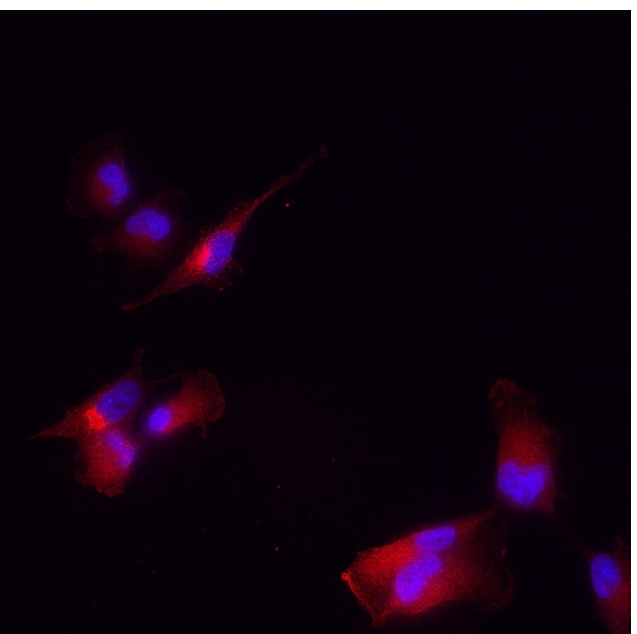
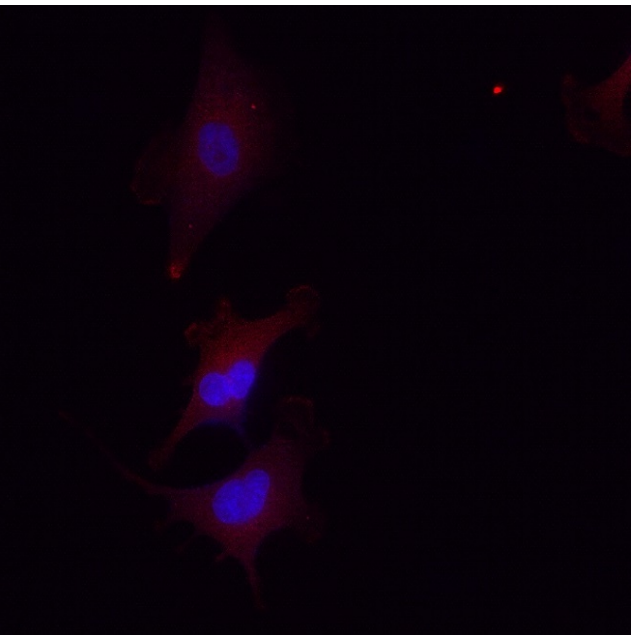
GFP

ApoA-I

ApoE

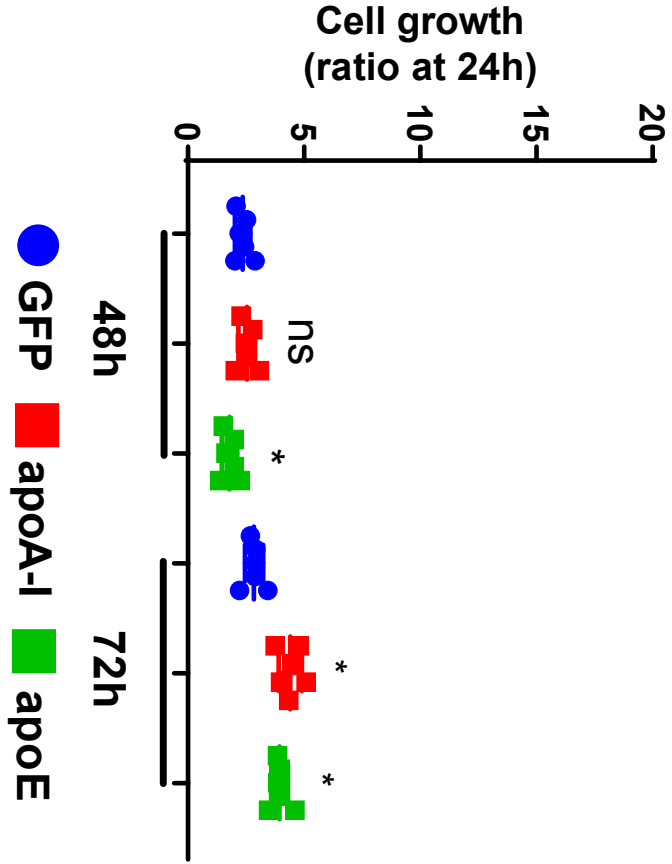
ApoA-I

ApoE

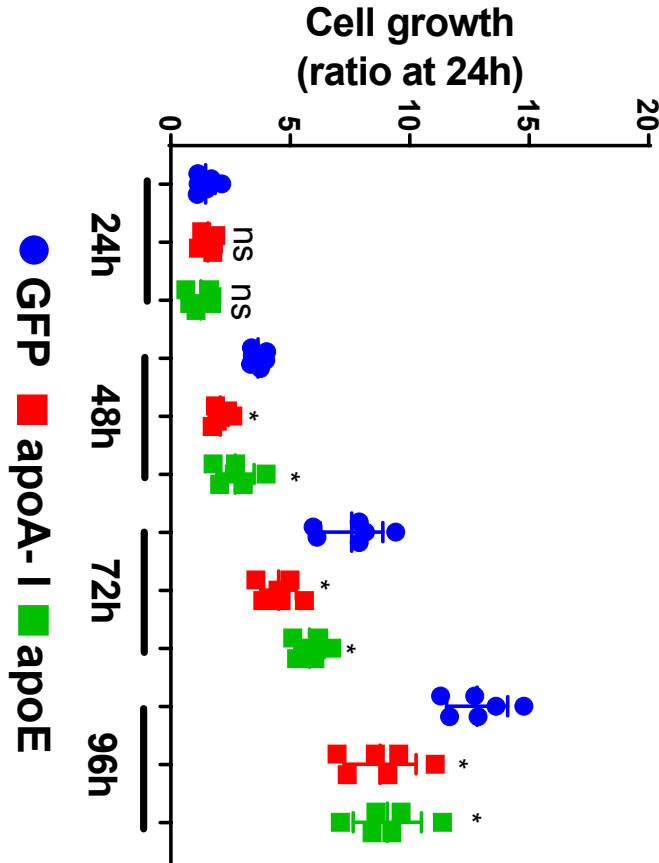


Suppl. Figure 2

A. MCF-7



B. MDA-MB-231

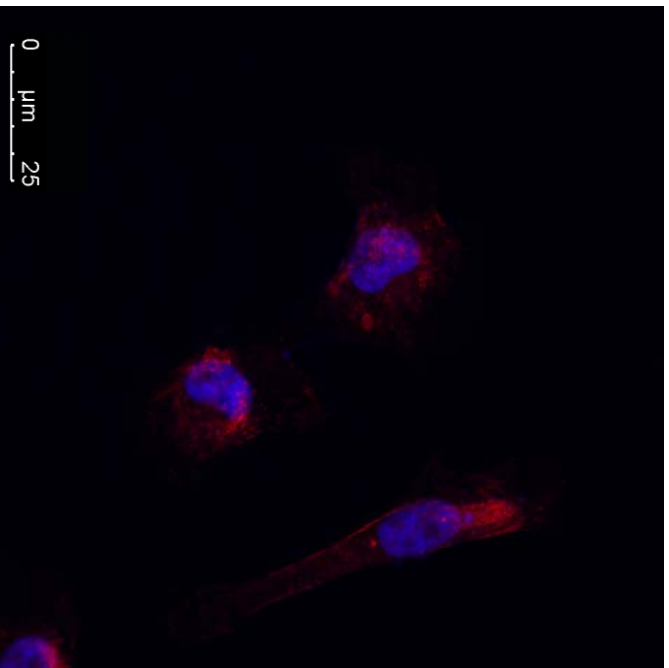


Suppl. Figure 3

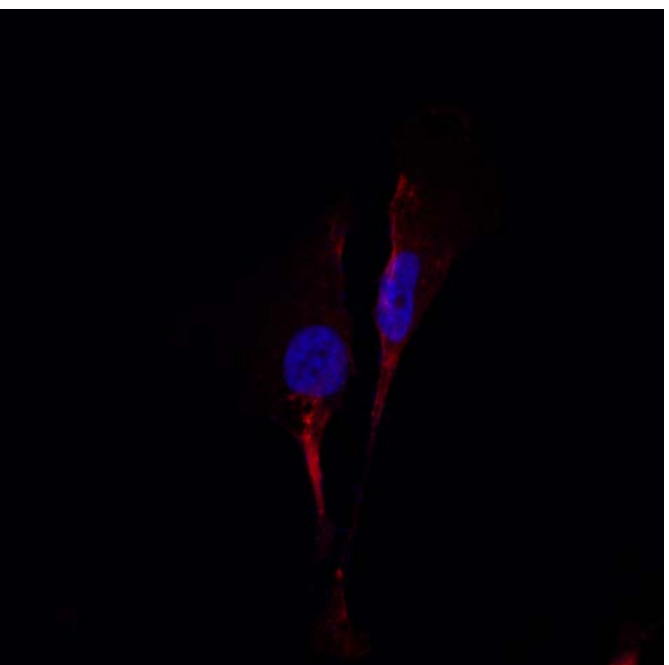
Caveolin-1 Staining

MDA-MB-231

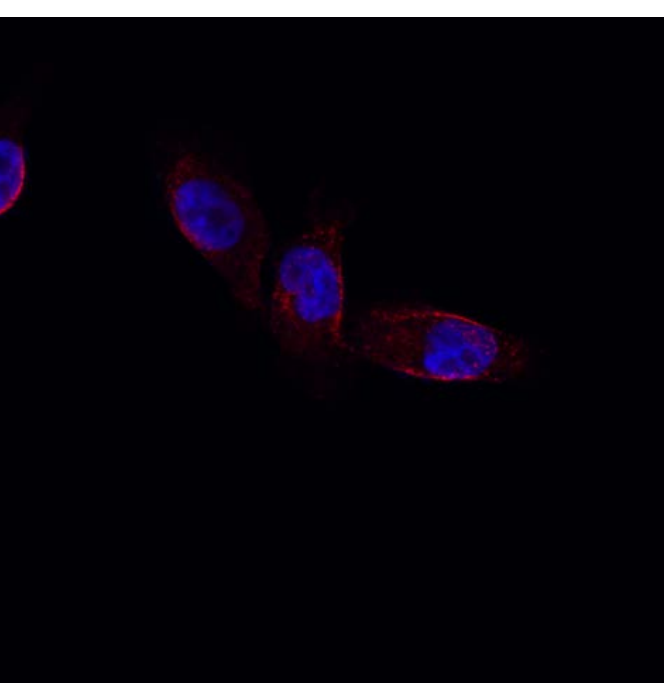
GFP



ApoA-I



ApoE



Article

Oxidized products of α -linolenic acid negatively regulate cellular survival and motility of breast cancer cells

Jorge L. Gutierrez-Pajares^{1*}, Celine Ben Hassen¹, Camille Oger², Jean-Marie Galano², Thierry Durand², and Philippe G. Frank^{1*}

¹ INSERM UMR1069. Faculté de Médecine. Université de Tours. Tours, France.

² Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM Faculté de Pharmacie. France.

* Correspondence: Philippe.Frank@univ-tours.fr (PGF); jlg.tours@gmail.com (JLGP); Tel.: +332-47-36-61-24 (PGF)

Received: En Revision
biomolecules

Abstract: Despite recent advances in our understanding of the biological processes leading to the development and progression of cancer, there is still a need for new and effective agents to treat this disease. Phytoprostanes (PhytoPs) and phytofurans (PhytoFs) are non-enzymatically oxidized products of α -linolenic acid that are present in seeds and vegetable oils. They have been shown to possess anti-inflammatory and apoptosis-promoting activities in macrophages and leukemia cells, respectively. In this work, seven PhytoPs (PP1-PP7) and one PhytoFs (PF1) were evaluated for their cytotoxic, chemosensitization and anti-migratory activities using the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Among the tested compounds, only three PhytoPs had a significant effect on cell viability compared to the control group: *Ent*-9-*L*₁-PhytoP (PP6) decreased cell viability in both cell lines, while 16-*F*_{1t}-PhytoP (PP1) and 9-*L*₁-PhytoP (PP5) decreased viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively. When combined with a sub-cytotoxic dose of doxorubicin, these three PhytoPs displayed significantly enhanced cytotoxic effects on MCF-7 cells while the chemotherapeutic drug alone had no effect. In cellular motility assays, *Ent*-9-(*RS*)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-PhytoF could significantly inhibit cellular migration of MDA-MB-231 cells. In addition, *Ent*-9-(*RS*)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-PhytoF also enhanced cellular adhesion of MDA-MB-231 cells.

Keywords: Phytoprostane; Breast Cancer; Lipids

1. Introduction

Cancer is a major cause of death in the world, and while 18.1 million new cases are expected to be detected in 2018, 9.6 million cancer-related deaths may occur [1]. Despite recent advances in our understanding of the biological processes leading to the development of cancer, there is still a need for new and effective methods of treatment for this disease. Natural products and their derivatives represent an important source of new therapeutic agents, as a tremendous chemical diversity is found in millions of species of plants, animals, and microorganisms. Plant-derived compounds have played an important role in the development of several clinically effective anti-cancer agents [2]. Although a number of anticancer agents derived from plants have been identified, many compounds that may exhibit anti-cancer properties remain to be identified.

Phytoprostanes (PhytoPs) are prostaglandin-like compounds that are found in seeds and vegetable oils [3, 4]. Arachidonate (ARA, C20:4 n-6) may be transformed via a non-enzymatic oxidative cyclization into isoprostanes (IsoPs) in animals. In plants, on the other hand, α -linolenic

acid (ALA, C18:3 n-3) oxidative cyclization leads to a series of PhytoPs and phytofurans (PhytoFs) [5]. Under high levels of oxygen tension, PhytoFs are preferentially formed over PhytoPs [6].

Previous studies have shown that IsoPs may represent markers of oxidative stress but may also have important physiological functions in obesity, cardiovascular diseases, and cancer. Clinical studies have shown that urinary levels of F₂-IsoPs are correlated with increased risk of developing several types of cancer [7]. In one study, it was shown that for a BMI<23, elevated F₂-IsoPs levels were associated with reduced risk of breast cancer. On the other hand, in patients with BMI>25, elevated levels of F₂-IsoPs were associated with increased risk of breast cancer. However, whether these products are formed as a consequence or as a cause of the disease has not yet been established [7].

Since PhytoPs and PhytoFs are structurally similar to IsoPs and prostanoids, their biological activities are currently under investigation. It has been suggested that PhytoPs can trigger a defensive reaction in plants [8]. Therefore, in *Arabidopsis thaliana*, exposure of leaves to PhytoPs mediates oxidative stress to induce the expression of proteins involved in stress response and redox regulation [9]. In mammals, PhytoPs have been shown to possess anti-inflammatory and cell-death promoting activities. It has also been shown that PhytoPs regulate cytokine production of inflammatory cells [10, 11] and down-regulate NF- κ B in murine macrophages [11]. Moreover, PhytoPs have been reported to induce apoptosis in the leukemia Jurkat cell line [12]. The differential effect of PhytoPs and PhytoFs has been suggested to depend on the stereochemistry of the studied compound [4]. Importantly, IsoPs have been demonstrated to inhibit VEGF-induced migration of endothelial cells [13]. Minghetti *et al.* reported that 16-B₁-PhytoP and 9-L₁-PhytoPs protect immature neuronal cells from oxidative stress and promote differentiation of oligodendrocytes [14]. In addition, a diet enriched in flaxseed oil is associated with increased plasma levels of PhytoPs in healthy volunteers [15].

In the world, breast cancer is the most common cancer in women, with 1.7 million women newly diagnosed in 2012 [16]. Importantly, western countries are the most affected, with 16 western countries in the top 20 of those with the highest incidence of breast cancer. Interestingly, diet and nutrition have been shown to have fundamental effects on health. Accordingly, diet is considered an important risk factor for cancer development, and many studies have suggested an essential role for several dietary nutrients in the progression and development of breast cancer. Importantly, studies have shown that, in breast cancer, ALA limits tumor progression by inhibiting cancer cell proliferation [17, 18] and tumor progression [19, 20]. These effects may be mediated by other n-3 fatty acids (EPA and DHA) but independent roles for ALA have been proposed [21, 22]. Oxygenated metabolites of ALA such as PhytoPs and PhytoFs may play a role in the inhibition of breast cancer progression mediated by ALA. Taken together, these data reinforce the need to understand the effects of PhytoPs and PhytoFs in cancer.

In the present work, seven PhytoPs (PP1-PP7) and one PhytoF (PF1) were tested on breast cancer cell lines to determine their effect on cell viability and motility.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Cell culture reagents were obtained from Fischer Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Doxorubicin and Ifetroban were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All other reagents were analytical grade.

2.2. Cell lines

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC) (Molsheim, France). MDA-MB-231 and MCF-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin and streptomycin (complete media) in a humidified incubator kept at 37°C with 5% CO₂.

2.3. Source of ALA derivatives

Synthesis of PhytoPs and PhytoF was performed as previously described [23-25]. In the present study the following compounds were tested: 16-F₁₁-PhytoP (**PP1**), 16-*epi*-16-F₁₁-PhytoP (**PP2**), 16-B₁-PhytoP (**PP3**), *Ent*-16-B₁-PhytoP (**PP4**), 9-L₁-PhytoP (**PP5**), *Ent*-9-L₁-PhytoP (**PP6**), 9-E₁-PhytoP (**PP7**) and *Ent*-9-(*RS*)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-PhytoF (**PF1**). The structure of these compounds is presented in **Figure 1**.

2.4. Cellular density assay

Cells were seeded in 96-well plates in the media indicated for each experimental condition. At the end of the incubation with or without treatment, culture media was removed, and a crystal violet (CV) staining solution was added to fix and stain cells for 1 h. After removal of the staining solution, plates were washed several times with distilled water to remove excess stain. Plates were subsequently dried at 37°C for at least 3 h. Cellular stain was recovered by adding a 10% acetic acid solution and quantified by spectrophotometry. Absorbance was read at 590 nm and 690 nm. Final calculated values were obtained by subtracting absorbance at 590 nm from those at 690 nm.

2.5. Cell cycle analysis

For each study, cells were detached with trypsin, fixed in 70% ethanol, treated with RNase (5 µg/mL), and stained with propidium iodide (3 µM). Analyses were performed with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). Gating and percentage of cells for cell cycle phases were determined using the Kaluza® Analysis software v1.3 (Beckman Coulter).

2.6. Cellular migration assay

MDA-MB-231 cells were seeded in a 96-well plate at 12.5x10³ cells/well in complete media. After the culture had reached confluency, a wound was applied with a 10 µL-pipette tip to each well. Cells were washed twice with PBS containing calcium and magnesium, and culture media (95 µL) with 0.1% fatty-acid-free BSA (faf-BSA) with or without added PhytoPs or PhytoF. FBS (5 µL) was directly added to each well 30 minutes later. Pictures (3 per well) with a 10x magnification were taken 24 h later. Cell-free area was determined for each picture and averaged per well. For Transwell migration studies, experiments were performed using the xCELLigence RTCA DP system (ACEA Biosciences, San Diego, CA). Briefly, media in the bottom well contained DMEM 5%FBS with or without phytoprostane or other compound. Cells (in media containing 0.5% FBS) were added to the top well at 40,000 cells/well. Migration was monitored via real-time impedance measurements for 24 h. Experiments were performed according to the manufacturer's instructions.

2.7. Cell adhesion

Cells were gently detached with Accutase (Sigma-Aldrich), counted, resuspended in 0.1% faf-BSA media, and seeded (2x10⁴ cells/50µL/well) in 96-well plates that were pre-coated or not with extracellular matrix from complete media, blocked with 0.5% BSA for 1 h, and washed twice with PBS before seeding cells. Cells were incubated for 1 h at 37 °C and then washed and stained with a crystal violet solution, as described above.

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean. Data were analyzed with Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA followed by the Dunn's multiple comparison test. Statistical significance was established at $p < 0.05$ level. Analyses were performed using GraphPad Prism v6.0.

3. Results

3.1. PP6 reduces cellular survival of both MCF-7 and MDA-MB-231 cells

The present study was undertaken to determine the role of several members of the PhytoP family (**Figure 1**) on breast tumor cell properties. In the first series of experiments, we analyzed their effects on cellular survival in the presence of 1% FBS for 48 h (**Figure 2A**). Our data show that PP1, PP6, and PP7 reduced survival of MCF-7 cells, while PP5 and PP6 had similar effects on MDA-MB-231 cells (**Figure 2B**). Interestingly, PP3 slightly promoted proliferation of MCF-7 but had limited effects on MDA-MB-231 cells. Therefore, PP6 was the only PhytoP to display cytotoxic activity against both cell lines.

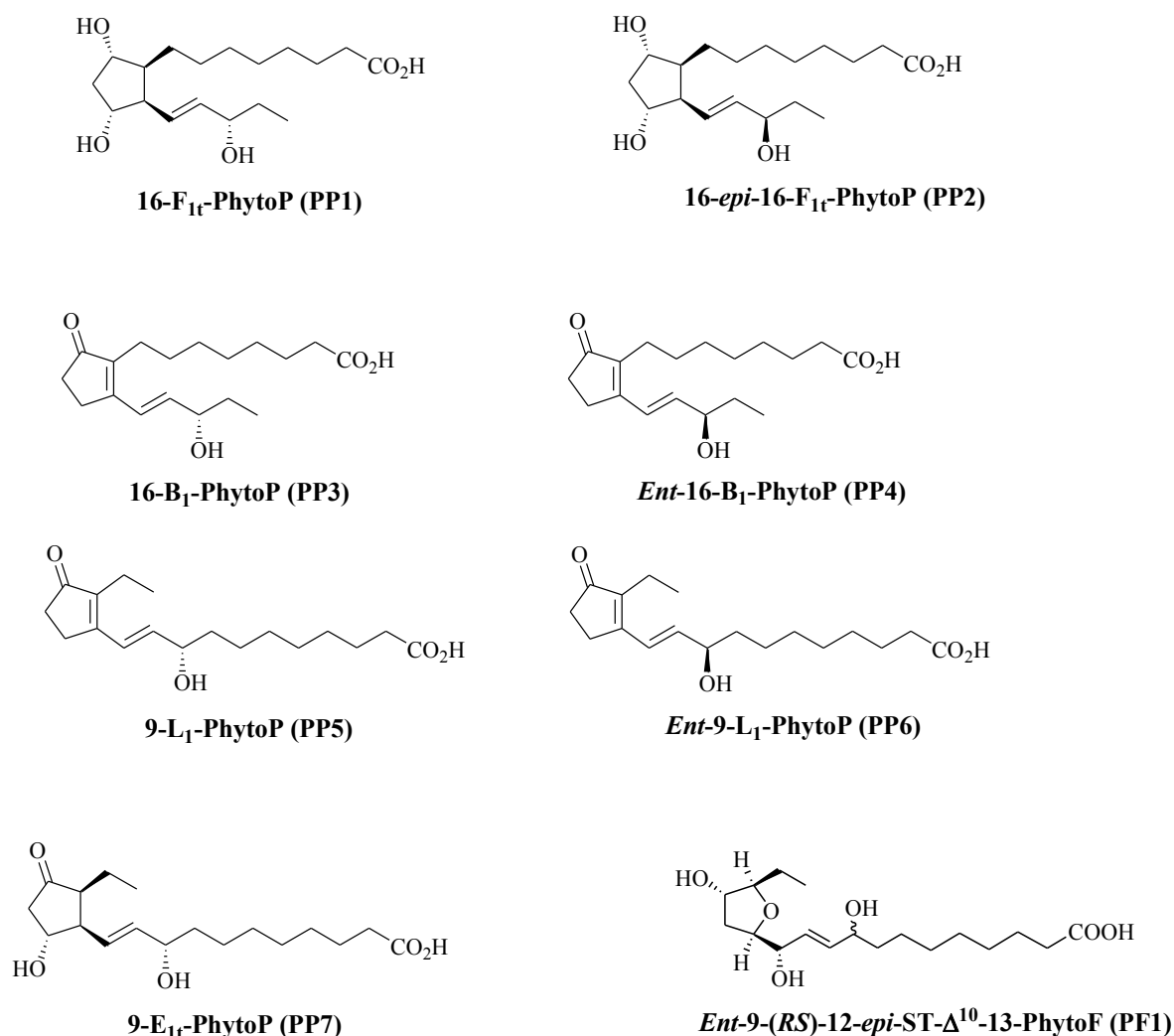


Figure 1. Structure of the phytoprostanes used in this study.

ANOVA analysis of PP2 effects on MCF-7 cells showed no significant effect. Despite the trend observed in the linear regression for MCF-7 and PP2, the slope was not significantly different from zero. In addition, a linear regression analysis showed a low r^2 values for MCF-7 cells (0.3). In the case of PP5, a significant linear dose-dependent relationship was observed for MDA-MB-231 cells (slope different from zero, $p = 0.0037$) with $r^2 = 0.3819$ and a significant Spearman r correlation ($p = 0.0167$). No significant slope nor correlation was observed for MCF-7 cells.

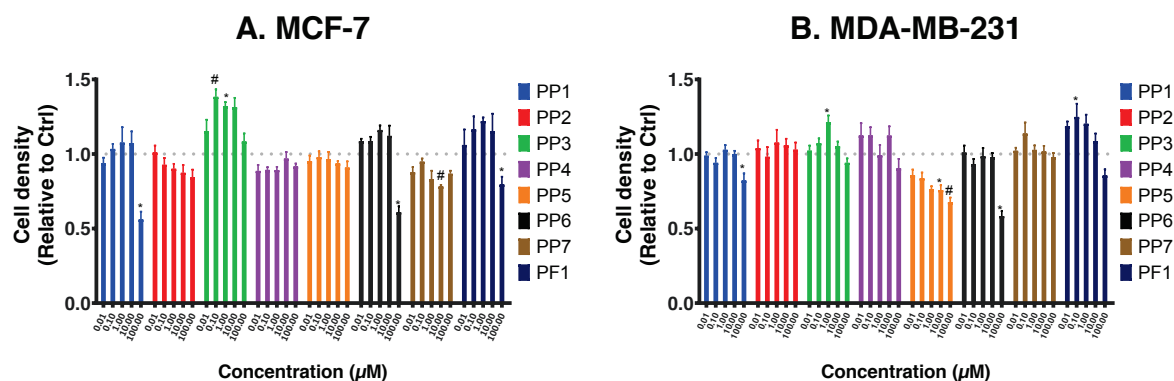


Figure 2. PP6 reduces cell survival of both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) were seeded in 96-well plates and treated with increasing concentrations (0.01–100 μM) of PhytoPs (PP1–7), PhytoF (PF1) or vehicle alone (Ctrl) in 1% FBS media for 48 h. Cell density was later determined with crystal violet stain. All treatment values were normalized against the Ctrl group. The following symbols denote a statistical significance when compared to the control group: *, $p < 0.05$; # $p < 0.01$.

3.2. PP1 prevents FBS-stimulated growth of MCF-7 cells

In the next experiment, the observed cytotoxic effects of PP1, PP5 and PP6 were further evaluated in the regulation of cellular proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231. For each experiment, three 96-well plates were seeded with 10^3 cells. 24 h after seeding, culture media was replaced with 0.1% fcs-BSA for 24 h. One plate was then selected for cell density assay (0-h time point) and the others were used for exposure to PhytoPs in the presence of 10% FBS for 48 and 72 h. Control group received vehicle alone. After the end of the incubation, plates were processed for cell density assay. In order to determine cellular proliferation, 48 h and 72 h values were normalized against the 0-h values. As shown in **Figure 3**, PP5 did not prevent FBS-mediated growth of MCF-7 but only significantly affected the proliferation of MDA-MB-231 at 48 h. On the other hand, PP6 significantly inhibited growth of MCF-7 and MDA-MB-231 cells at 48 and 72 h, respectively. Our data also show that only PP1 could prevent FBS-stimulated proliferation of MCF-7 cells at both time points (**Figure 3A**).

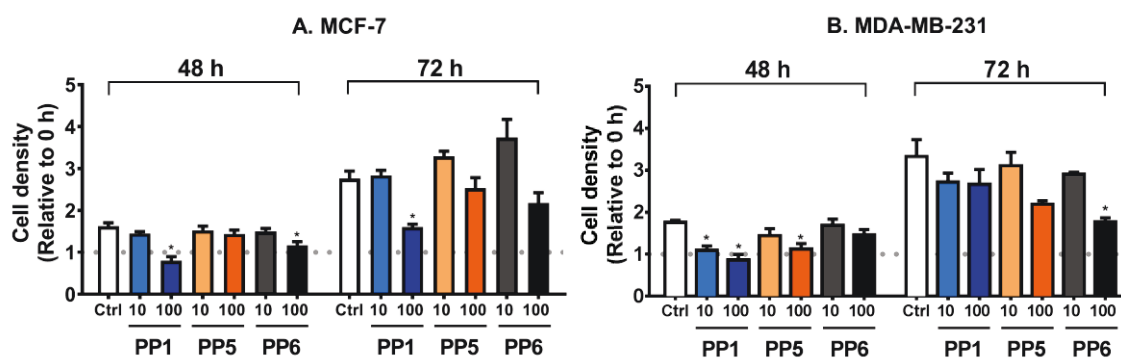


Figure 3. PP1 perturbs the proliferation of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells. 10^3 cells per well were seeded in three 96-well plates in complete media for each experiment. 24 h later the media was replaced with 0.1% fcs-BSA media and incubated for 24 h. One plate was used to determine cell density at the 0 h time point and the others were treated with vehicle alone (Ctrl), PP1, PP5 or PP6 in 10% FBS media for 48 or 72 h. At the corresponding time points, plates were subjected to a cell density assay. All treatment values were normalized against the 0-h group. The following symbol denotes a statistical significance when compared to the control group: *, $p < 0.05$.

3.3. PP5 and PP6 block MCF-7 cells in G₀/G₁ and increase the number of MDA-MB-231 cells in sub G₀/G₁

We also examined whether PP1, PP5, and PP6 could play a role in the regulation of cell cycle progression. It was observed that PP1 could slightly increase the percentage of cells in S phase compared to control groups for both cell lines (**Figure 4**). On the other hand, incubation with PP5 and PP6 was associated with an increase in the percentage of MCF-7 cells in G0/G1 while a small percentage of MDA-MB-231 cells in sub-G0/G1 was detected. These data suggest that PP5 and PP6 could induce apoptosis of the breast cancer cells used in the present study.

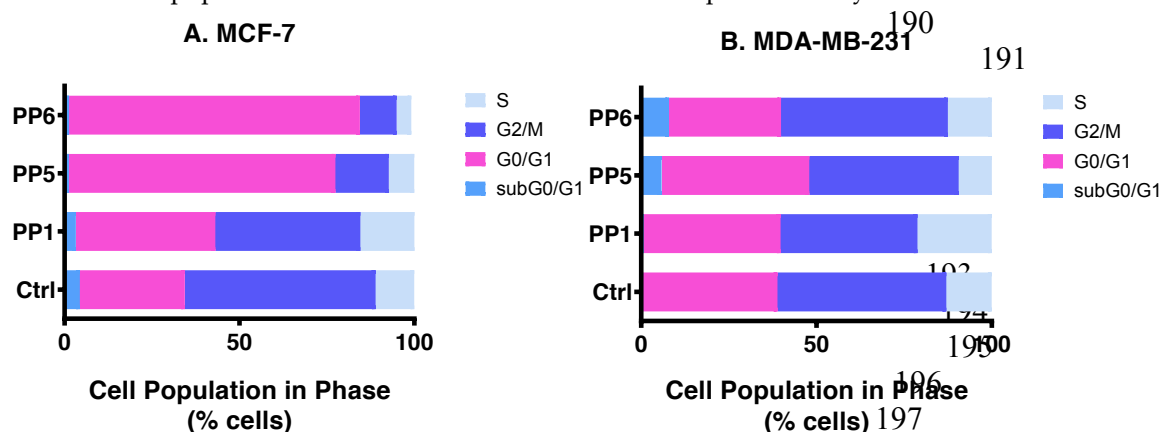


Figure 4. PP5 and PP6 block MCF-7 cells in G0/G1 and increase the proportion of MDA-MB-231 cells in sub G0/G1. MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) (2.5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well-plates in complete media. 24 h later, cells were incubated with media containing 1% FBS and 100 μ M PhytoPs or vehicle alone (Ctrl) and incubated for 48 h. Cells were then subjected to cell cycle analysis as described the Material and Methods section.

3.4. PP1, in combination with a sub-cytotoxic dose of doxorubicin, reduces cellular survival

To assess the existence of a possible interaction effect between PhytoPs and a chemotherapeutic agent, MCF-7 and MDA-MB-231 were incubated with PP1, PP5, or PP6 and a sub-toxic concentration of doxorubicin, together (**Figure 5A-B**) or sequentially (**Figure 5C-D**). Our data show that, in MCF-7 cells, co-exposure of PP1 with doxorubicin could reduce cellular survival. However, this effect was not observed in MDA-MB-231 cells. In addition, sequential exposure to both compounds did not improve the cytotoxicity of doxorubicin in these cell lines. Combination therapy is an important aspect to consider for the treatment of cancer [26]. Studies have often shown that combination therapy is more effective than sequential therapy. However, combination therapy is also associated with additional significant negative side effects. Our study confirms the enhanced effectiveness of the combination therapy. Our data also suggest that PP1 and doxorubicin may have synergistic effects on MCF-7 proliferation.

3.5. PF1 inhibits FBS-stimulated wound healing and Transwell migration of MDA-MB-231 cells

A preliminary test with PP1/2/3/4/6/7 and PF1/PP2 was established to determine the potential compounds with anti-migratory effect (not shown). PP5 was excluded from this initial test due to its effect on cellular survival (**Figure 2**). Among these compounds, only PF1 displayed an effect on cellular migration, and PF1 was compared to PP2 from the same family of compounds. It was observed that the presence of 50 μ M PF1 significantly retarded the migration of MDA-MB-231 cells, while PP2 had no significant effect (**Figure 6**). PF1 had similar effects in a Transwell migration assay (**Figure 7**). Previous studies have suggested that TBXA2R is involved in the migration and invasion of breast cancer cells [27, 28] and that isoprostane may also regulate the activation of TBXA2R [13]. To determine if this signaling pathway was affected by PF1, a Transwell migration study was performed with a specific inhibitor (Ifetroban) of the thromboxane A2 receptor (TBXA2R) receptor [29]. We show that inhibition of this pathway by Ifetroban was associated with reduced cellular migration (**Figure 7**). On the other hand, Ifetroban and PF1 did not further reduce cellular migration. These data suggest

that PF1 may act via the TBXA2R pathway or that a PF1-regulated signaling pathway may overlap with the one implicated in TBXA2R activation.

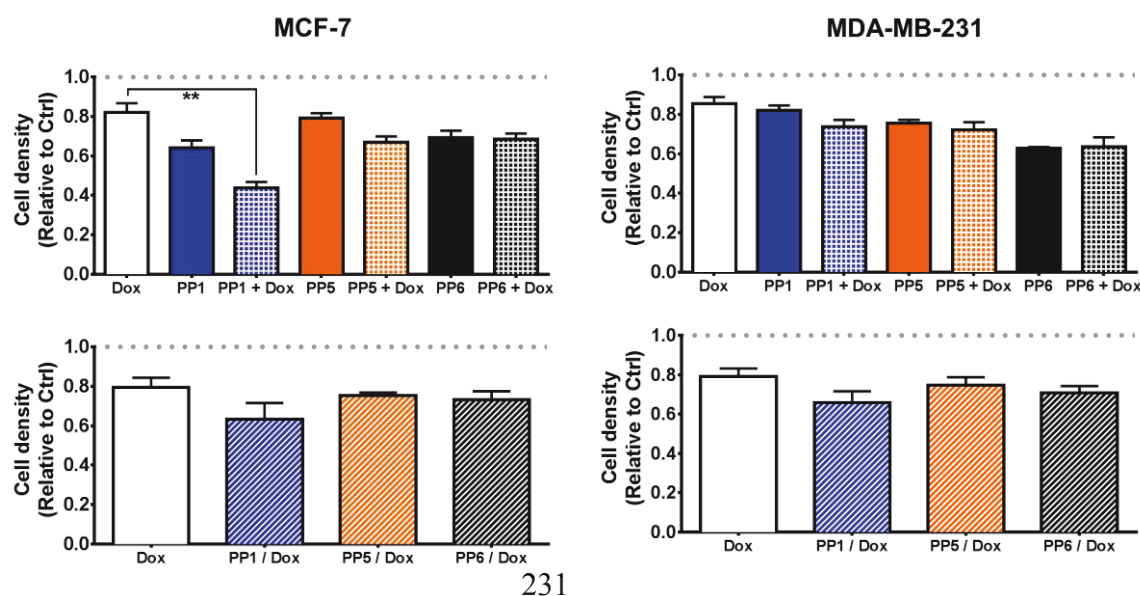


Figure 5. PP1 in combination with a sub-cytotoxic dose of doxorubicin reduces cell survival. MCF-7 (A and C) and MDA-MB-231 (B and D) cells were seeded in 96-well plates in complete media. 24 h later the media was replaced with 1% FBS containing 100 μ M PhytoPs (PP1, PP5 or PP6) and a sub-cytotoxic dose of doxorubicin (20 nM, Dox) for 48 h. At the end of the incubation, cells were submitted to a cell density assay. (A and B) Results of combined exposure for 48 h are shown. (C and D) These panels show results after pre-incubation with PhytoPs for 48 h and media replacement with media containing 20 nM doxorubicin for an additional 48 h. Cell density was later determined with crystal violet stain. Control group (Ctrl) was incubated with vehicle alone. All treatment values were normalized against Ctrl values. The following symbol denotes a statistical significance when compared to the control group: *, $p < 0.05$. Importantly, we found that a dose of 20 nM of doxorubicin was associated with a 90% cellular survival, and this concentration was therefore chosen as sub-cytotoxic.

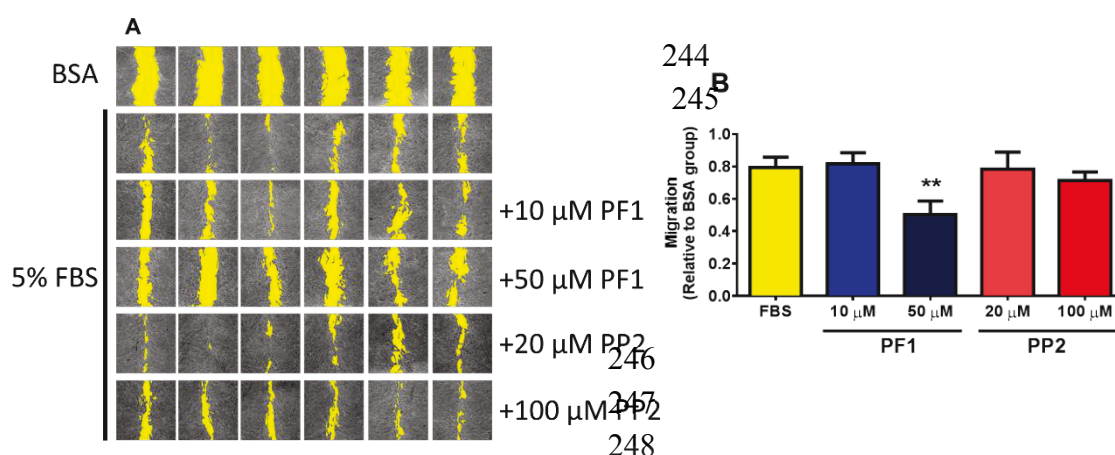


Figure 6. PF1 inhibits FBS-stimulated wound healing of MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells (12.5×10^3 cells/well) were seeded in 96-well plates in complete media. Once they reached 100% confluence, complete media was replaced with media containing 0.1% fcs-BSA for 24 h. A wound was then applied and media was replaced with media containing or not PF1 or PP2 30 min before adding FBS to a final concentration of 5% (v/v). Panel A shows representative images of wound-healing assays after 24 h. Cell-free areas are highlighted in yellow. Panel B shows comparison of cellular migration. The following symbol denotes a statistical significance when compared to the control group: **, $p < 0.01$.

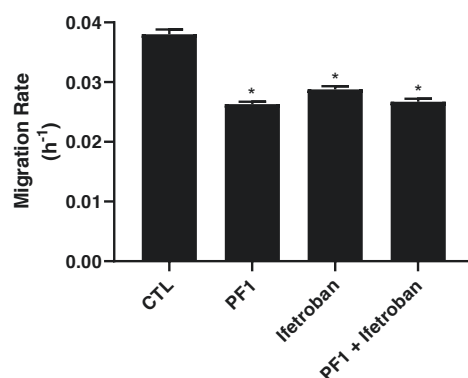


Figure 7. Ifetroban does not modulate PF1 inhibition of cellular migration in a Transwell assay. Experiments were performed using the xCELLigence RTCA DP system (ACEA Biosciences, San Diego, CA). Briefly, media in the bottom well contained DMEM 5%FBS with or without PF1 (100 μ M) or Ifetroban (2 μ M). Cells (in media with 0.5%FBS) were added to the top well at 40,000 cell/well. Migration was monitored via real time impedance measurements for 24 h. Results are presented as the rate (i.e., slope) of migration obtained from the migration curves in each condition. * denotes a statistical significance when compared to the control group ($p < 0.01$).

3.6. PF1 promotes the adhesion of MDA-MB-231 cells

To determine if PF1 could regulate cellular adhesion, PF1-pre-treated MDA-MB-231 cells were seeded on ECM-coated or uncoated plates and cellular adhesion was measured by crystal violet staining. Cellular adhesion was allowed for 1 h. As expected, barely any cellular adhesion was observed in uncoated plates. However, PF1 promoted cell adhesion of MDA-MB-231 cells on coated plates in a dose-dependent manner (Figure 8).

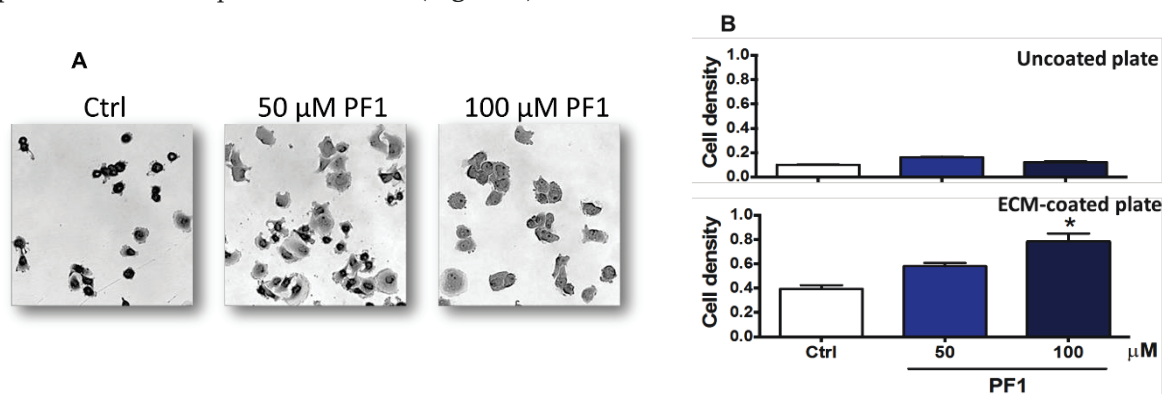


Figure 8. PF1 promotes the adhesion of MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells (4×10^6 cells/well) were seeded in a 6-well plate. The following day, media was replaced with media containing 1% FBS and supplemented with vehicle alone (Ctrl), 50, or 100 μ M PF1. After 24 h of incubation, cells were detached and seeded on uncoated (plastic) or pre-ECM-coated 96-well plates. Cellular adhesion was allowed for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, and cells were then stained with crystal violet. After drying, pictures were taken before quantification. Panel A shows cells seeded on ECM-coated plate. Note the increased number of well-spread cells when treated with PF1. Panel B shows quantification of intracellular CV. The following symbol denotes a statistical significance when compared to the control group: *, $p < 0.05$.

4. Discussion

In the present work, eight non-enzymatically oxidized derivatives of ALA were tested to identify their potential anticancer activities. Among them, we have identified that 16-F₁₁-PhytoP (PP1) and Ent-9-L₁-PhytoP (PP6) can regulate cellular survival and proliferation of breast cancer cell lines. Also,

Ent-9-(RS)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-PhytoF (PF1) displays anti-migratory activity with MDA-MB-231 cells. These findings are important and suggest that these compounds may be usable for the treatment of breast cancer, and they may be used for the treatment of primary tumor as well as metastasis development. However, further evaluation will be required.

While AA is the source of IsoPs in animals, ALA is the source of PhytoPs and PhytoFs in plants since AA availability in plants is limited. Interestingly, in patients fed a diet enriched in flaxseed oil, increased plasma levels of PhytoPs have been observed [15]. While some of the PhytoPs may be directly derived from the diet [12], data show that ALA may be transformed into PhytoPs in the human body [15]. These findings suggest that PhytoP formation may be relevant *in vivo* and may have specific effects in human diseases. Studies have shown that, in breast cancer, ALA limits tumor progression by inhibiting cancer cell proliferation [17, 18] and tumor progression [19, 20]. These effects may be mediated by other n-3 fatty acids (EPA and DHA) but independent roles for ALA have been proposed [21, 22]. Derivatives of ALA such as PhytoPs and PhytoFs may therefore play a specific role in the inhibition of breast cancer progression mediated by ALA.

Structurally, PhytoPs, PhytoFs, and IsoPs are related. Therefore, their biological effects may also be overlapping. Studies have shown that 15-F_{2t}-IsoP, 15-E_{2t}-IsoP and 15-A_{2t}-IsoP inhibit VEGF-induced migration, tube formation by ECs, and cardiac angiogenesis *in vitro*, as well as VEGF-induced angiogenesis *in vivo* via activation of the thromboxane A2 receptor (TBXA2R) [13]. Notably, an increased expression of TBXA2R was observed in tumors of human breast cancer [30], and activation of this receptor promoted the proliferation of lung carcinoma cells [31] and survival of triple negative breast cancer cells [27]. Therefore, it is reasonable to propose that the observed effects of PhytoPs and PhytoFs on cellular survival and proliferation in the present work could be related to their ability to regulate TBXA2R function in breast cancer cells. In addition, TBXA2R has also been involved in the migration and invasion of breast cancer cells [27, 28]. Taken together, these data suggest that ALA and ARA oxidative derivatives may have distinct and possibly opposite effects on cancer cell properties that may be, at least in part, mediated by TBXA2R.

Other pathways regulating cancer cell migration may also be involved in the effect mediated by PF1. As shown in this work, PF1 could diminish MDA-MB-231 response to serum-stimulated migration in a wound-healing assay (Figure 6). This effect could be explained, at least in part, by the increased adherence of cells exposed to PF1 (Figure 7). An inverse relationship between cellular adhesion and migration has previously been described for pancreatic cancer cells where down-regulation of p8 promotes cellular adherence and decreases cellular migration via regulation of cdc42 [32]. This inverse relationship has also been described under hypoxic conditions for L929 fibroblasts, which increase the number of focal adhesion contacts per cell and cellular surface β 1-integrin levels [33]. Although no specific study has been performed on PhytoPs or PhytoFs, IsoPs have been shown to increase adhesiveness of neutrophils [34] and platelets [35]. Further studies are required to establish the molecular pathways involved in PF1 regulation of cellular migration. Our results show that PF1 may act via the TBXA2R pathway or that a PF1-regulated signaling pathway may overlap with the one implicated in TBXA2R activation.

Alternatively, one type of PhytoPs has also been identified as an activator of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), which is a transcription factor that subsequently triggers a cellular oxidative stress response [36]. In that regard, other naturally occurring, plant-derived phytochemicals have been identified as activators of Nrf2. It was proposed that the chemotherapeutic activities of these compounds may be mediated by Nrf2. Nrf2 may allow the activation of phase II detoxification enzymes, antioxidants, and transporters [37].

5. Conclusions

Given the fact that the human body can produce PhytoPs and PhytoFs, consumption of a diet enriched in ALA may affect cancer progression and/or response to chemotherapeutic treatment, at least in the case of breast cancer. In addition, it may also attenuate inflammation, as previously shown. Taken together, these findings are important and suggest that these compounds may be

usable for the treatment of breast cancer, and they may be used for the treatment of primary tumor as well as metastasis development. However, further evaluation will be required.

Author Contributions: Conceptualization, JLGP and PGF; Formal analysis, JLGP and PGF; Funding acquisition, PGF; Investigation, JLGP, CBH, CO, JMG, TD and PGF; Methodology, JLGP, CBH, CO, JMG, TD and PGF; Project administration, PGF; Resources, TD and PGF; Supervision, TD and PGF; Writing – original draft, JLGP and PGF; Writing – review & editing, PGF.

Funding: JLGP was supported by Le Studium (Région Centre-Val de Loire, France). PGF was supported by grants from INCa PLBio (2018-145), the Lipids ARD2020-Biodrug project (Région Centre-Val de Loire, France), La Ligue contre le Cancer (Indre et Loire, Loir et Cher, and Vienne), by an Academic Research Grant from the Région Centre-Val de Loire (France) and by the Canceropole Grand-Ouest (Mature project).

Acknowledgments: The authors thank Valérie Bultel-Poncé and Alexandre Guy from IBMM for their participation in the synthesis of PhytoPs and PhytoFs.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.; Torre, L.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In *CA Cancer J. Clin.*, 2018; Vol. 2018.
- Kinghorn, A. D.; EJ, D. E. B.; Lucas, D. M.; Rakotondraibe, H. L.; Orjala, J.; Soejarto, D. D.; Oberlies, N. H.; Pearce, C. J.; Wani, M. C.; Stockwell, B. R.; Burdette, J. E.; Swanson, S. M.; Fuchs, J. R.; Phelps, M. A.; Xu, L.; Zhang, X.; Shen, Y. Y., Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. *Anticancer Res.* **2016**, 36, (11), 5623-5637.
- Dominguez-Perles, R.; Abellan, A.; Leon, D.; Ferreres, F.; Guy, A.; Oger, C.; Galano, J. M.; Durand, T.; Gil-Izquierdo, A., Sorting out the phytoprostane and phytofuran profile in vegetable oils. *Food Res. Int.* **2018**, 107, 619-628.
- Durand, T.; Bultel-Ponce, V.; Guy, A.; Berger, S.; Mueller, M. J.; Galano, J. M., New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. *Lipids* **2009**, 44, (10), 875-88.
- Galano, J. M.; Lee, Y. Y.; Oger, C.; Vigor, C.; Vercauteren, J.; Durand, T.; Giera, M.; Lee, J. C., Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25years of research in chemistry and biology. *Prog. Lipid Res.* **2017**, 68, 83-108.
- Fessel, J. P.; Porter, N. A.; Moore, K. P.; Sheller, J. R.; Roberts, L. J., 2nd, Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increased oxygen tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (26), 16713-8.
- Il'yasova, D.; Scarbrough, P.; Spasojevic, I., Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin. Chim. Acta* **2012**, 413, (19-20), 1446-53.
- Mueller, M. J., Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, 7, (4), 441-8.
- Dueckershoff, K.; Mueller, S.; Mueller, M. J.; Reinders, J., Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of Arabidopsis thaliana. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1784, (12), 1975-85.
- Gutermuth, J.; Bewersdorff, M.; Traidl-Hoffmann, C.; Ring, J.; Mueller, M. J.; Behrendt, H.; Jakob, T., Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, 120, (2), 293-9.

11. Traidl-Hoffmann, C.; Mariani, V.; Hochrein, H.; Karg, K.; Wagner, H.; Ring, J.; Mueller, M. J.; Jakob, T.; Behrendt, H., Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, (4), 627-36.
12. Karg, K.; Dirsch, V. M.; Vollmar, A. M.; Cracowski, J. L.; Laporte, F.; Mueller, M. J., Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition. *Free Radic. Res.* **2007**, *41*, (1), 25-37.
13. Benndorf, R. A.; Schwedhelm, E.; Gnann, A.; Taheri, R.; Kom, G.; Didie, M.; Steenpass, A.; Ergun, S.; Boger, R. H., Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circ. Res.* **2008**, *103*, (9), 1037-46.
14. Minghetti, L.; Salvi, R.; Lavinia Salvatori, M.; Ajmone-Cat, M. A.; De Nuccio, C.; Visentin, S.; Bultel-Ponce, V.; Oger, C.; Guy, A.; Galano, J. M.; Greco, A.; Bernardo, A.; Durand, T., Nonenzymatic oxygenated metabolites of alpha-linolenic acid B1- and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR-gamma activation. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *73*, 41-50.
15. Barden, A. E.; Croft, K. D.; Durand, T.; Guy, A.; Mueller, M. J.; Mori, T. A., Flaxseed oil supplementation increases plasma F1-phytoprostanes in healthy men. *J. Nutr.* **2009**, *139*, (10), 1890-5.
16. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.; Forman, D.; Bray, F., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Cancer, I. A. f. R. o., Ed. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2013; p <http://globocan.iarc.fr>.
17. Kim, J. Y.; Park, H. D.; Park, E.; Chon, J. W.; Park, Y. K., Growth-inhibitory and proapoptotic effects of alpha-linolenic acid on estrogen-positive breast cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171*, 190-5.
18. Deshpande, R.; Mansara, P.; Suryavanshi, S.; Kaul-Ghanekar, R., Alpha-linolenic acid regulates the growth of breast and cervical cancer cell lines through regulation of NO release and induction of lipid peroxidation. *J Mol Biochem* **2013**, *2*, 6-17.
19. Hardman, W. E.; Ion, G., Suppression of implanted MDA-MB 231 human breast cancer growth in nude mice by dietary walnut. *Nutr. Cancer* **2008**, *60*, (5), 666-74.
20. Vara-Messler, M.; Pasqualini, M. E.; Comba, A.; Silva, R.; Buccellati, C.; Trenti, A.; Trevisi, L.; Eynard, A. R.; Sala, A.; Bolego, C.; Valentich, M. A., Increased dietary levels of alpha-linoleic acid inhibit mammary tumor growth and metastasis. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, (2), 509-519.
21. Saggar, J. K.; Chen, J.; Corey, P.; Thompson, L. U., Dietary flaxseed lignan or oil combined with tamoxifen treatment affects MCF-7 tumor growth through estrogen receptor- and growth factor-signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, (3), 415-25.
22. Truan, J. S.; Chen, J. M.; Thompson, L. U., Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, (10), 1414-21.
23. El Fangour, S.; Guy, A.; Despres, V.; Vidal, J. P.; Rossi, J. C.; Durand, T., Total synthesis of the eight diastereomers of the syn-anti-syn phytoprostanes F1 types I and II. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, (7), 2498-503.
24. Pinot, E.; Guy, A.; Fournial, A.; Balas, L.; Rossi, J. C.; Durand, T., Total Synthesis of the Four Enantiomerically Pure Diastereoisomers of the Phytoprostanes E1Type II and of the 15-E2t-Isoprostanes. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, (8), 3063-9.

25. Cuyamendous, C.; Leung, K. S.; Durand, T.; Lee, J. C.; Oger, C.; Galano, J. M., Synthesis and discovery of phytofurans: metabolites of alpha-linolenic acid peroxidation. *Chem. Commun. (Camb.)* **2015**, 51, (86), 15696-9.
26. Miles, D.; von Minckwitz, G.; Seidman, A. D., Combination versus sequential single-agent therapy in metastatic breast cancer. *Oncologist* **2002**, 7 Suppl 6, 13-9.
27. Orr, K.; Buckley, N. E.; Haddock, P.; James, C.; Parent, J. L.; McQuaid, S.; Mullan, P. B., Thromboxane A2 receptor (TBXA2R) is a potent survival factor for triple negative breast cancers (TNBCs). *Oncotarget* **2016**, 7, (34), 55458-55472.
28. Keating, G. L.; Reid, H. M.; Eivers, S. B.; Mulvaney, E. P.; Kinsella, B. T., Transcriptional regulation of the human thromboxane A2 receptor gene by Wilms' tumor (WT)1 and hypermethylated in cancer (HIC) 1 in prostate and breast cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1839, (6), 476-92.
29. Rosenfeld, L.; Grover, G. J.; Stier, C. T., Jr., Ifetroban sodium: an effective TxA2/PGH2 receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2001**, 19, (2), 97-115.
30. Watkins, G.; Douglas-Jones, A.; Mansel, R. E.; Jiang, W. G., Expression of thromboxane synthase, TBXAS1 and the thromboxane A2 receptor, TBXA2R, in human breast cancer. *Int. Semin. Surg. Oncol.* **2005**, 2, 23.
31. Li, X.; Tai, H. H., Activation of thromboxane A(2) receptors induces orphan nuclear receptor Nurrl expression and stimulates cell proliferation in human lung cancer cells. *Carcinogenesis* **2009**, 30, (9), 1606-13.
32. Sandi, M. J.; Hamidi, T.; Malicet, C.; Cano, C.; Loncle, C.; Pierres, A.; Dagorn, J. C.; Iovanna, J. L., p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **2011**, 226, (12), 3442-51.
33. Vogler, M.; Vogel, S.; Krull, S.; Farhat, K.; Leisering, P.; Lutz, S.; Wuertz, C. M.; Katschinski, D. M.; Zieseniss, A., Hypoxia modulates fibroblastic architecture, adhesion and migration: a role for HIF-1alpha in cofilin regulation and cytoplasmic actin distribution. *PLoS One* **2013**, 8, (7), e69128.
34. Fontana, L.; Giagulli, C.; Minuz, P.; Lechi, A.; Laudanna, C., 8-Iso-PGF2 alpha induces beta 2-integrin-mediated rapid adhesion of human polymorphonuclear neutrophils: a link between oxidative stress and ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2001**, 21, (1), 55-60.
35. Minuz, P.; Andrioli, G.; Degan, M.; Gaino, S.; Ortolani, R.; Tommasoli, R.; Zuliani, V.; Lechi, A.; Lechi, C., The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, 18, (8), 1248-56.
36. Heiss, E. H.; Tran, T. V.; Zimmermann, K.; Schwaiger, S.; Vouk, C.; Mayerhofer, B.; Malainer, C.; Atanasov, A. G.; Stuppner, H.; Dirsch, V. M., Identification of chromomoric acid C-I as an Nrf2 activator in *Chromolaena odorata*. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, (3), 503-8.
37. Jaramillo, M. C.; Zhang, D. D., The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* **2013**, 27, (20), 2179-91.





Development of a novel HPTLC-based method for the simultaneous quantification of clinically relevant lipids from cells and tissue extracts

Journal:	<i>Lipids</i>
Manuscript ID	LIPIDS-19-0177
Manuscript Type:	Methods
Date Submitted by the Author:	23-Sep-2019
Complete List of Authors:	Pinault, Michelle; Universite de Tours Faculte de Medecine, INSERM UMR1069 Guimaraes, Cyrille; Universite de Tours Faculte de Medecine, INSERM UMR1069 Ben Hassen, Céline; Universite de Tours Faculte de Medecine, INSERM UMR1069 Gutierrez-Pajares, Jorge; Universite de Tours Faculte de Medecine, INSERM UMR1069 Chevalier, Stephan; Universite de Tours Faculte de Medecine, INSERM UMR1069 Goupille, Caroline; Bretonneau Hospital, INSERM UMR1069 Bernard-Savary, Pierre; Chromacim Frank, Philippe; Universite de Tours Faculte de Medecine, INSERM UMR1069
Keywords:	Cholesterol < Specific Lipids, Analytical biochemistry < Analytical Techniques

Development of a novel HPTLC-based method for the simultaneous quantification of clinically relevant lipids from cells and tissue extracts

Michelle Pinault¹, Cyrille Guimaraes¹, Céline Ben Hassen¹, Jorge L. Gutierrez-Pajares¹, Stéphan Chevalier¹, Caroline Goupille², Pierre Bernard-Savary³, and Philippe G. Frank^{1*}

¹Université de Tours, INSERM, UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer, Tours, France.

²CHRU Hôpital Bretonneau, Tours

³Chromacim, 170 Rue de Chatagnon, 38430 Moirans.

***Corresponding author:** Philippe G. Frank, Université de Tours, INSERM, UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer, Tours, France.
E-mail:Philippe.Frank@univ-tours.fr

Keywords : Cholesterol, Triglycerides, Fatty Acids, Cancer

Abstract

Lipids such as cholesterol, triglycerides, and fatty acids play important roles in the regulation of cellular metabolism and cellular signaling pathways and, as a consequence, in the development of various diseases. It is therefore important to understand how their metabolism is regulated to better define the components involved in the development of various human diseases. In the present work, we described the development and validation of an HPTLC method allowing the separation and quantification of free cholesterol, cholesteryl esters, non-esterified fatty acids, and triglycerides. This method will be of interest as the quantification of these lipids in one single assay is difficult to perform.

Introduction

Abnormality in the metabolism of lipids such as cholesterol (free or esterified), non-esterified fatty acids, and triglycerides have been shown to control the development of various diseases including atherosclerosis, obesity, cancer, nonalcoholic fatty liver disease, as well as other metabolic diseases. [1-4]. In cancer, they have been demonstrated to play an important role in the regulation of cancer progression. Their functions include the regulation of cellular signaling pathways involved in cell cycle regulation as well as other pathways regulating cancer cell migration and survival [5-7]. In several types of cancer, plasma cholesterol levels have been shown to regulate tumor formation and cancer aggressiveness [8, 9]. In vascular disease, studies have now demonstrated the role of cholesterol and triglycerides in the development of atherosclerosis [10]. After accumulation in the form of LDL-derived cholesterol in the arterial wall of blood vessels, an inflammatory reaction leads to the attraction of monocyte/macrophages in the intima and eventually atheroma development [11]. Finally, obesity, which is characterized by increased adipose tissue and increased triglyceride accumulation, is associated with defect in the metabolism of many lipids such as cholesterol and fatty acids, and its appearance is associated with the development of other diseases such as cardiovascular disease, type 2 diabetes, and cancer [12].

Taken together, these data suggest that a method that could facilitate the simultaneous cellular or tissue quantification of these lipids and allow valid comparisons between samples would be invaluable to study the regulation and the role of these lipids in human diseases. In the present study, we described the development of a method for the reproducible quantification of these lipids (**Fig. 1**) in cells and tissue extracts.

Materials and methods

Reagents

Free cholesterol (FC), cholesteryl oleate (CE), oleic acid (NEFA) and triolein (TG) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All other reagents were analytical grade.

Phospho-vanillin was prepared as followed: 0.99 g of Vanillin (Sigma-Aldrich) was dissolved in 10 mL ethanol 100% before dilution into 153mL with distilled water. This solution was mixed with 337 mL of 85% H_3PO_4 (w/v) with constant stirring. The resulting solution was prepared before each use and kept in a dark bottle at room temperature. Perchloric acid (65%) was obtained from Sigma-Aldrich.

HPTLC instruments and chromatographic conditions

Standard calibration curves were obtained by spotting standards of known lipid composition. For sample analyses, after lipid extraction with the method from Bligh and Dyer [13], lipid extracts were also spotted on HPTLC precoated silica gel glass plates 60F₂₅₄ (20x10 cm; 1.05642.0001; E. Merck, Darmstadt, Germany) using a Camag autosampler ATS4 sample applicator (Camag, Muttenz Switzerland) equipped with a 25- μL dosing syringe. For each plate, 14 tracks were used, five were used for calibration standards and nine for sample application. In successive plates, calibration standards were spotted on different tracks to avoid side effects.

Before each experiment, plates were pre-developed once in chloroform-methanol 1:1 (v/v), air-dried, and activated at 110°C in an oven for 20 min. Samples were applied in the form of 10-mm band shapes, 1.5cm from the bottom of the Silica plate at a constant flow rate of 150 nL/s. under nitrogen flow. This spray-on technique and the flow rate adjusted to the type of sample solvent to be applied, dries out the solvent during the application. It avoids diffusion and permits an optimal sample band focus that allows a good separation and a homogenous quantification. For development, the mobile phase used was a mixture of hexane:ether:acetic acid (70:30:1; v/v/v). Linear ascending development was carried out in a 20x10cm twin trough glass chamber

(Camag, Muttenz, Switzerland) pre-equilibrated with the mobile phase. Optimal chamber saturation time for the mobile phase was 15 min at room temperature without saturation paper. The length of development was 10 cm. We used 20 mL of mobile phase for saturation and migration (10 mL in the tank facing the plate and 10 mL in the tank where the plate is developed). Subsequent to the development, HPTLC plates were air-dried under a ventilated hood for 90 min after migration. Dried plates were treated by dipping for 1 min in an immersion tank containing a 50% perchloric acid solution. After a 2-hour drying period at room temperature, plates were placed on a plate heater (TLC Plate Heater 3, Camag Muttenz Switzerland) for 16 min at 160°C to allow carbonization for the staining reaction. Densitometric analysis was performed using a TLC/HPTLC video-densitometer (TLC Visualizer 2 Camag, with Videoscan software, Camag, Muttenz, Switzerland).

Standard solution preparation

To establish the assay range, the limit of detection was determined for all applications. We tested concentrations ranging from 0.04 mg/mL to 0.8 mg/mL. A standard solution at 1 mg/mL was prepared and used for the calibration curve. For each authentic standard of lipid, we performed a calibration curve with 5 points at increasing levels to quantify lipids on the plates. Stock solutions and standards were aliquoted and kept in glass tubes (with a screw cap and silicone/PTFE seal) at -20 °C. Under these conditions, products were stable for one year.

Method validation

The method was validated as described by the ICH harmonization guidelines [14] in terms of linearity, accuracy, specificity, repeatability, system repeatability, and intermediate precision of measurement for peak area.

The percent of recovery was calculated by using the formula, % recovery = $[(T-A)/S] \times 100$, where: T is the percentage added to the maximum value in range (i.e. 50, 100, 150, and 200%), S is the maximum value in range, A is the difference between the area at the considered percentage and the area of S. Recovery studies were carried out by spiking the stock solutions

(1 mg/mL) with 50%, 100%, 150%, and 200% of the standard lipid solution. After dilutions were made, recovery studies were performed. Precision of the measurements was verified by repeatedly testing (n=10) each mixed standard solutions (five different concentrations) containing all the lipids. Experiments were repeated the same day using several HPTLC plates. LOD and LOQ were calculated from the following equations: $LOD=3x(SD/S)$ and $LOQ=10x(SD/S)$, with S, slope of the calibration curve and SD, standard deviation of the blank signal (n=10 measurements on different plates). For this determination, mean blank was obtained for each lipid class using a blank lane by spotting the solvent (chloroform/methanol, 2:1, v/v) and reading the signal at the same retention factor (Rf) as that of the corresponding lipids.

The limit of quantification (LOQ) was also estimated using the Eurachem approach [15]. Five concentration close to the quantification point were used, and the relative standard deviation was plotted against the measured concentration. The corresponding limit of quantification was obtained from this graph for a relative standard deviation of 10%.

Statistical analyses were performed with StatPlus 6.03.

Spectrophotometric quantification of lipids using phospho-vanillin

The sulfo-phospho-vanillin assay [16] was performed to determine the accuracy of our method. Briefly, two mL of concentrated H_2SO_4 (98% w/v solution) were added to standards at different concentrations after solvent evaporation. Tubes were heated for 20 min in a boiling water bath and cooled down for 4 min. To each tube, 4 mL of the phospho-vanillin reagent were added for color development. After a 15-minute cooling period at 25 °C, absorbance was read on a Secoman-S1000 spectrophotometer.

Cell culture

The MCF-10A cell line was obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC) (Molsheim, France). The MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines were obtained from Cell biolabs, Inc. (San Diego, CA) and GenTarget (San Diego, CA), respectively. MCF-10A cells were grown

DMEM /F12 Ham's Mixture supplemented with 5% horse serum (Sigma-Aldrich), EGF (20 ng/ml, Sigma-Aldrich), insulin (10 μ g/ml, Sigma- Aldrich), hydrocortisone (0.5 mg/ml, Sigma-Aldrich), cholera toxin (100 ng/ml, Sigma-Aldrich), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. The other cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were placed in a humidified incubator kept at 37°C with 5% CO₂. For lipid extraction, cells were grown in T175 flask to 90-95% confluence and were washed with PBS. They were harvested using a cell scraper. Lipids from the cell pellets were extracted using the method Bligh and Dyer [13].

For fluorescent microscopy, cells were seeded on coverslips and incubated in complete media. After 1 day in culture, cells were fixed in 2% paraformaldehyde, incubated with 1% BSA in PBS, and incubated with 300 nM Nile red (in PBS containing calcium and magnesium (CM)). After several wash in PBS-CM cells were mounted using SlowFade® diamond antifade reagent containing the nuclear stain DAPI (Fischer Scientific). Cells were observed on a Nikon TI-S microscope and analyzed using the NIS-BR software (Nikon, France).

Results and Discussion

The method presented in this study was directly adapted from a TLC method previously used in our laboratory to separate fatty acids from triglycerides [17]. We tested it to determine whether we could simultaneously separate, detect, and quantify free cholesterol, non-esterified fatty acids, triglycerides, and cholesteryl esters (**Fig. 1**).

Calibration curves – Linearity and range

A mixture of chloroform and methanol (2:1, v/v) was used to prepare solutions for all lipids. Using an automated sample applicator, spots were made for each range of mixtures containing free cholesterol, non-esterified fatty acids, triglycerides, and cholesteryl esters at increasing concentrations. A range of concentrations (each one repeated 10 times) was loaded onto each plate. Plates after run and the resulting chromatograms (example presented **Fig. 2**) allowed us to obtain the calibration curves presented in **Fig. 3**. All lipids were well separated and formed identifiable bands.

Images of plates with standards were transferred to the Videoscan software. After densitometric analysis, calibration curves were obtained by plotting the peak area under the curve against the concentration of standards. Standard curves were obtained for each of the analyzed lipids. **Table 1** shows R_f values obtained for free cholesterol, non-esterified fatty acids, triglycerides and cholesteryl esters. In all cases, linearity was observed at levels ranging from:

- 1000 to 8000 ng/spot for free cholesterol (FC).
- 2000 to 8000 ng/spot for non-esterified fatty acids (NEFA).
- 2000 to 8000 ng/spot for triglycerides (TG).
- 1000 to 8000 ng/spot for cholesteryl esters (CE).

Correlation coefficients (r^2) are presented in **Table 2** for the calibration curves shown in **Fig. 3**. Linearity was confirmed using 10 measurements per concentration. Fives different plates were used.

Accuracy of the Method

We compared our technique with the method of Knight *et al.*, [16] originally used to quantify plasma lipids levels. This method was first adapted for oleic acid and compared to the original work of Knight *et al.* (**Fig. 4**). A small relative deviation of 1.6%, was observed. In a separate experiment, concentration ranges of triglycerides, non-esterified fatty acids, free cholesterol and cholesteryl esters were also analyzed with this spectrophotometric method (**Fig. 5**). The aim of this analysis was to compare the two methods (**Table 3**). In all cases, the HPTLC method presented in this work had a sensitivity comparable to that of the spectrophotometric analysis. However, our method allows for a broader range of lipid analysis than the sulfo-phospho vanillin assay, which is not lipid specific.

The accuracy of the method was also established using the recovery technique (i.e., external standard addition method). A known amount of standard was added at four different levels to a pre-analyzed sample. Each determination was performed three times. The results of the recovery study presented in **Table 4** were found to be within acceptable limits (value $\pm 10\%$).

Precision

Repeatability and intermediate precision were determined at different concentrations levels. The percent relative standard deviation (%RSD) values for repeatability and intermediate precision as shown in **Table 5** reveal that the proposed method is precise.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values are presented in **Table 6**. This method is therefore sensitive for our analyses. Importantly, the LOQ values determined as described in the Material and Method section (**Table 6**) are comparable to those derived from the method using the Eurachem approach (**Fig. 6**) [15].

Specificity and Selectivity

Specificity of the method was assessed by analyzing authentic lipid standards. Identity of the lipids present in three different mammary epithelial cell lines (MCF-10A, MCF-7, and MDA-MB-231; after Bligh and Dyer extraction [13]) was determined by comparison of the lipids' R_f with values obtained for authentic lipid standards (**Fig. 7**). All these cell lines contain triglycerides, non-esterified fatty acids, cholesteryl esters, and free cholesterol. This assay could allow us to determine the effect of a specific treatment on lipid metabolism (non-esterified fatty acids, free cholesterol, cholesteryl esters, triglycerides) using these cell lines. Interestingly, the MCF-7 cell line contains significantly less EC compared to the non cancerous MCF-10A cell line and the more aggressive MDA-MB-231 cell lines. FC, NEFA, and TG levels were not significantly different. The significance of the increased EC content observed in MCF-10A and MDA-MB231 cells remains to be determined. Importantly, these findings were confirmed by fluorescent microscopy using the neutral lipid stain, Nile Red (**Fig. 8**).

Finally, other related lipid species did not have the same R_f as those studied in the present work. Diacylglycerol and cardiolipin had R_f of 0.28 and 0.01, respectively. Importantly, all types of phospholipid remain at the origin.

Statistical analysis

For these lipid determinations, variance homogeneity of our data standard curve was verified using the Cochran's C test for homoscedasticity (**Table 6**). Furthermore, to validate the linear regression model and test if the slope was different from 0, a Fischer's test was applied. The value obtained for each lipid type was compared with the values from the F table. For this study, the test was accepted for all lipids at $p < 0.05$. Our accuracy results show that the values obtained by HPTLC are significantly correlated with the amounts of lipids used in each case (**Table 6**). It therefore validates the use of our method for the quantification of these lipids in plasma, tissue, or cell extracts.

Conclusions

The present study demonstrates that our HPTLC-densitometric analysis method is reproducible, repeatable, selective, and accurate for the analysis of the different lipids examined. Moreover, this technique is simple, fast, robust, and less expensive than HPLC. Multiple detection methods can be used in this context: UV (254 or 366 nm) or white light after derivatization using various reagents. However, we found that the system used in the present work gave the best results. Another important advantage is that several samples can be analyzed at once, thereby limiting the use of solvent and accelerating the analyses. Moreover, this method may allow us to quantify free cholesterol, cholesteryl esters, non-esterified fatty acids, and triglycerides present in plasma, adipose tissues, or other tissue/cell extracts containing these types of lipids. As an example, we show that this HPTLC-densitometry method can be routinely used for the quantification of these lipid classes in cancer cells.

Acknowledgements: This work was supported by the Faculty of Medicine at the University of Tours. JLGP was supported by Le Studium (Région Centre-Val de Loire, France). PGF was supported by grants from INCa PLBio (2018-145), the Lipids ARD2020-Biodrug project (Région Centre-Val de Loire, France), La Ligue contre le Cancer (Indre et Loire, Loir et Cher, and Vienne), by an Academic Research Grant from the Région Centre-Val de Loire (France) and by the Canceropole Grand-Ouest (Mature project). We thank Dr. Jacques Potier, Violetta Guerin, and Simon Bergerard for technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

For Peer Review

References

1. Radner FP, and Fischer J (2014) The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function. *Biochim Biophys Acta* 1841 : 409-415
2. Walenbergh SM, and Shiri-Sverdlov R (2015) Cholesterol is a significant risk factor for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 9 : 1343-1346
3. Yang X, Lee HM, and Chan JC (2015) Drug-subphenotype interactions for cancer in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 11 : 372-379
4. Perona JS (2017) Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochim Biophys Acta* 1859 : 1690-1703
5. Gutierrez-Pajares JL, Ben Hassen C, Chevalier S, and Frank PG (2016) SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer. *Front Pharmacol* 7 : 338
6. Voisin M, de Medina P, Mallinger A, Dalenc F, Huc-Claustre E, Leignadier J, Serhan N, Soules R, Segala G, Mougél A, Noguer E, Mhamdi L, Bacquie E, Iuliano L, Zerbinati C, Lacroix-Triki M, Chaltiel L, Filleron T, Cavailles V, Al Saati T, Rochaix P, Duprez-Paumier R, Franchet C, Ligat L, Lopez F, Record M, Poirot M, and Silvente-Poirot S (2017) Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 : E9346-E9355
7. Figiel S, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, Guibon R, Besson P, Tavernier E, Blanchet P, Multigner L, Bruyere F, Haillet O, Mathieu R, Vincendeau S, Rioux-Leclercq N, Lebdaï S, Azzouzi AR, Perrouin-Verbe MA, Fournier G, Doucet L, Rigaud J, Renaudin K, Maheo K, and Fromont G (2018) Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African-Caribbean and Caucasian patients. *Eur J Cancer* 91 : 107-115
8. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, Sotgia F, Lisanti MP, and Frank PG (2011) Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol* 178 : 402-412
9. Llaverias G, Danilo C, Wang Y, Witkiewicz AK, Daumer K, Lisanti MP, and Frank PG (2010) A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am J Pathol* 177 : 3180-3191
10. Goldberg IJ (2018) 2017 George Lyman Duff Memorial Lecture: Fat in the Blood, Fat in the Artery, Fat in the Heart: Triglyceride in Physiology and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38 : 700-706
11. Glass CK, and Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104 : 503-516
12. Ben-Shmuel S, Rostoker R, Scheinman EJ, and LeRoith D (2016) Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and Cancer: Epidemiology and Potential Mechanisms. *Handb Exp Pharmacol* 233 : 355-372
13. Bligh EG, and Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917
14. Guideline IHT (2005 Q2 (R1)) Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
15. Spangenberg B, Poole CF, and Weins C (2010) Planning an Analysis and Validation in TLC. *Quantitative Thin-Layer Chromatography*, Springer: Berlin, Heidelberg
16. Knight JA, Anderson S, and Rawle JM (1972) Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin Chem* 18 : 199-202
17. Maillot F, Garrigue MA, Pinault M, Objois M, Theret V, Lamière F, Hoinard C, Antoine JM, Lairon D, and Couet C (2005) Changes in plasma triacylglycerol concentrations after sequential lunch and dinner in healthy subjects. *Diabetes Metab* 31 : 69-77

Tables

Table 1: HPTLC profile of a standard lipid solution

Lipid	Peak Beginning		Peak Maximum			Peak End		Peak Area	
	Rf	H	Rf	H	[%]	Rf	H	A	[%]
CE	0.828	0.0	0.881	2121.8	30.05	0.897	0.0	24292.9	28.81
TG	0.769	0.0	0.800	646.1	9.15	0.825	9.8	7998.5	9.49
NEFA	0.359	26.1	0.413	506.8	7.18	0.473	19.1	9861.1	11.69
FC	0.179	210.8	0.203	3786.8	53.63	0.228	293.8	42168.7	50.01

Rf: retention factor, ratio distance migrated / total distance covered by the solvent.

H: peak height.

These values were obtained with 8 µg/spot for each lipid.

FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

Table 2: Linear regression data obtained for the different calibration curves

Lipid	Slope ($\pm$ RSD)	Correlation coefficient	Equation of the regression line (peak surface =slope x amount deposited)
FC	28590 ($\pm$ 3622)	0.9959	$y = 28590x + 1605$
NEFA	9182 ($\pm$ 1284)	0.9952	$y = 9182x + 49$
TG	7969 ($\pm$ 1371)	0.9933	$y = 7969x - 1300$
CE	26657 ($\pm$ 4621)	0.9940	$y = 26657x + 510$

FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

For Peer Review

Table 3: Comparison of the lipid analyses performed by HPTLC and using the spectrophotometer method

HPTLC Method			Spectrophotometry method		
Lipid	Concentration	Sensitivity	Lipid	Concentration	Sensitivity
TG	0.04 mg/mL	0.40 µg	TG	0.04 mg/mL	0.36 µg
NEFA	0.05 mg/mL	0,50 µg	NEFA	0.05 mg/mL	1.29 µg
FC	0.05 mg/mL	0,55 µg	FC	0.05 mg/mL	0.93 µg
CE	0.04 mg/mL	0,63 µg	CE	0.04 mg/mL	0,77 µg

FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

For Peer Review

Table 4: Recovery studies of the different lipids after 50%, 100% and 150% addition of the standard lipid solution

Lipid	Amount at 100% (μg)	Levels	Expected amount to be assayed (μg)	Area observed (AU)	Amount calculated (μg)	Recovery (% mean $\pm$ SD)	n
FC	4	50%	2	65084	1.99	99.00 $\pm$ 1.02	3
		100%	4	130569	4.00	100.00 $\pm$ 0.59	3
		150%	6	193568	5.93	98.90 $\pm$ 0.72	3
		200%	8	253054	7.75	96.90 $\pm$ 0.58	3
NEFA	4	50%	2	27574	1.98	99.00 $\pm$ 1.05	3
		100%	4	55833	4.00	100.00 $\pm$ 0.68	3
		150%	6	75504	5.41	90.00 $\pm$ 1.10	3
		200%	8	106589	7.63	95.00 $\pm$ 1.09	3
TG	4	50%	2	25092	1.97	99.00 $\pm$ 0.57	3
		100%	4	50916	4.00	100.00 $\pm$ 0.88	3
		150%	6	68614	5.39	90.00 $\pm$ 0.96	3
		200%	8	99580	7.82	97.70 $\pm$ 0.90	3
CE	4	50%	2	54984	1.82	91 $\pm$ 0.77	3
		100%	4	120823	4	100 $\pm$ 0.59	3
		150%	6	174019	5.76	96.00 $\pm$ 1.01	3
		200%	8	237512	7.86	98.28 $\pm$ 0.95	3

FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

Table 5: Repeatability and intermediate precision data for the different lipids

Quantity (µg)	2			
Lipid	FC	NEFA	TG	CE
Repeatability (%)	7.48	10.01	8.49	8.16
Intermediate precision (%)	7.49	13.60	11.60	10.97
Quantity (µg)	8			
Lipid	FC	NEFA	TG	CE
Repeatability (%)	6.20	7.44	11.46	8.96
Intermediate precision (%)	6.80	7.99	13.59	9.88

FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters. n = 10 for each concentration and each lipid.

Table 6: Method validation parameters for the quantification of the different lipids

Lipid	FC	NEFA	TG	CE
LOD (ng/spot)	556	1746	1284	639
LOQ (ng/spot)	913	3092	2596	1593
Regression coefficient	0.9858	0.9991	0.9993	0.9987
Cochran C (C_{calc}/C_{ref} , $p<0.01$)	0.4902/0.5702	0.4520/0.5702	0.3600/0.5702	0.3343/0.5702

FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

For Peer Review

Figure legends

Fig. 1: Lipid structure representations. a. Free cholesterol. b. Triglyceride. c. Cholesteryl ester. d. Non-esterified fatty acid. R1, R2, and R3 represent alkyl groups.

Fig. 2: Profile of a standard separation realized by HPTLC. Samples, in the form of 7-mm bands, were spotted at a constant application rate of 150 nL/s under nitrogen (6 bars). For development, the mobile phase used was a mixture of hexane:ether:acetic acid (70:30:1; v/v/v). Linear ascending development was carried out in a 20x10 cm twin trough glass chamber (Camag, Muttenz, Switzerland) pre-equilibrated with the mobile phase. Optimal chamber saturation time for the mobile phase was 15 min at room temperature. The length of development was 7 cm. Subsequent to the development, HPTLC plates were air-dried and then treated by immersion in a 50% perchloric acid solution for 2 min. After a 2-hour drying period, plates were placed on a plate heater to allow carbonization. Lane 1 to 9: standards curves of each class of lipids. Amounts of standard loaded (lane number: μg): 1: 1; 2: 2; 3: 3; 4: 4; 5: 5; 6: 6; 7: 7; 8: 8. Images of standards were transferred to the Videoscan software, and densitometric scan were obtained. The densitometric scan presented in this figure was obtained for the 8 μg standards. FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

Fig. 3: Calibration curves of the different lipids separated by HPTLC. Using an automated sample applicator, deposits were made for each range of mixtures containing free cholesterol, non-esterified fatty acids, triglycerides, and cholesteryl esters at increasing concentrations. Images of standards and samples were transferred to the Videoscan software (version 1.2), and calibration curves were obtained by plotting the peak area under the curve against the concentration of applied standards. Standard curves were obtained for all the analyzed lipids. FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

Fig. 4: Comparison of the methods from Knight et al. [16] with the present one for the analysis of oleic acid. After spectrophotometric quantification of lipids using the phospho-vanillin method [16], standard curves obtained for the newly developed method and the phospho-vanillin method were compared for oleic acid.

Fig. 5: Quantification of the various lipids using the methods from Knight et al. After spectrophotometric quantification of lipids using the phospho-vanillin method [16], standard curves obtained with the phospho-vanillin method were plotted for free cholesterol, triglycerides, cholesteryl esters, and oleic acid. FC: free cholesterol, NEFA: non-esterified fatty acids, TG: triglycerides, CE: cholesteryl esters.

Fig. 6: Precision profile obtained for the different lipids. RSD values were determined for analyses using 1-8µg of FC and CE or 2-8µg of NEFA and TG. LOQ values are indicated for an RSD of 10%.

Fig. 7: Analysis of a lipid extracts obtained from mammary cell lines. Cells were grown in DMEM 10% FBS. 10^6 cells were collected and lipids were extracted by the method of Bligh and Dyer [13]. After extraction, lipids were separated by HPTLC as described in the Material and Methods section. After quantification, the composition of each cell line for the four different lipids was reported per mg of cell proteins.

Fig. 8: Analysis of a neutral lipid content in human mammary cell lines by fluorescence microscopy using Nile Red. Cells were seeded on coverslips and incubated in complete media. After 1 day in culture, cells were fixed in 2% paraformaldehyde, incubated with 1% BSA in PBS, and incubated with 300 nM Nile red (in PBS containing calcium and magnesium (CM)). After several wash in PBS-CM cells were mounted using SlowFade® diamond antifade reagent containing DAPI. Cells were observed on a Nikon TI-S microscope and analyzed using

both NIS-BR software (Nikon, France). Red: Nile red staining (neutral lipids); blue: DAPI staining (nuclear stain).

For Peer Review

Figure 1

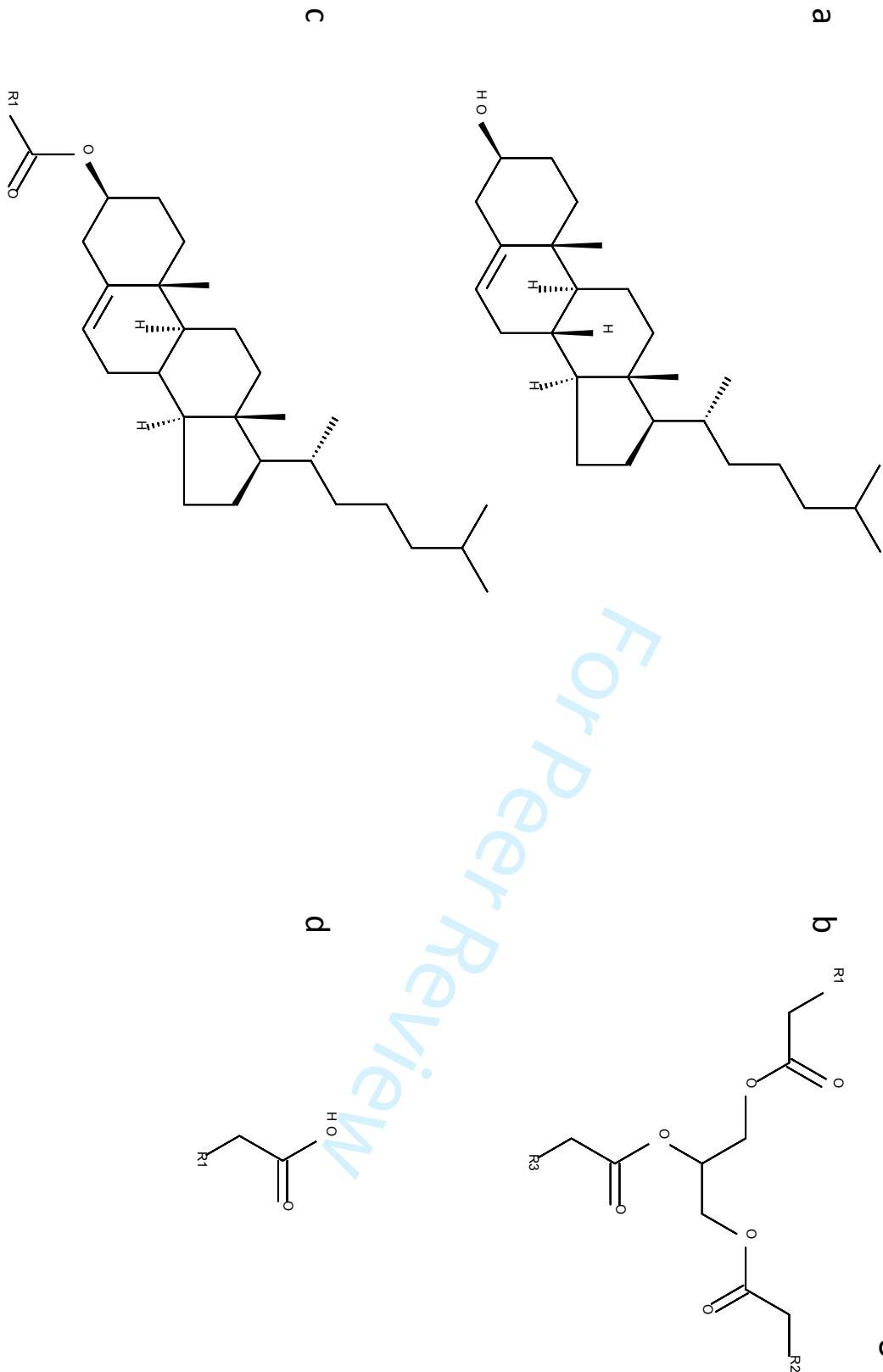
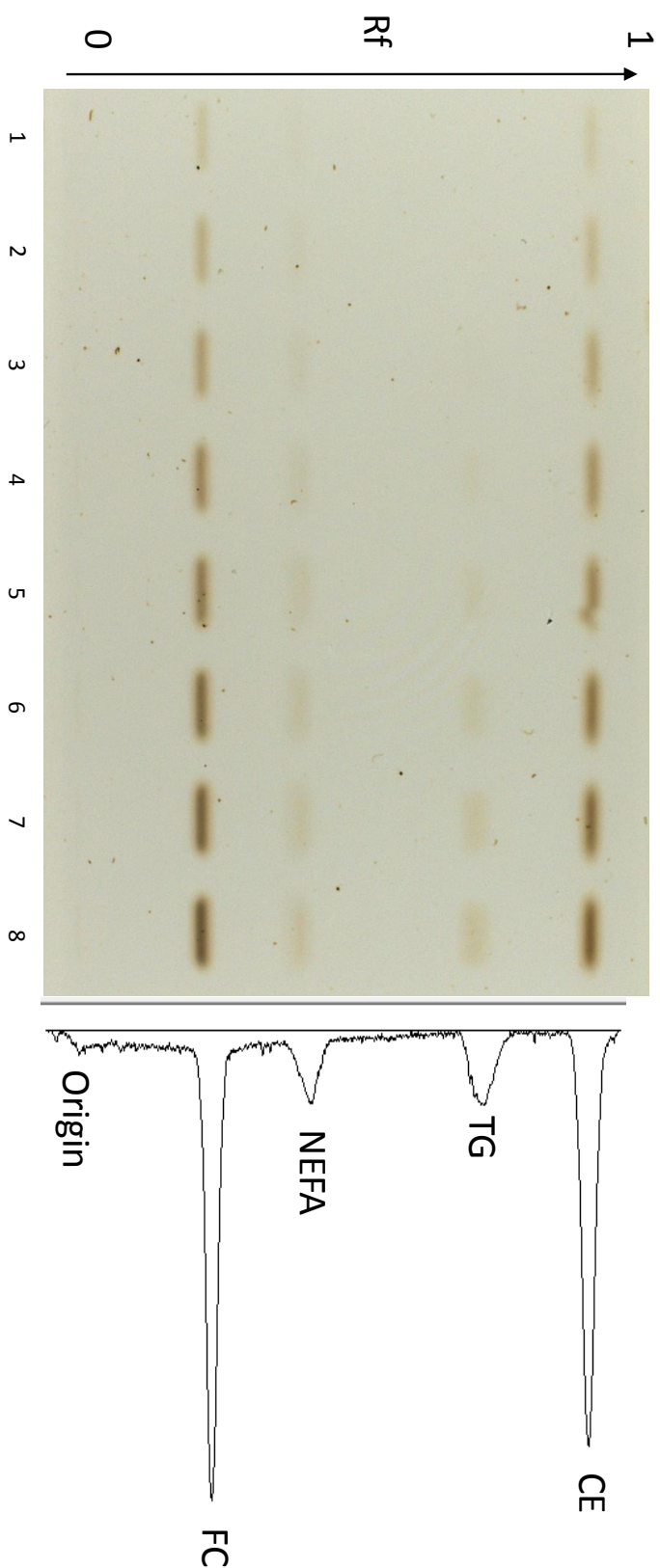


Figure 2



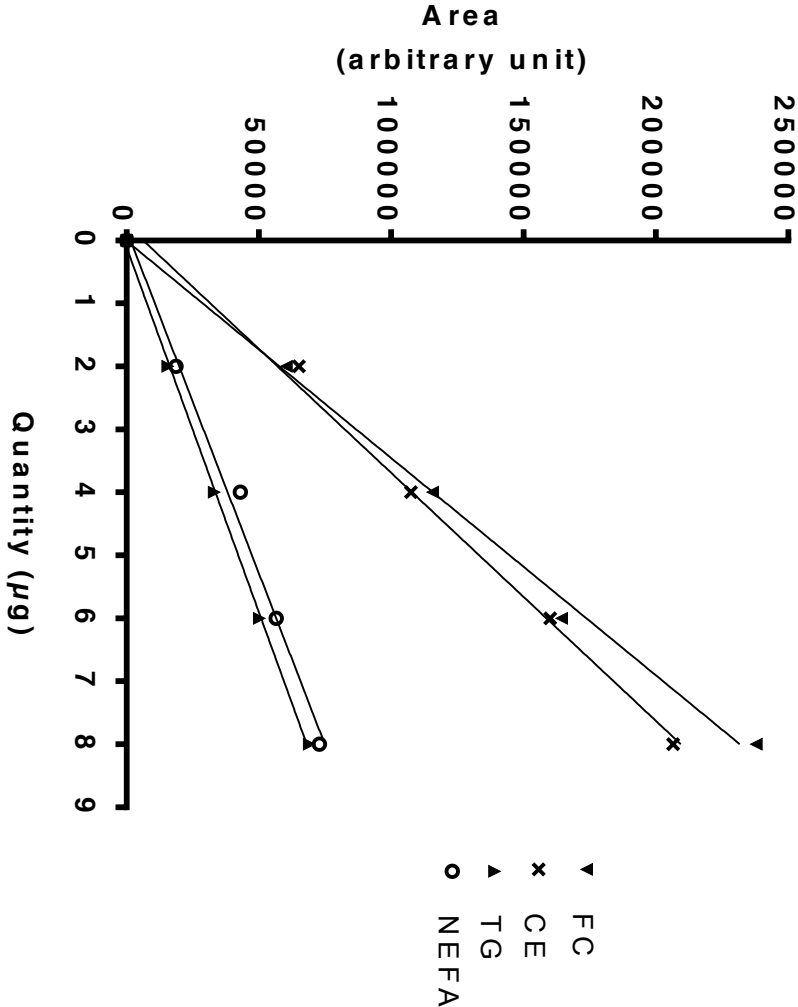


Figure 3

Figure 4

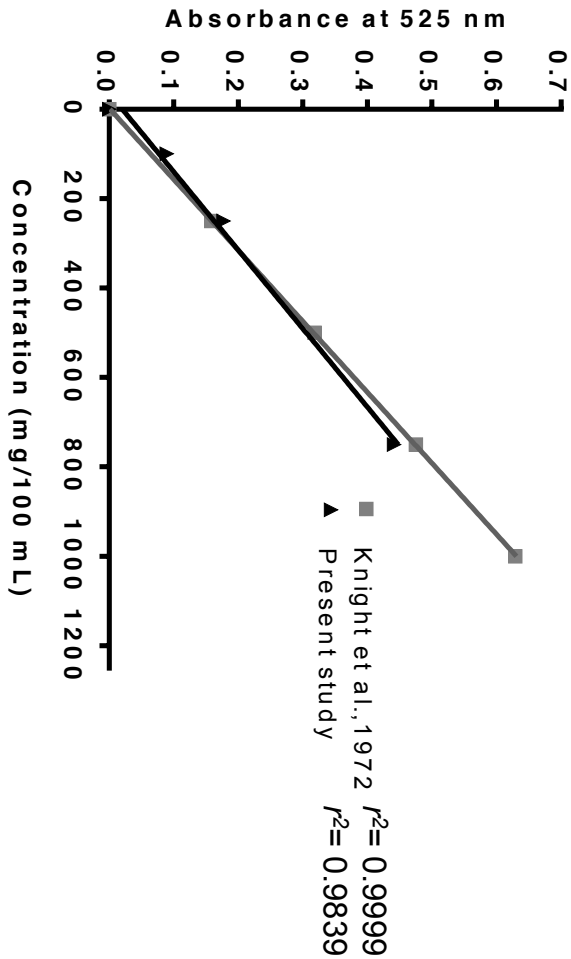


Figure 5

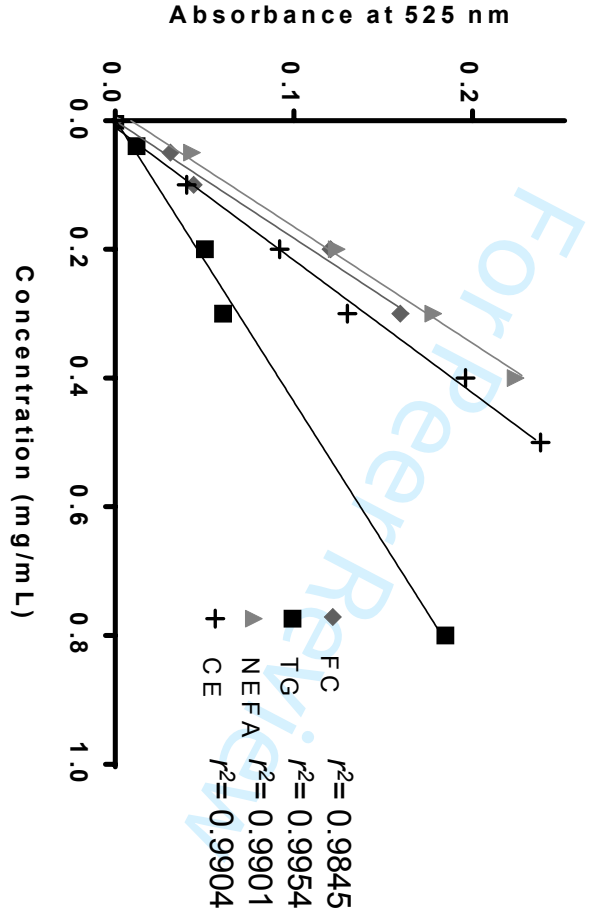
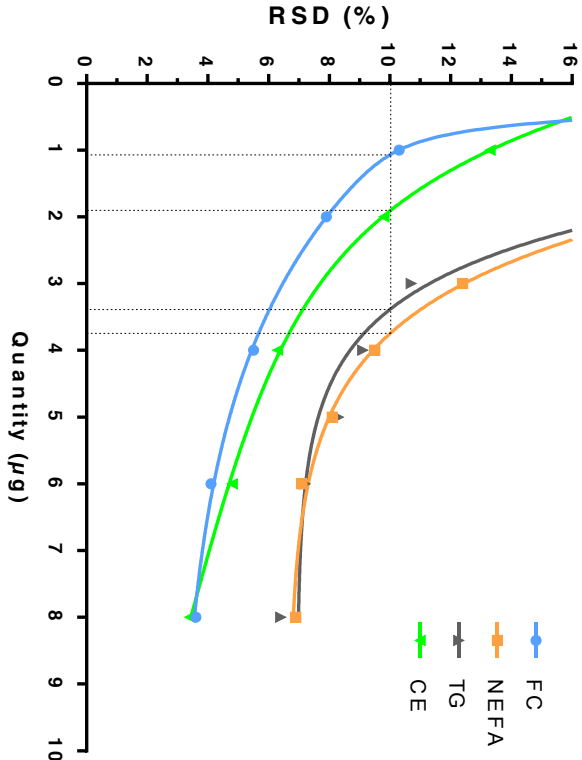


Figure 6



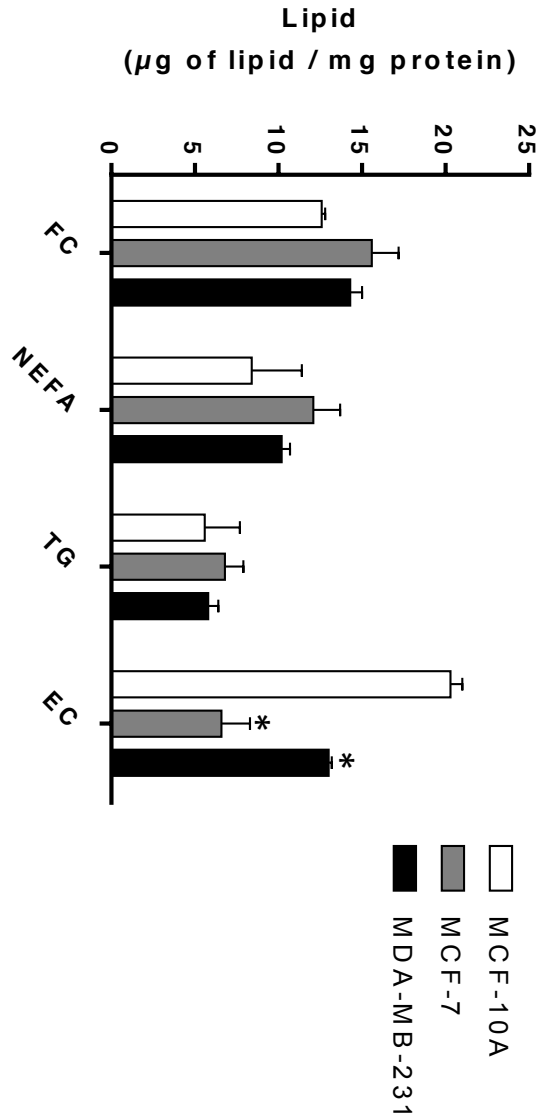
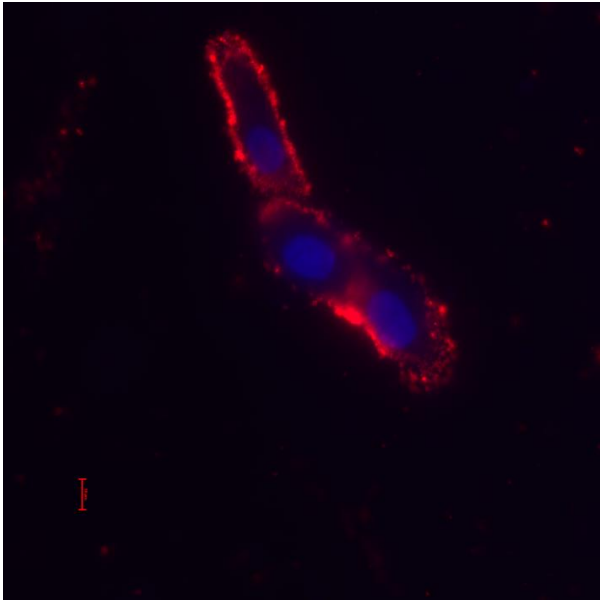


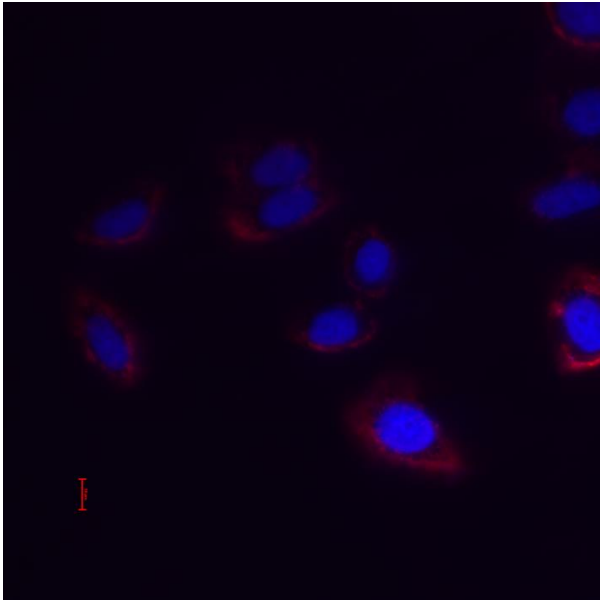
Figure 7

Figure 8

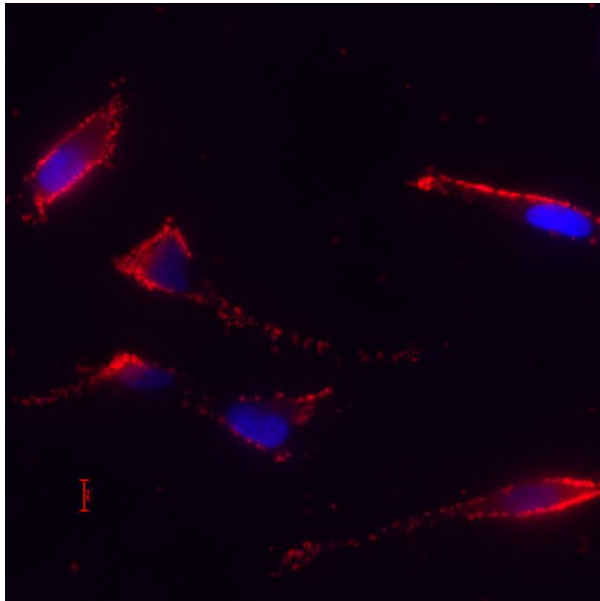
MCF-10A



MCF-7



MDA-MB231





SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer

Jorge L. Gutierrez-Pajares, Céline Ben Hassen, Stéphan Chevalier and Philippe G. Frank *

Université François Rabelais de Tours, Faculté de Médecine-INSERM UMR1069 "Nutrition, Croissance et Cancer", Tours, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Alan Remaley,
National Heart Lung and Blood
Institute (NIH), USA

Reviewed by:

Debangshu Samanta,
Johns Hopkins University, USA
Dhiraj Kumar,
National Centre for Cell Science, India

*Correspondence:

Philippe G. Frank
philippe.frank@univ-tours.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Molecular Targets and
Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 22 July 2016

Accepted: 12 September 2016

Published: 07 October 2016

Citation:

Gutierrez-Pajares JL, Ben Hassen C,
Chevalier S and Frank PG (2016)
SR-BI: Linking Cholesterol and
Lipoprotein Metabolism with Breast
and Prostate Cancer.
Front. Pharmacol. 7:338.
doi: 10.3389/fphar.2016.00338

Studies have demonstrated the significant role of cholesterol and lipoprotein metabolism in the progression of cancer. The *SCARB1* gene encodes the scavenger receptor class B type I (SR-BI), which is an 82-kDa glycoprotein with two transmembrane domains separated by a large extracellular loop. SR-BI plays an important role in the regulation of cholesterol exchange between cells and high-density lipoproteins. Accordingly, hepatic SR-BI has been shown to play an essential role in the regulation of the reverse cholesterol transport pathway, which promotes the removal and excretion of excess body cholesterol. In the context of atherosclerosis, SR-BI has been implicated in the regulation of intracellular signaling, lipid accumulation, foam cell formation, and cellular apoptosis. Furthermore, since lipid metabolism is a relevant target for cancer treatment, recent studies have focused on examining the role of SR-BI in this pathology. While signaling pathways have initially been explored in non-tumoral cells, studies with cancer cells have now demonstrated SR-BI's function in tumor progression. In this review, we will discuss the role of SR-BI during tumor development and malignant progression. In addition, we will provide insights into the transcriptional and post-transcriptional regulation of the *SCARB1* gene. Overall, studying the role of SR-BI in tumor development and progression should allow us to gain useful information for the development of new therapeutic strategies.

Keywords: SR-BI, cholesterol, lipoprotein, HDL cholesterol, breast cancer

INTRODUCTION

In human, cholesterol is transported by lipoproteins [i.e., low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL)], which permit its transfer to tissues. Cholesterol elimination from the body is performed via the reverse cholesterol transport pathway, which allows the transfer of peripheral cholesterol to HDL and eventually its transfer to the liver for excretion. Interestingly, solid tumors have been shown to accumulate greater amounts of cholesterol when compared to the host healthy tissues (Freeman and Solomon, 2004; Krycer and Brown, 2013; de Gonzalo-Calvo et al., 2015). Intratumor accumulation of cholesterol appears to be a consequence of both *de novo* synthesis and lipoprotein-mediated uptake (de Gonzalo-Calvo et al., 2015; Murai, 2015). In this mini-review, we will focus on the role of the HDL receptor, the scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the regulation of cholesterol and lipoprotein metabolism in the context of cancer. Although SR-BI's contributions to reverse cholesterol transport in cardiovascular diseases have been extensively studied, recent evidence has suggested that cholesterol and its metabolites may

play a critical role in cancer progression (Danilo and Frank, 2012; Silvente-Poirot and Poirot, 2012; Simko and Ginter, 2014; Kuzu et al., 2016).

SR-BI: INITIAL CHARACTERIZATIONS

SR-BI is a member of the Class B family of Scavenger Receptor proteins, which also include CD36 Antigen-like2 (LIMPII) and CD36 (Calvo et al., 1995). These three glycoproteins share a common structure: two transmembrane domains associated with two intracellular N- and C-termini and an extracellular glycosylated central domain. Initially, human SR-BI was termed CD36 and LIMPII Analogous-1 (CLA-1; Calvo and Vega, 1993) and was found to be highly expressed in adrenal glands (Liu et al., 1997), liver and steroidogenic tissues (Calvo et al., 1997). SR-BI is a receptor for HDL, and it promotes selective HDL-cholesteryl ester (HDL-CE) uptake by cells without particle uptake (Silver et al., 2000; Trigatti et al., 2000). Additionally, studies have shown that SR-BI can also promote the elimination of excess body cholesterol via biliary cholesterol secretion (Harder et al., 2007; Wiersma et al., 2009a,b).

SCARB1 GENE LOCALIZATION, SPLICE VARIANTS, AND PROTEIN DOMAINS

The gene encoding SR-BI has been designated *SCARB1*. Human *SCARB1* is located on chromosome 12 at q24.31 and comprises 13 exons and 12 introns that span over 86 kb. Due to alternative splicing sites, several mRNA variants of *SCARB1* have been identified (Webb et al., 1997, 1998). Interestingly, a short variant containing only the last 2 exons of *SCARB1* has been detected by next-generation sequencing in non-malignant adrenal glands and livers at relatively high levels (Carithers et al., 2015). Nevertheless, no experimental data has been reported on the physiological significance of this finding.

The predicted molecular weight of SR-BI is 56.9 kDa, but it is frequently detected as an 82 kDa protein after SDS-PAGE migration due to post-translational glycosylation (Acton et al., 1994; Babitt et al., 1997). Using SR-BI aminoacid sequence Q8WTV0-2 (UniProt, 2015), the following main domains of SR-BI can be identified: Cytoplasmic N-terminal domain (residues 1–11), transmembrane domain #1 (residues 12–32), extracellular domain (residues 33–440), transmembrane domain #2 (residues 441–461), and cytoplasmic C-terminal domain (residues 462–509). According to the UniProt website (accessed July 2016, UniProt, 2015), five protein variants may be produced by alternative splicing of human *SCARB1* mRNA: isoform 3 (Q8WTV0-1), the canonical sequence, represents the longest variant with 552 residues; isoform 1 (Q8WTV0-2), the first isoform identified and named SR-BI, with 509 residues; isoform 2 (Q8WTV0-3; aka, SR-BII), with 409 residues; isoform 4 (Q8WTV0-2; aka, SR-BIII), with 474 residues; and isoform 5 (Q8WTV0-5), with 506 residues. Isoforms 1, 2, and 4 share a common C-terminal sequence (468–552 aa) that includes the VLQEAKL sequence required to bind the PDZ domain-containing protein (PDZK1), which has also been described in the mouse sequence (Silver, 2002; Kocher et al., 2010). The

physiological relevance of these variants is not evident but SR-BII has been shown to display reduced selective cholesteryl ester uptake efficiency from HDL (Webb et al., 1998). SR-BI isoform distribution may also be altered in certain types of cancer (Arenas et al., 2004), compared to the corresponding healthy tissues, and it is possible that different SR-BI isoforms may have different ability to promote cholesterol entry or efflux. Therefore, these isoforms may differently regulate cholesterol homeostasis and/or signaling pathways involved in tumor progression.

REGULATIONS OF SCARB1 TRANSCRIPTION AND SR-BI PROTEIN LEVELS

Steroidogenic tissues (Cao et al., 1997; Azhar et al., 2003) and the liver (Malerød et al., 2002; Huby et al., 2006) present the highest levels of *SCARB1* transcript. Accordingly, a strong control over transcription of this gene has been recognized. mRNA transcription of *SCARB1* is finely regulated in cells that perform steroidogenesis, such as the ovaries (Li et al., 1998) and adrenal glands (Imachi et al., 1999). It has been shown that the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), via cAMP, can stimulate SR-BI expression in human adrenocortical cell lines and promotes the secretion of aldosterone and cortisol (Imachi et al., 1999). However, no canonical cAMP responsive element (CRE) has been found in the promoter of *SCARB1* (Towns and Menon, 2005). This finding suggests that activation via CREB may occur via non-canonical CRE elements or cAMP regulates the activity of other transcription factors. Several activators of *SCARB1* transcription have been identified in a variety of cell types. Activation by Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α and PPAR γ) promotes transcription of *SCARB1* in monocytes and macrophages (Chinetti et al., 2000). Similarly, activation of the Mek1/2/PPAR α pathway has been demonstrated to up-regulate SR-BI (Wood et al., 2011). SREBP-2, which is a key regulator of cholesterol metabolism, binds *SCARB1* promoter to induce *SCARB1* mRNA up-regulation (Tréguier et al., 2004). LXR α /RXR and LXR β /RXR have also been shown to induce *SCARB1* transcription in human and murine hepatoma cell lines and in 3T3-L1 preadipocytes independently of SREBP-1 (Malerød et al., 2002). In agreement with these findings, the LXR agonist T0901317 but not 22-(R)-hydroxycholesterol has been shown to induce an up-regulation of *SCARB1* mRNA in endothelial cells (Norata et al., 2005). Finally, 17 β -estradiol has also been shown to transcriptionally up-regulate SR-BI via PKC activation in vascular endothelial cells (Fukata et al., 2014). Taken together, these data show that regulation of *SCARB1* transcription is strongly controlled by signaling pathways involved in cellular lipid/cholesterol homeostasis. Therefore, it is not surprising to observe an upregulation of SR-BI in cancer cells (Table 1), which often display increased cellular cholesterol levels.

Furthermore, recent studies have also shown that the proto-oncogene c-Myc may play a role in the regulation of *SCARB1* transcription (Pello et al., 2012). Moreover, *in silico* nucleotide analysis of *SCARB1* promoter (nucleotide –499 to 100, LASAGNA Search 2.0) shows potential binding sites for

TABLE 1 | Expression of SR-BI in cancer tissues or cell lines and its association with malignant features.

Type of cancer	Type of sample	Expression levels (compared to non-malignant tissue or cells)	Associated with	References
Adrenocortical carcinomas	Tissue	Decreased	ND	Liu et al., 1997
Testicular seminoma	Tissue	Decreased	ND	Arenas et al., 2004
Leydig cell tumor	Tissue	Increased	ND	Liu et al., 1997
Breast	Tissue	Increased	ND	Cao et al., 2004
Breast	Tissue	Increased	More aggressive tumor type	Yuan et al., 2016
Prostate	Tissue	Increased	Increased malignancy and androgen-independent growth	Schorghofer et al., 2015
Nasopharyngeal carcinoma	Tissue	Increased	ND	Zheng et al., 2013
Nasopharyngeal carcinoma	Cell line	Increased	Enhanced cell migration but not proliferation	Zheng et al., 2013
Breast	Cell line	NA	Enhanced proliferation	Cao et al., 2004
Breast	Cell line	NA	Enhanced proliferation and migration, and tumor growth in xenograft tumor model	Danilo et al., 2013
Prostate	Cell line	NA	PSA production and cell viability	Twiddy et al., 2012
Breast	PyMTtg mouse model	Increased	Tumor growth	Llaverias et al., 2011
Prostate	TRAMP mouse model	Increased	Tumor growth	Llaverias et al., 2010

ND, not determined; NA, not applicable.

c-Myc, Stat proteins, PPAR γ , p53, and NF- κ B. Given the role of transcription factors such as c-Myc, p53, Stat in cancer, additional studies should be designed to better understand the role of these transcription factors in the regulation of SR-BI expression in cancer.

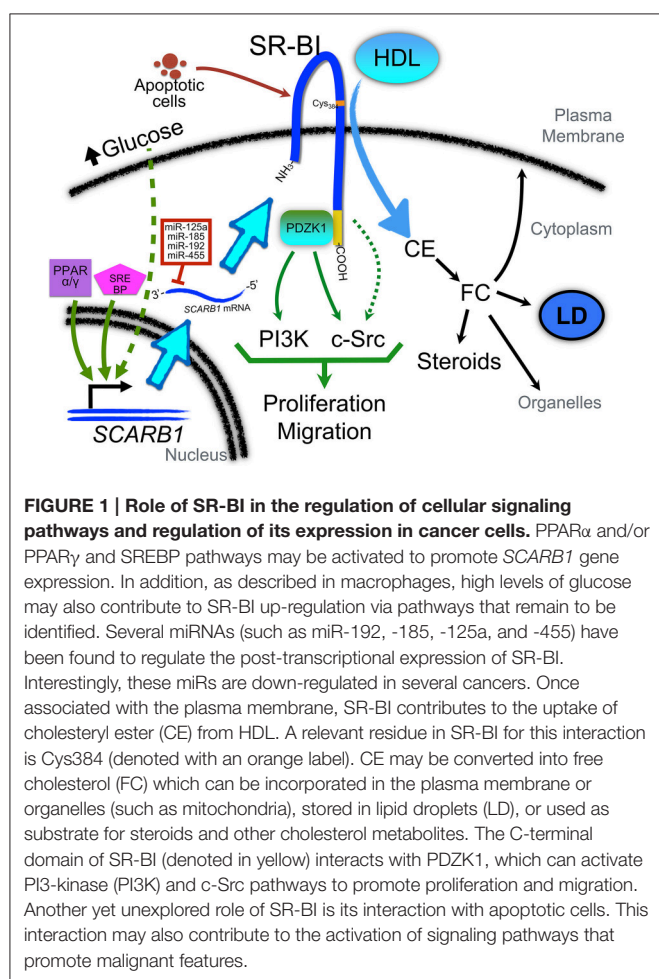
In addition to transcription factors regulating gene expression, mRNA levels of *SCARB1* can also be regulated by microRNAs (miRNAs), which can bind the 3'-UTR of mRNA. Studies have shown that miR-125a and miR-455 can reduce both mRNA and protein levels of SR-BI in steroidogenic cells (Hu et al., 2012). Similarly, miR-185, -96, and -223 have been shown to decrease mRNA levels of *SCARB1* in HepG2 cells (Wang et al., 2013). Finally, miR-192 was found to directly target *SCARB1* mRNA in adipocytes (Mysore et al., 2016). Although no data on the role of these miRNAs in the context of *SCARB1* and cancer is available, recent studies have shown that levels of miR-125a (Guo et al., 2009; He et al., 2015; Tong et al., 2015; Lee et al., 2016), miR-455 (Chai et al., 2015; Li et al., 2016), miR-185 (Qu et al., 2013; Fu et al., 2014; Tang et al., 2014; Li et al., 2015; Zhang et al., 2015), and miR-192 (Feng et al., 2011; Geng et al., 2014; Sun et al., 2016) are down-regulated in several types of cancer. These findings suggest that *SCARB1* post-transcriptional regulation may be altered to promote SR-BI expression in cancer cells.

A post-translational regulation of SR-BI has also been described. In this case, PDZK1 has been shown to physically interact with SR-BI via a 7-residue domain present in the C-terminal domain (Silver, 2002; Kocher et al., 2010). This interaction was demonstrated to be essential for SR-BI post-transcriptional stabilization in a tissue-dependent manner (Kocher et al., 2003) and localization to the plasma membrane of hepatocytes (Silver, 2002; Kocher et al., 2003) but not relevant for its selective HDL-CE uptake function (Silver, 2002). Importantly, phosphorylation of serine 509 of PDZK1 is crucial for SR-BI stabilization (Nakamura et al., 2005). Despite these findings, the role of PDZK1 in SR-BI post-translational regulation does

not appear to be required in all cell types. In fact, absence of PDZK1 does not affect SR-BI levels in murine steroidogenic tissues (Kocher et al., 2003) and human endothelial cells (Kimura et al., 2006). Remarkably, recent studies have demonstrated that PDZK1 expression is correlated with Akt activation in the MCF-7 breast cancer cell line (Kim et al., 2014). This observation implies a positive feedback regulation between PI3K/AKT and SR-BI since PI3K is activated by SR-BI (Kimura et al., 2006). Alternatively, SR-BI protein levels may be regulated by Mek1/2, which prevents SR-BI proteosomal degradation in hepatocytes (Wood et al., 2011). Taken together, these studies highlight the complex regulation of *SCARB1*/SR-BI transcription/expression levels.

SIGNALING PATHWAYS REGULATED BY SR-BI AND HDL

Few data are currently available concerning the signaling pathways activated or repressed by SR-BI in cancer cells. We have previously reported that HDL/SR-BI interaction can activate both PI3K and Erk1/2 pathways in two breast cancer cell lines (Danilo et al., 2013). These findings are consistent with results obtained with endothelial cells (Kimura et al., 2010). Besides, SR-BI also interacts with PDZK1, and this interaction is required to mediate eNOS activation and endothelial cell migration. Interestingly, PDZK1 is not required for HDL binding, SR-BI plasma membrane localization, nor cholesteryl ester uptake (Zhu et al., 2008). It has been proposed that PDZK1 is important for HDL/SR-BI-mediated activation of the PI3K (Kimura et al., 2006) and c-Src (Zhu et al., 2008) pathways, and stimulation of migration in endothelial cells (Zhu et al., 2008; **Figure 1**). Importantly, activation of this signaling cascade has been shown to require the interaction of c-Src and SR-BI cytoplasmic C-terminal domain (Seetharam et al., 2006; Zhu et al., 2008).



Signaling pathways activated by another member of the class B scavenger receptor, CD36, have also been investigated. The C-terminal domain of CD36 has been shown to also physically interact with Src family non-receptor tyrosine kinases (Moore et al., 2002; Rahaman et al., 2006; Tao et al., 2015) that activates a cascade of signaling molecules such as MAPK, p38, JNK, FAK, and GTPases (reviewed in Park, 2014). Conversely, over-expression of a mutant version of SR-BI (lacking the C-terminal residues 465 to 509) has been shown to prevent HDL-induced proliferation in the MCF-7 breast cancer cell line (Cao et al., 2004). Since MCF-7 endogenously express significant levels of SR-BI (Danilo et al., 2013), the later finding implies a competitive effect for the SR-BI mutant in binding HDL and regulating downstream signaling pathways. Taken together, these data suggest a relevant role for the C-terminal domain of SR-BI in cell proliferation of breast cancer cells.

SR-BI, REGULATION OF CELLULAR CHOLESTEROL HOMEOSTASIS AND CANCER

The role of cholesterol in tumor progression has been extensively studied in the past decade. Cholesterol has been shown

to regulate essential signaling pathways involved in cellular proliferation, migration, survival, thereby promoting cancer progression. In that regard, several studies have shown that plasma membrane cholesterol plays an important role in these pathways (Zhuang et al., 2005). Furthermore, SR-BI has been shown to regulate cellular cholesterol homeostasis (Phillips, 2014). While CD36 localization in cholesterol-rich plasma membrane and interaction with caveolin-1 has clearly been established (Frank et al., 2002; Ring et al., 2006; Thorne et al., 2006), contradictory results have been obtained concerning SR-BI and its interaction with specific plasma membrane domains and cholesterol. Initial studies by Babitt et al. (1997) have suggested that SR-BI colocalizes with caveolae and is fatty acylated in the CHO-IIdla7-mSR-BI and Y1-BS1 cell lines. These findings were confirmed by us using COS-7 (Frank et al., 2002) but Rhainds et al. found SR-BI in lipid raft membrane domains devoid of caveolin-1 in HepG2 cells (Rhainds et al., 2004). However, other studies using W138[SR-BI] and ACTH-treated murine adrenal Y1-BS1 cells showed that SR-BI was preferentially associated with non-detergent-resistant membranes and no interaction with caveolin-1 was needed to reach the plasma membrane (Peng et al., 2004). Specific culture conditions or cell types may explain some of the observed contradictory results. Nevertheless, the C-terminal transmembrane domain of SR-BI has been shown to interact with cholesterol, and this domain may act as a cholesterol-sensing domain, which function remains to be established (Assanasen et al., 2005). While we have shown that the downregulation of SR-BI in breast cancer cell lines is associated with reduced cellular cholesterol content and reduced tumor aggressivity (Danilo et al., 2013), it remains to be determined whether SR-BI-regulated signaling pathways and cholesterol homeostasis can be uncoupled.

ROLE OF SR-BI IN CANCER

Although no study examining the role for SR-BI in the promotion of cell transformation has been performed, it has been recognized that cancer cells can use the HDL/SR-BI pathway to take up cholesteryl ester and enhance malignant phenotypes (Figure 1; Danilo et al., 2013; Zheng et al., 2013). As shown in Table 1, SR-BI expression is up-regulated in Leydig cell tumors, nasopharyngeal carcinoma, and breast and prostate cancers. Among these cancers, the role of HDL/SR-BI in breast and prostate cancers have been the most extensively studied. The breast cancer cell line HBL-100 can take up cholesteryl ester from apoE-depleted HDL₃ via SR-BI (Pussinen et al., 2000). Additionally, over-expression of SR-BI can enhance HDL-mediated proliferation of the breast cancer cell line MCF-7 via the PI3K/AP-1 pathway (Cao et al., 2004). In further support of a role for HDL/SR-BI in breast cancer growth, we have also demonstrated that HDL/SR-BI interaction is required for breast cancer cells to proliferate and migrate *in vitro*, and SR-BI promotes the growth of tumors *in vivo* (Danilo et al., 2013). Similarly, proliferation of mesenchymal stem cells is also enhanced by HDL/SR-BI interaction where MAPK/ERK1/2 and PI3K/AKT pathways have

been implicated (Xu et al., 2012). Conversely, down-regulation of SR-BI in prostate cancer cells (C4-2 and LNCap cell lines) has been shown to cause a significant reduction in cellular viability and PSA secretion (Twiddy et al., 2012) and inhibit cellular motility in a wound-healing assay of nasopharyngeal cancer cell lines (Zheng et al., 2013). However, studies by Sekine et al. have shown that SR-BI did not regulate HDL-mediated proliferation of the PC-3 prostate cancer cell line (Sekine et al., 2010). Nevertheless, down-regulation of SR-BI has also been observed in adrenocortical carcinomas and testicular seminoma (Table 1). The reasons for these differences are not clear but may involve different requirements for cholesterol uptake by the tumors. In the later cases, cholesterol levels may not be a rate-limiting factor for tumor growth. Alternatively, other isoforms of SR-BI or alternative cholesterol uptake pathways may be upregulated and allow the maintenance of a “tumor specific cholesterol homeostasis.”

While SR-BI mediates HDL-CE uptake in hepatocytes, in peripheral tissues, SR-BI binding to HDL can stimulate a net exit of cholesterol via cholesterol efflux from intracellular stores. In cancer, efflux and influx might be finely regulated to ensure the maintenance of high levels of intracellular cholesterol within proliferative cancer cells. The direction of cholesterol flux may depend on the specific and respective properties of cholesterol acceptors and cellular plasma membrane. Cholesterol efflux mediated by SR-BI highly correlates with HDL phospholipid content present in serum (Fournier et al., 1996, 1997). To further test the role of phospholipid, reconstituted HDL enriched with phosphatidylcholine or sphingomyelin have been used to study efflux and influx mediated by SR-BI in CHO cells (Yancey et al., 2000). It was concluded that sphingomyelin-enriched HDL enhanced net efflux by decreasing SR-BI-mediated cholesterol influx, whereas phosphatidylcholine enrichment of HDL increased SR-BI-mediated efflux (Yancey et al., 2000). However, it is currently unknown if the same mechanisms can regulate cholesterol homeostasis in cancer cells.

When the concentration of glucose is abnormally elevated as in diabetes, cholesterol metabolism in macrophages is impaired (Hayek et al., 2007; Zhou et al., 2008). Interestingly, a glucose-concentration-dependent increase in SR-BI mRNA and protein levels has been proposed as an explanation for the abnormal cholesterol metabolism observed in macrophages and other cells (Tu and Albers, 2001). Moreover, elevated glucose concentrations can reduce HDL-mediated cholesterol efflux and increase total macrophage cholesterol levels (Gantman et al., 2010). Importantly, glucose uptake is remarkably enhanced in tumors (Cantor and Sabatini, 2012), and previous studies have demonstrated a pro-proliferative role of glucose in the regulation of cellular proliferation of cancer cells (Masur et al., 2011). Since glucose and lipid metabolism are interconnected (reviewed in (Dang, 2012)), these findings suggest that tumor cell exposure to glucose may contribute in cancer cells to SR-BI upregulation that may participate in cancer progression (Figure 1). Interestingly, HDL has also been shown to regulate glucose metabolism in various cell types (Siebel et al., 2015).

DEVELOPMENT OF SR-BI INHIBITORS

SR-BI effect on cholesterol transport has been extensively studied in cardiovascular diseases. Not surprisingly, pharmacological drugs that block SR-BI-mediated HDL-CE uptake have been developed in this particular context. Strategies have been applied to design new specific compounds to target SR-BI. Using high-throughput screening (HTS), BLT-1 (block lipid transport 1) was found to specifically inhibit SR-BI lipid transfer (Niemand et al., 2002). This inhibitor blocks entry of HDL-CE by targeting Cys384 in the extracellular domain of SR-BI (Yu et al., 2011). Importantly, our group has reported that BLT-1 can inhibit SR-BI-mediated cellular proliferation in breast cancer cells (Danilo et al., 2013). Another small molecule, ITX5061, has been shown to increase plasma HDL levels in wild type and human apoA-I transgenic mice in an SR-BI-dependent manner (Masson et al., 2009). Around a decade after BLT-1 discovery, new molecules (ML278, ML279, ML312) were identified by HTS as potent inhibitors with less deleterious effects than ITX5061 and BLT-1 (Faloon et al., 2010a,b,c). More recently, using structural comparative analysis to ITX-5061, a non-absorbable potent compound inhibiting SR-BI has been identified (Sparks et al., 2016).

Antibodies against the extracellular domain of SR-BI have also been developed to prevent HDL binding. Accordingly, a neutralizing antibody against aminoacids 174–356 of murine SR-BI can block both HDL binding and selective cholesteryl ester uptake in murine macrophages (Chen et al., 2000). These new compounds should bring scientists new tools to investigate the role of SR-BI in cancer development and permit the identification of new strategies to inhibit tumor growth and cancer progression.

Recent works have also demonstrated that mimetics of HDL (a.k.a., nanoparticles) can target cells expressing SR-BI. In these cases, studies have shown that tumor cells overexpressing SR-BI could be targeted by nanocomplexes, which may promote the transfer of lipoprotein-derived cargo content (Zheng et al., 2013; McMahon et al., 2015; Julovi et al., 2016). While this approach appears to be efficient, it is important to note that SR-BI is also present at the surface of important non-tumor cells (e.g., hepatocytes, endothelial cells...). Therefore, targeting SR-BI at the surface of tumor cells will require the development of new methods allowing the specific targeting of these cell types.

CONCLUSIONS

Additional studies remain to be performed to better establish the role of SR-BI in cancer. In particular, the role of the different sub-populations of HDL and of other lipoproteins such as LDL needs to be better characterized. Moreover, it remains to be determined whether SR-BI can regulate concomitantly cellular cholesterol homeostasis and various cellular signaling pathways. Therefore, the development of new types of SR-BI inhibitors and the identification of their mechanism of action should provide new information. Alternatively, the use of SR-BI mutants and/or SR-BI/CD36 chimeric constructs should also allow us to better understand the role of SR-BI in cancer.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed significantly to this review. PF and JG design, wrote and review the manuscript. CB and SC contributed to the discussion and correction of the manuscript.

REFERENCES

- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., and Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 21003–21009.
- Arenas, M. I., Lobo, M. V., Caso, E., Huerta, L., Paniagua, R., and Martín-Hidalgo, M. A. (2004). Normal and pathological human testes express hormone-sensitive lipase and the lipid receptors CLA-1/SR-BI and CD36. *Hum. Pathol.* 35, 34–42. doi: 10.1016/j.humpath.2003.08.015
- Assanasen, C., Mineo, C., Seetharam, D., Yuhanna, I. S., Marcel, Y. L., Connelly, M. A., et al. (2005). Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J. Clin. Invest.* 115, 969–977. doi: 10.1172/JCI23858
- Azhar, S., Leers-Sucheta, S., and Reaven, E. (2003). Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues: the SR-BI and 'selective' pathway connection. *Front. Biosci.* 8, s998–s1029. doi: 10.2741/1165
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G., Xu, S., et al. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 272, 13242–13249. doi: 10.1074/jbc.272.20.13242
- Calvo, D., Dopazo, J., and Vega, M. A. (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* 25, 100–106. doi: 10.1016/0888-7543(95)80114-2
- Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Lasunción, M. A., and Vega, M. A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2341–2349. doi: 10.1161/01.ATV.17.11.2341
- Calvo, D., and Vega, M. A. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem.* 268, 18929–18935.
- Cantor, J. R., and Sabatini, D. M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* 2, 881–898. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0345
- Cao, G., Garcia, C. K., Wyne, K. L., Schultz, R. A., Parker, K. L., and Hobbs, H. H. (1997). Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J. Biol. Chem.* 272, 33068–33076. doi: 10.1074/jbc.272.52.33068
- Cao, W. M., Murao, K., Imachi, H., Yu, X., Abe, H., Yamauchi, A., et al. (2004). A mutant high-density lipoprotein receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 64, 1515–1521. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0675
- Carithers, L. J., Ardlie, K., Barcus, M., Branton, P. A., Britton, A., Buia, S. A., et al. (2015). A novel approach to high-quality postmortem tissue procurement: the GTEx project. *Biopreserv. Biobank.* 13, 311–319. doi: 10.1089/bio.2015.0032
- Chai, J., Wang, S., Han, D., Dong, W., Xie, C., and Guo, H. (2015). MicroRNA-455 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer by targeting RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase. *Tumour Biol.* 36, 1313–1321. doi: 10.1007/s13277-014-2766-3
- Chen, W., Silver, D. L., Smith, J. D., and Tall, A. R. (2000). Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 30794–30800. doi: 10.1074/jbc.M004552200
- Chinetti, G., Gbaguidi, F. G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., et al. (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101, 2411–2417. doi: 10.1161/01.CIR.101.20.2411

ACKNOWLEDGMENTS

JG is a researcher supported by Le Studium (Région Centre-Val de Loire, France). PF is currently supported by a grant from the LIPIDS ARD2020-Biopharmaceuticals project (Région Centre-Val de Loire, France).

- Dang, C. V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 26, 877–890. doi: 10.1101/gad.189365.112
- Danilo, C., and Frank, P. G. (2012). Cholesterol and breast cancer development. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 677–682. doi: 10.1016/j.coph.2012.07.009
- Danilo, C., Gutierrez-Pajares, J. L., Mainieri, M. A., Mercier, I., Lisanti, M. P., and Frank, P. G. (2013). Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development. *Breast Cancer Res.* 15:R87. doi: 10.1186/bcr3483
- de Gonzalo-Calvo, D., López-Vilaró, L., Nasarre, L., Perez-Olabarria, M., Vazquez, T., Escuin, D., et al. (2015). Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* 15:460. doi: 10.1186/s12885-015-1469-5
- Faloon, P. W., Dockendorff, C., Germain, A., Yu, M., Nag, P. P., Youngsaye, W., et al. (2010b). A Small Molecule Inhibitor of Scavenger Receptor BI-Mediated Lipid Uptake-Probe 2. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD).
- Faloon, P. W., Dockendorff, C., Youngsaye, W., Yu, M., Nag, P. P., Lewis, T. A., et al. (2010a). A Small Molecule Inhibitor of Scavenger Receptor BI-Mediated Lipid Uptake-Probe 1. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD).
- Faloon, P. W., Dockendorff, C., Yu, M., Bennion, M., Johnston, S., Negri, J., et al. (2010c). A Small Molecule Inhibitor of Scavenger Receptor BI-Mediated Lipid Uptake-Probe 3. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD).
- Feng, S., Cong, S., Zhang, X., Bao, X., Wang, W., Li, H., et al. (2011). MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 39, 6669–6678. doi: 10.1093/nar/gkr232
- Fournier, N., de la Llera Moya, M., Burkey, B. F., Swaney, J. B., Paterniti, J. Jr., Moatti, N., et al. (1996). Role of HDL phospholipid in efflux of cell cholesterol to whole serum: studies with human apoA-I transgenic rats. *J. Lipid Res.* 37, 1704–1711.
- Fournier, N., Paul, J. L., Atger, V., Cogny, A., Soni, T., de la Llera-Moya, M., et al. (1997). HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2685–2691. doi: 10.1161/01.ATV.17.11.2685
- Frank, P. G., Marcel, Y. L., Connelly, M. A., Lublin, D. M., Franklin, V., Williams, D. L., et al. (2002). Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 41, 11931–11940. doi: 10.1021/bi0257078
- Freeman, M. R., and Solomon, K. R. (2004). Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 91, 54–69. doi: 10.1002/jcb.10724
- Fu, P., Du, F., Yao, M., Lv, K., and Liu, Y. (2014). MicroRNA-185 inhibits proliferation by targeting c-Met in human breast cancer cells. *Exp. Ther. Med.* 8, 1879–1883. doi: 10.3892/etm.2014.1999
- Fukata, Y., Yu, X., Imachi, H., Nishiuchi, T., Lyu, J., Seo, K., et al. (2014). 17beta-Estradiol regulates scavenger receptor class BI gene expression via protein kinase C in vascular endothelial cells. *Endocrine* 46, 644–650. doi: 10.1007/s12020-013-0134-5
- Gantman, A., Fuhrman, B., Aviram, M., and Hayek, T. (2010). High glucose stimulates macrophage SR-BI expression and induces a switch in its activity from cholesterol efflux to cholesterol influx. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 523–528. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.091

- Geng, L., Chaudhuri, A., Talmon, G., Wisecarver, J. L., Are, C., Brattain, M., et al. (2014). MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer. *Oncogene* 33, 5332–5340. doi: 10.1038/onc.2013.478
- Guo, X., Wu, Y., and Hartley, R. S. (2009). MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol.* 6, 575–583. doi: 10.4161/rna.6.5.10079
- Harder, C. J., Meng, A., Rippstein, P., McBride, H. M., and McPherson, R. (2007). SR-BI undergoes cholesterol-stimulated transcytosis to the bile canaliculus in polarized WIF-B cells. *J. Biol. Chem.* 282, 1445–1455. doi: 10.1074/jbc.M604627200
- Hayek, T., Kaplan, M., Kerry, R., and Aviram, M. (2007). Macrophage NADPH oxidase activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: a stimulatory role for D-glucose. *Atherosclerosis* 195, 277–286. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.026
- He, H., Xu, F., Huang, W., Luo, S. Y., Lin, Y. T., Zhang, G. H., et al. (2015). miR-125a-5p expression is associated with the age of breast cancer patients. *Genet. Mol. Res.* 14, 17927–17933. doi: 10.4238/2015.December.22.17
- Hu, Z., Shen, W. J., Kraemer, F. B., and Azhar, S. (2012). MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 5035–5045. doi: 10.1128/MCB.01002-12
- Huby, T., Doucet, C., Dacht, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., et al. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J. Clin. Invest.* 116, 2767–2776. doi: 10.1172/JCI26893
- Imachi, H., Murao, K., Sayo, Y., Hosokawa, H., Sato, M., Niimi, M., et al. (1999). Evidence for a potential role for HDL as an important source of cholesterol in human adrenocortical tumors via the CLA-1 pathway. *Endocr. J.* 46, 27–34. doi: 10.1507/endocrj.46.27
- Julovic, S. M., Xue, A., Thanh, L. T., Gill, A. J., Bulanadi, J. C., Patel, M., et al. (2016). Apolipoprotein A-II plus lipid emulsion enhance cell growth via SR-BI and target pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE* 11:e0151475. doi: 10.1371/journal.pone.0151475
- Kim, H., Abd Elmageed, Z. Y., Davis, C., El-Bahrawy, A. H., Naura, A. S., Ekaidi, I., et al. (2014). Correlation between PDZK1, Cdc37, Akt and breast cancer malignancy: the role of PDZK1 in cell growth through Akt stabilization by increasing and interacting with Cdc37. *Mol. Med.* 20, 270–279. doi: 10.2119/molmed.2013.00166
- Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Damirin, A., Ishizuka, T., et al. (2006). Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 37457–37467. doi: 10.1074/jbc.M605823200
- Kimura, T., Tomura, H., Sato, K., Ito, M., Matsuoka, I., Im, D. S., et al. (2010). Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 285, 4387–4397. doi: 10.1074/jbc.M109.043869
- Kocher, O., Birrane, G., Tsukamoto, K., Fenske, S., Yesilaltay, A., Pal, R., et al. (2010). *In vitro* and *in vivo* analysis of the binding of the C terminus of the HDL receptor scavenger receptor class B, type I (SR-BI), to the PDZ1 domain of its adaptor protein PDZK1. *J. Biol. Chem.* 285, 34999–35010. doi: 10.1074/jbc.M110.164418
- Kocher, O., Yesilaltay, A., Cirovic, C., Pal, R., Rigotti, A., and Krieger, M. (2003). Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 52820–52825. doi: 10.1074/jbc.M310482200
- Krycer, J. R., and Brown, A. J. (2013). Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 219–229. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.01.002
- Kuzu, O. F., Noory, M. A., and Robertson, G. P. (2016). The role of cholesterol in cancer. *Cancer Res.* 76, 2063–2070. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2613
- Lee, M., Kim, E. J., and Jeon, M. J. (2016). MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1. *Oncotarget* 7, 8726–8742. doi: 10.18632/oncotarget.6474
- Li, S., Ma, Y., Hou, X., Liu, Y., Li, K., Xu, S., et al. (2015). MiR-185 acts as a tumor suppressor by targeting AKT1 in non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 11854–11862.
- Li, X., Peegel, H., and Menon, K. M. (1998). *In situ* hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology* 139, 3043–3049. doi: 10.1210/en.139.7.3043
- Li, Y. J., Ping, C., Tang, J., and Zhang, W. (2016). MicroRNA-455 suppresses non-small cell lung cancer through targeting ZEB1. *Cell Biol. Int.* 40, 621–628. doi: 10.1002/cbin.10584
- Liu, J., Voutilainen, R., Heikkilä, P., and Kahri, A. I. (1997). Ribonucleic acid expression of the CLA-1 gene, a human homolog to mouse high density lipoprotein receptor SR-BI, in human adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2522–2527. doi: 10.1210/jc.82.8.2522
- Llaverias, G., Danilo, C., Mercier, I., Daumer, K., Capozza, F., Williams, T. M., et al. (2011). Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am. J. Pathol.* 178, 402–412. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.005
- Llaverias, G., Danilo, C., Wang, Y., Witkiewicz, A. K., Daumer, K., Lisanti, M. P., et al. (2010). A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 177, 3180–3191. doi: 10.2353/ajpath.2010.100568
- Malerød, L., Juvet, L. K., Hanssen-Bauer, A., Eskild, W., and Berg, T. (2002). Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 916–923. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02760-2
- Masson, D., Koseki, M., Ishibashi, M., Larson, C. J., Miller, S. G., King, B. D., et al. (2009). Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 2054–2060. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191320
- Masur, K., Vetter, C., Hinz, A., Tomas, N., Henrich, H., Niggemann, B., et al. (2011). Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br. J. Cancer* 104, 345–352. doi: 10.1038/sj.bjc.6606050
- McMahon, K. M., Foit, L., Angeloni, N. L., Giles, F. J., Gordon, L. I., and Thaxton, C. S. (2015). Synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles as cancer therapy. *Cancer Treat. Res.* 166, 129–150. doi: 10.1007/978-3-319-16555-4_6
- Moore, K. J., El Khoury, J., Medeiros, L. A., Terada, K., Geula, C., Luster, A. D., et al. (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 277, 47373–47379. doi: 10.1074/jbc.M208788200
- Murai, T. (2015). Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol. Chem.* 396, 1–11. doi: 10.1515/hsz-2014-0194
- Mysore, R., Zhou, Y., Sadevirta, S., Savolainen-Peltonen, H., Nidhina Haridas, P. A., Soronen, J., et al. (2016). MicroRNA-192* impairs adipocyte triglyceride storage. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 342–351. doi: 10.1016/j.bbailip.2015.12.019
- Nakamura, T., Shibata, N., Nishimoto-Shibata, T., Feng, D., Ikemoto, M., Motojima, K., et al. (2005). Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13404–13409. doi: 10.1073/pnas.0506679102
- Nielsen, T. J., Penman, M., Dori, L., Krieger, M., and Kirchhausen, T. (2002). Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15422–15427. doi: 10.1073/pnas.222421399
- Norata, G. D., Ongari, M., Uboldi, P., Pellegatta, F., and Catapano, A. L. (2005). Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 16, 717–722. doi: 10.3892/ijmm.16.4.717
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* 46:e99. doi: 10.1038/emmm.2014.38
- Pello, O. M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., Amabile, A., et al. (2012). Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* 119, 411–421. doi: 10.1182/blood-2011-02-339911
- Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M. A., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Williams, D. L. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain

- is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol. Biol. Cell* 15, 384–396. doi: 10.1091/mbc.E03-06-0445
- Phillips, M. C. (2014). Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 289, 24020–24029. doi: 10.1074/jbc.R114.583658
- Pussinen, P. J., Karten, B., Wintersperger, A., Reicher, H., McLean, M., Malle, E., et al. (2000). The human breast carcinoma cell line HBL-100 acquires exogenous cholesterol from high-density lipoprotein via CLA-1 (CD-36 and LIMPII analogous 1)-mediated selective cholesteryl ester uptake. *Biochem. J.* 349(Pt 2), 559–566. doi: 10.1042/bj3490559
- Qu, F., Cui, X., Hong, Y., Wang, J., Li, Y., Chen, L., et al. (2013). MicroRNA-185 suppresses proliferation, invasion, migration, and tumorigenicity of human prostate cancer cells through targeting androgen receptor. *Mol. Cell. Biochem.* 377, 121–130. doi: 10.1007/s11010-013-1576-z
- Rahaman, S. O., Lennon, D. J., Febbraio, M., Podrez, E. A., Hazen, S. L., and Silverstein, R. L. (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab.* 4, 211–221. doi: 10.1016/j.cmet.2006.06.007
- Rhainds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstra, L., and Brissette, L. (2004). Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J. Cell Sci.* 117(Pt 15), 3095–3105. doi: 10.1242/jcs.01182
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., and Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 416–423. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.03.016
- Schörghofer, D., Kinslechner, K., Preitschopf, A., Schütz, B., Röhr, C., Hengstschläger, M., et al. (2015). The HDL receptor SR-BI is associated with human prostate cancer progression and plays a possible role in establishing androgen independence. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13:88. doi: 10.1186/s12958-015-0087-z
- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A. K., Gibson, L. L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K. L., et al. (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ. Res.* 98, 63–72. doi: 10.1161/01.RES.0000199272.59432.5b
- Sekine, Y., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Furuya, Y., Koike, H., Suzuki, K., et al. (2010). High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism. *Mol. Cancer Res.* 8, 1284–1294. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0008
- Siebel, A. L., Heywood, S. E., and Kingwell, B. A. (2015). HDL and glucose metabolism: current evidence and therapeutic potential. *Front. Pharmacol.* 6:258. doi: 10.3389/fphar.2015.00258
- Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012). Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 673–676. doi: 10.1016/j.coph.2012.10.004
- Silver, D. L. (2002). A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B type I is essential for cell surface expression in liver. *J. Biol. Chem.* 277, 34042–34047. doi: 10.1074/jbc.M206584200
- Silver, D. L., Jiang, X. C., Arai, T., Bruce, C., and Tall, A. R. (2000). Receptors and lipid transfer proteins in HDL metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902, 103–111; discussion 11–2. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06305.x
- Simko, V., and Ginter, E. (2014). Understanding cholesterol: high is bad but too low may also be risky – is low cholesterol associated with cancer? *Bratisl. Lek. Listy* 115, 59–65. doi: 10.4149/bll_2014_013
- Sparks, S. M., Zhou, H., Generaux, C., Harston, L., Moncol, D., Jayawickreme, C., et al. (2016). Identification of nonabsorbable inhibitors of the scavenger receptor-BI (SR-BI) for tissue-specific administration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 1901–1904. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.03.025
- Sun, J., Fan, Z., Lu, S., Yang, J., Hao, T., and Huo, Q. (2016). miR-192 suppresses the tumorigenicity of prostate cancer cells by targeting and inhibiting nina binding protein. *Int. J. Mol. Med.* 37, 485–492. doi: 10.3892/ijmm.2016.2449
- Tang, H., Liu, P., Yang, L., Xie, X., Ye, F., Wu, M., et al. (2014). miR-185 suppresses tumor proliferation by directly targeting E2F6 and DNMT1 and indirectly upregulating BRCA1 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 13, 3185–3197. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0243
- Tao, H., Yancey, P. G., Babaev, V. R., Blakemore, J. L., Zhang, Y., Ding, L., et al. (2015). Macrophage SR-BI mediates efferocytosis via Src/PI3K/Rac1 signaling and reduces atherosclerotic lesion necrosis. *J. Lipid Res.* 56, 1449–1460. doi: 10.1194/jlr.M056689
- Thorne, R. F., Law, E. G., Elith, C. A., Ralston, K. J., Bates, R. C., and Burns, G. F. (2006). The association between CD36 and Lyn protein tyrosine kinase is mediated by lipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 51–56. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.156
- Tong, Z., Liu, N., Lin, L., Guo, X., Yang, D., and Zhang, Q. (2015). miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer via targeting BCL2, BCL2L1 and MCL1. *Biomed. Pharmacother.* 75, 129–136. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.036
- Towns, R., and Menon, K. M. (2005). The role of cyclic AMP response element binding protein in transactivation of scavenger receptor class B type I promoter in transfected cells and in primary cultures of rat theca-interstitial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 245, 23–30. doi: 10.1016/j.mce.2005.09.013
- Tréguier, M., Doucet, C., Moreau, M., Dacet, C., Thillet, J., Chapman, M. J., et al. (2004). Transcription factor sterol regulatory element binding protein 2 regulates scavenger receptor Cla-1 gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2358–2364. doi: 10.1161/01.ATV.0000147896.69299.85
- Trigatti, B., Rigotti, A., and Krieger, M. (2000). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 123–131. doi: 10.1097/00041433-200004000-00004
- Tu, A. Y., and Albers, J. J. (2001). Glucose regulates the transcription of human genes relevant to HDL metabolism: responsive elements for peroxisome proliferator-activated receptor are involved in the regulation of phospholipid transfer protein. *Diabetes* 50, 1851–1856. doi: 10.2337/diabetes.50.8.1851
- Twiddy, A. L., Cox, M. E., and Wasan, K. M. (2012). Knockdown of scavenger receptor class B type I reduces prostate specific antigen secretion and viability of prostate cancer cells. *Prostate* 72, 955–965. doi: 10.1002/pros.21499
- UniProt, C. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43, D204–D212. doi: 10.1093/nar/gku989
- Wang, L., Jia, X. J., Jiang, H. J., Du, Y., Yang, F., Si, S. Y., et al. (2013). MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1956–1964. doi: 10.1128/MCB.01580-12
- Webb, N. R., Connell, P. M., Graf, G. A., Smart, E. J., de Villiers, W. J., de Beer, F. C., et al. (1998). SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* 273, 15241–15248. doi: 10.1074/jbc.273.24.15241
- Webb, N. R., de Villiers, W. J., Connell, P. M., de Beer, F. C., and van der Westhuyzen, D. R. (1997). Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J. Lipid Res.* 38, 1490–1495.
- Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Kuipers, F., and Tietge, U. J. (2009b). Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *J. Lipid Res.* 50, 1571–1580. doi: 10.1194/jlr.M800434-JLR200
- Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Oude Elferink, R. P., Kuipers, F., and Tietge, U. J. (2009a). Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *Hepatology* 50, 1263–1272. doi: 10.1002/hep.23112
- Wood, P., Mulay, V., Darabi, M., Chan, K. C., Heeren, J., Pol, A., et al. (2011). Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling modulates protein stability and cell surface expression of scavenger receptor SR-BI. *J. Biol. Chem.* 286, 23077–23092. doi: 10.1074/jbc.M111.236398
- Xu, J., Qian, J., Xie, X., Lin, L., Ma, J., Huang, Z., et al. (2012). High density lipoprotein cholesterol promotes the proliferation of bone-derived mesenchymal stem cells via binding scavenger receptor-B type I and activation of PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2 pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 371, 55–64. doi: 10.1007/s11010-012-1422-8
- Yancey, P. G., de la Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S. M., Connelly, M. A., et al. (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* 275, 36596–36604. doi: 10.1074/jbc.M006924200

- Yu, M., Romer, K. A., Nieland, T. J., Xu, S., Saenz-Vash, V., Penman, M., et al. (2011). Exoplasmic cysteine Cys384 of the HDL receptor SR-BI is critical for its sensitivity to a small-molecule inhibitor and normal lipid transport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12243–12248. doi: 10.1073/pnas.1109078108
- Yuan, B., Wu, C., Wang, X., Wang, D., Liu, H., Guo, L., et al. (2016). High scavenger receptor class B type I expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol.* 37, 3581–3588. doi: 10.1007/s13277-015-4141-4
- Zhang, Z., Liu, X., Feng, B., Liu, N., Wu, Q., Han, Y., et al. (2015). STIM1, a direct target of microRNA-185, promotes tumor metastasis and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Oncogene* 34, 4808–4820. doi: 10.1038/onc.2014.404
- Zheng, Y., Liu, Y., Jin, H., Pan, S., Qian, Y., Huang, C., et al. (2013). Scavenger receptor B1 is a potential biomarker of human nasopharyngeal carcinoma and its growth is inhibited by HDL-mimetic nanoparticles. *Theranostics* 3, 477–486. doi: 10.7150/thno.6617
- Zhou, H., Tan, K. C., Shiu, S. W., and Wong, Y. (2008). Cellular cholesterol efflux to serum is impaired in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24, 617–623. doi: 10.1002/dmrr.895
- Zhu, W., Saddar, S., Seetharam, D., Chambliss, K. L., Longoria, C., Silver, D. L., et al. (2008). The scavenger receptor class B type I adaptor protein PDZK1 maintains endothelial monolayer integrity. *Circ. Res.* 102, 480–487. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159079
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R. M., Solomon, K. R., and Freeman, M. R. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Invest.* 115, 959–968. doi: 10.1172/JCI200519935

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Gutierrez-Pajares, Ben Hassen, Chevalier and Frank. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Cibler l'homéostasie du cholestérol cellulaire pour traiter le cancer du sein

Résumé

Une femme sur huit sera touchée dans sa vie par le cancer du sein. Les facteurs de risque peuvent être héréditaires et environnementaux. Des études antérieures ont montré que les taux de cholestérol cellulaire peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la progression tumorale. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons modulé le métabolisme du cholestérol dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 et MDA-MB-231 en utilisant des approches génétiques : augmentation de l'élimination du cholestérol par l'expression de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I, régulant la sortie du cholestérol des cellules) ou modulation du métabolisme du cholestérol par l'expression de l'apolipoprotéine E (apoE, pouvant réguler l'entrée ou la sortie du cholestérol des cellules). Nos expériences ont été menées *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats montrent que l'expression de l'apoA-I ou de l'apoE stimule la prolifération, la migration, l'invasion et la croissance tumorale des cellules MCF-7 via les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK et possiblement la cavéoline-1. En revanche, l'apoA-I et l'apoE ralentissent la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231.

Mots-clés : Cancer du sein ; cholestérol ; apolipoprotéine A-I ; apolipoprotéine E ; cavéoline 1

Résumé en anglais

One in eight women will have to face breast cancer at some point in her life. Risk factors can be hereditary or environmental. Previous studies have shown that cholesterol levels can play an important role in the regulation of tumor progression. To test this hypothesis, we modulated cholesterol metabolism in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 using a genetics approach: increasing cholesterol elimination by expressing apolipoprotein A-I (apoA-I; regulating cellular cholesterol efflux), or modulating cholesterol metabolism by expressing apolipoprotein E (apoE; regulating cellular influx and efflux of cholesterol). We performed *in vitro* and *in vivo* experiments. Our results show that expressing apoA-I or apoE stimulates proliferation, migration, invasion, and tumor growth of MCF-7 cells, via the regulation of the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways and possibly via caveolin-1. However, apoA-I and apoE reduce proliferation and migration of MDA-MB-231 cells.

Keywords: Breast cancer ; cholesterol ; apolipoprotein A-I ; apolipoprotein E ; caveolin 1