



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS  
DE TOURS



*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies*  
Unité INSERM U921-Nutrition Croissance et Cancer

# THÈSE

présentée par :

**Sophie VIBET**

soutenue le : 27 novembre 2008

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie & Santé

**Augmentation de la sensibilité des  
cellules tumorales mammaires aux  
agents anticancéreux par  
les acides gras polyinsaturés n-3 :  
rôle du statut oxydant et de la  
vascularisation tumorale.**

**THÈSE dirigée par :**

Jacques GORÉ  
Karine MAHÉO

Professeur des universités, Université F. Rabelais (Tours)  
Maître de conférences des universités, Université F. Rabelais (Tours)

**RAPPORTEURS :**

Olivier FERON  
Michel LAGARDE

Professeur des universités, Université de Louvain (Louvain, Belgique)  
Professeur des universités, INSA (Lyon)

---

**JURY :**

Olivier FERON  
Michel LAGARDE  
Odile SERGENT  
Erick GAMELIN  
Jacques GORÉ  
Karine MAHÉO  
Philippe BOUGNOUX

Professeur des universités, Université de Louvain (Bruxelles, Belgique)  
Professeur des universités, INSA (Lyon)  
Maître de conférences des universités, Université de Rennes  
Professeur des universités, Université d'Angers  
Professeur des universités, Université F. Rabelais (Tours)  
Maître de conférences des universités, Université F. Rabelais (Tours)  
Professeur des universités, Université F. Rabelais (Tours)



Ce travail de thèse a été réalisé  
dans le Laboratoire Nutrition Croissance et Cancer  
Unité INSERM U921  
Dirigé par le Pr. Philippe Bougnoux  
Faculté de Médecine de Tours, Université François Rabelais.

Cette thèse a été financée par le Ministère de la Recherche et  
par la Ligue Nationale contre le Cancer.

Thèse dirigée par le Pr. Jacques Goré et le Dr. Karine Mahéo  
et  
co-encadrée par le Dr. Caroline Goupille.



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier :

Philippe Bougnoux, Professeur à la faculté de médecine de Tours, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour sa confiance, pour ses nombreux conseils et son aide dans la recherche de « l'après thèse ». Merci de son implication constante dans les différents projets malgré un emploi du temps très chargé. Je le remercie enfin pour avoir jugé ce travail de thèse.

Jacques Goré, Professeur à la faculté de pharmacie de Tours, pour m'avoir accordé sa confiance depuis le DEA, pour son aide et pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances et de son expérience. Merci d'avoir toujours réussi à trouver la solution là où il n'y en avait plus, notamment lors du dosage de la vitamine E. Enfin, je le remercie pour l'aide et les conseils prodigués lors de la rédaction de ce manuscrit et des publications.

Karine Mahéo, Maître de conférences à la faculté de pharmacie de Tours, pour m'avoir fait confiance dès le début de mon stage de DEA (on ne compte plus les années). Merci pour m'avoir initiée aux joies du stress oxydant. Merci pour sa grande disponibilité, pour son soutien, pour son écoute quotidienne, ses nombreux conseils, pour toutes les discussions intenses que nous avons eues sur le sujet, et pour avoir su orienter au bon moment les projets.

Olivier Féron, Professeur à l'université de Louvain, et Michel Lagarde, Professeur à l'INSA de Lyon, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de juger ce travail.

Odile Sergent, Maître de conférences à l'université de Rennes, et Eric Gamelin, Professeur à l'université d'Angers, pour avoir accepté de juger cette thèse.

Puis je me dois de remercier :

Caroline Goupille, pour son enthousiasme, pour m'avoir passé tous ses petits trucs techniques, pour nos conversations lors des après-midi palpations... Merci pour m'avoir initiée à l'expérimentation animale, pour son soutien, pour oublier si souvent l'heure le soir à cause de nos discussions sur les projets.

... Et je ne pouvais dissocier les remerciements qui suivent et qui vont à l'équipe du bureau 5 : Karine et Caroline. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble durant cette thèse, pour nos discussions « littérature » les veilles de vacances, et pour la bonne humeur qui régnait dans le bureau. Que cela dure encore longtemps malgré l'éloignement via d'autres moyens de communications (vive les joies de skype) !

Merci à Igor Chourpa pour tous les conseils et les nombreuses discussions que nous avons eues sur un de mes premiers projets de thèse. Merci pour sa confiance, son soutien, et pour les après-midi dans le noir l'œil rivé sur l'écran d'ordinateur, et pour bannir le crayon rouge !

Merci à François Tranquart pour m'avoir initiée à l'échographie. Pour toutes les discussions et vos compétences qui ont fait avancer le dernier projet de ma thèse.

---

Merci pour votre soutien dans mes recherches de post-doctorat.

Merci à Jean-Paul Steghens et à toute son équipe pour la réalisation des dosages de malondialdéhyde, et des enzymes de synthèse du glutathion.

Merci à Abdel Elmoujahed pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner. Merci pour ta gentillesse, et ta confiance. Et merci pour la bonne ambiance à l'IUT !

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, pour la bonne ambiance qui y règne, aux « anciens » et « nouveaux » compagnons de paillasse et du café matinal, avec dans le désordre :

Merci à Christophe Vandier pour m'avoir chaperonnée à l'AACR, pour toutes les discussions que nous avons eues, et tes nombreux conseils. Merci de m'avoir donnée du recul pour mes projets d'après thèse. Et merci de représenter avec moi le bastion poitevin dans un laboratoire à tendance bretonisante !

Merci à Pierre Besson, le MacGyver bis avec Caroline pour tous nos problèmes au laboratoire. Merci pour tes nombreuses compétences qui nous dépannent à chaque coup !

Merci à Jean-Yves Le Guennec et Sébastien Roger pour toutes les blagues que je ne comprends pas toujours, malgré ma bruntitude. Et merci pour vos conseils dans le choix du post-doctorat.

Merci à Virginie Maillard, pour tes bons plans, nos discussions, et pour avoir contribué à me faire découvrir les enseignements de l'IUT.

Merci à Mélanie Plourde pour la super ambiance qui régnait en DEA, pour m'avoir appris le québécois (plus besoin de sous-titres maintenant), pour toutes les pizzerias que nous avons testées, et pour les joies de la piscine que nous avons partagées.

Merci à Aurélia Barascu et Marie Potier, le duo de choc qu'on ne présente plus, merci pour tous les bons moments partagés, pour avoir essayé de m'embarquer au Moving sans succès, et pour toutes les blagues très fines !

Merci à Truong-an Tran, l'épicerie, la confiserie du laboratoire, que dis-je le traiteur attitré du laboratoire. Merci pour m'avoir dépanné de nombreuses fois en informatique et pour sa bonne humeur.

Merci à Séverine Colas pour le passage de témoin, et pour les joies de creuser des tranchées sous l'orage en camping.

Merci à tous les « nouveaux » pour perpétuer la bonne ambiance et notamment à Aude Ouillé, Alban Girault, Ludovic Gillet (c'était bien essayé le coup de pas réserver de chambre à Lyon), Aurélie Chantome, Aurore Douaud (notamment pour tes remarques toujours justes), Jean-François Dumas, Stéphane Servais, Mimsy Julienne, Sophie Kornfeld, Emeline Marais, Catherine Leroy.

Merci à mon premier compagnon de bureau, François Labarthe, pour son aide en DEA et pour la très bonne ambiance dans le bureau québécois !

Une pensée pour Lysiane Boulay que je n'ai pas côtoyée beaucoup en culture malheureusement. Merci pour ta grande gentillesse.

Merci à Michelle Pinault pour son aide en biochimie des lipides et pour les bons plans festival de jazz.

Merci à Claude Hoinard pour son analyse experte en matière de statistiques.

Merci à Marie-Lise Jourdan pour m'avoir initiée à la cytométrie de flux.

Merci à Amandine Fitou, mon binôme de TP, mon copilote pour les trajets à la fac, qui m'a incitée à venir à Tours. Merci ne pas m'avoir laissée tombée lorsqu'il fallait

pousser la voiture. (Par contre pas de remerciements pour les réparations d'ordinateur à domicile ! mon oreille s'en souvient). Merci en tout cas pour tous les bonnes parties de rigolade passées ensemble !

Merci à Nicolas et Aurélie pour avoir chercher une dernière réf pour moi. Et merci de nous faire baver avec vos photos de barrière de corail...

Merci à Marie Odile et Rocco Fazzolare pour vos précieux conseils dans le choix du bon laboratoire de thèse.

Merci à Jean-Marie et Evelyne Juille, à Gérard et Mireille Bourreau pour leur soutien notamment lors de mon stage de maîtrise ou de DEA.

Merci à mes amies, Alice Chamillard et Aurélie Jacquet (et à leurs copains Adil et Stéphane) qui sont toujours là malgré mon manque de temps pour se voir. Merci pour toutes les soirées patinoires, pour les manifs (même à Intermarché !), pour tous ces bons souvenirs à Poitiers.

Enfin un ENORME, INEFFABLE merci à toute ma famille qui a toujours été présente quand j'en avais besoin. A mes parents Nicole et François. Merci pour leur soutien moral, pour vos encouragements. Et merci pour votre grande aide logistique. A mon « grand » frère, Nicolas. Merci pour ton soutien, tes découvertes de nouveaux logiciels, tes dépannages informatiques, même quand il s'agissait de rebrancher la prise....Merci à C..... D... I..., Laurent, merci pour tout ce que tu fais pour moi. Merci de me soutenir dans tout ce que j'entreprends et de m'avoir toujours encouragée. Merci pour tout le reste ... Merci à Jocelyne et Alain Galineau, pour leur soutien et leur aide précieuse dans les derniers mois difficiles de la thèse. Merci à Antony, Sophie et le petit Brieux pour leur soutien.



## Résumé

**Contexte.** Des études cliniques ont montré qu'une teneur plus importante en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) dans le tissu adipeux de patientes atteintes de cancer du sein est associée à une amélioration de la réponse des tumeurs à la chimiothérapie (chimiosensibilisation). Cette observation est étayée par des résultats obtenus *in vitro* (sur des lignées de cellules cancéreuses) et *in vivo* (chez des rates porteuses de tumeurs mammaires) qui ont montré que les AGPI n-3 augmentent la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux anthracyclines.

**Objectif.** Le but de ce travail de thèse a été d'étudier les mécanismes d'action qui sous-tendent l'augmentation de la chimiosensibilité par les AGPI n-3. Trois pistes potentielles du mode d'action des AGPI n-3 ont été explorées : (i) la modification du captage et de la métabolisation intracellulaire d'agents anticancéreux, (ii) l'impact sur le stress oxydant des cellules tumorales et l'altération des défenses anti-oxydantes et (iii) la modification de la répartition des compartiments vasculaires au sein de la tumeur (macro-, medium- et micro- vascularisation).

**Résultats.** Nous avons montré que la sensibilité accrue des cellules tumorales mammaires à la mitoxantrone était liée à une augmentation du captage cellulaire et à une modification de la distribution et de la métabolisation intracellulaire de l'agent anticancéreux. La modification de la métabolisation intracellulaire de la mitoxantrone par les AGPI n-3 impliquant la voie du stress oxydant, nous avons étudié la relation entre l'augmentation de la chimiosensibilité par les AGPI n-3 et le stress oxydant. L'étude de cette voie a permis de montrer que l'effet sensibilisant des AGPI n-3 aux anthracyclines était associé à une augmentation de la peroxydation lipidique, conséquence de la diminution des défenses anti-oxydantes cellulaires et notamment de la glutathion peroxydase (GPx). Enfin nous avons montré que les AGPI n-3 pouvaient également augmenter la sensibilité de tumeurs mammaires de rats à d'autres agents anticancéreux majeurs en clinique, les taxanes. La modification de la répartition des compartiments vasculaires (micro-, medium- et macro-vascularisation) par les AGPI n-3 semble être impliquée dans cet effet.

**Conclusions.** Ces travaux ont donc montré que les AGPI n-3 sont capables d'augmenter l'efficacité des principaux agents anticancéreux utilisés dans le cancer du sein et cet effet implique la voie du stress oxydant et la vascularisation tumorale. L'ensemble de ces travaux de thèse vise ainsi à approfondir les connaissances des modes d'action des AGPI n-3 en vue d'études cliniques.

**Mots clés.** Acides gras polyinsaturés n-3 – Cancer du sein – Traitement anticancéreux – Stress Oxydant – Vascularisation tumorale.



## Abstract

**Rationale.** Clinical studies reported that the sensitivity of human breast cancer to anticancer therapies is related to amounts of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) in adipose tissue of patients. These results are supported by *in vitro* and *in vivo* studies demonstrating that n-3 PUFA enhanced tumor cells sensitivity to anthracyclines.

**Aim.** The aim of this thesis was to investigate the mechanisms of mammary tumor sensitization to anticancer drugs by n-3 PUFA. Three hypotheses were explored: (i) modifications of anticancer drug accumulation and metabolization within tumor cells, (ii) tumor cells oxidative stress and alterations of anti-oxidant defenses and (iii) changes in tumour vascular compartment repartition (micro-, medium-, macro-vascular compartments).

**Results.** We showed that the increase in tumor cell sensitivity to mitoxantrone was associated with an enhancement in mitoxantrone uptake and a modification of the mitoxantrone distribution and metabolization within the cells. As we found that these last results involved oxidative stress, we examined the relation between chemosensitization by n-3 PUFA and tumor cells oxidative status. We found that n-3 PUFA decreased the activity of an anti-oxidant enzyme, the glutathione peroxidase, leading to an enhancement in lipid peroxidation. In fact, the reduction in glutathione peroxidase response by n-3 PUFA was associated with a higher sensitivity to anthracyclines in tumor cells. Finally, we showed *in vivo* that alterations of the vascular compartment organization (micro-, medium- and macro-vascularization) may occur for the effect of n-3 PUFA increasing taxanes efficacy.

**Conclusions.** This thesis brought a major contribution to better understand the mechanisms involved in the chemosensitization by n-3 PUFA, such as tumor oxidative stress and tumor vascularization, and pave the way for new preclinical clinical studies dealing with the enhancement of anticancer therapy by n-3 PUFA.

**Keywords.** n-3 Polyunsaturated fatty acids – Breast cancer – Anticancer therapy – Oxidative stress – Tumor vascularization.



## Table des matières

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Remerciements.....                                                                                                               | 5  |
| Résumé.....                                                                                                                      | 9  |
| Abstract.....                                                                                                                    | 11 |
| Table des matières.....                                                                                                          | 13 |
| Liste des publications et communications.....                                                                                    | 17 |
| Liste des abréviations.....                                                                                                      | 19 |
| Préambule.....                                                                                                                   | 21 |
| Introduction.....                                                                                                                | 23 |
| Le Cancer du sein.....                                                                                                           | 25 |
| .A Epidémiologie : situation actuelle.....                                                                                       | 25 |
| .B Gènes prédisposant/ facteurs environnementaux.....                                                                            | 27 |
| .1 Facteur de risque familial.....                                                                                               | 27 |
| .2 Facteur de risque hormonal .....                                                                                              | 27 |
| .3 Mastopathies bénignes.....                                                                                                    | 28 |
| .4 Facteur de risque nutritionnel : les lipides alimentaires.....                                                                | 28 |
| .5 Autres facteurs de risques .....                                                                                              | 30 |
| .C La Glande mammaire : structure, évolution, et tumorigénèse.....                                                               | 30 |
| .1 La Glande mammaire : structure, évolution.....                                                                                | 30 |
| .2 La lésion mammaire : évolution et facteurs pronostiques.....                                                                  | 32 |
| La chimiothérapie dans le cancer du sein.....                                                                                    | 34 |
| .A Principe de la chimiothérapie.....                                                                                            | 34 |
| .B Les différentes classes d'agents chimio-thérapeutiques.....                                                                   | 35 |
| .1 Les anthracyclines.....                                                                                                       | 36 |
| .2 Les anthracènediones .....                                                                                                    | 39 |
| .3 Les taxanes.....                                                                                                              | 40 |
| .C Limites de la chimiothérapie.....                                                                                             | 41 |
| .1 Effets secondaires.....                                                                                                       | 41 |
| .2 Chimio-résistances.....                                                                                                       | 41 |
| Acides gras et cancer.....                                                                                                       | 44 |
| .A Nomenclature des acides gras (AG).....                                                                                        | 44 |
| .B Propriétés physiques .....                                                                                                    | 48 |
| .C Sources Alimentaires.....                                                                                                     | 48 |
| .D Biosynthèse .....                                                                                                             | 51 |
| .1 La synthèse de novo des acides gras saturés (AGS) à partir de l'acétate ..                                                    | 51 |
| .2 L'élongation de la chaîne carbonée.....                                                                                       | 52 |
| .3 la production des acides gras insaturés par la $\Delta^9$ -, $\Delta^6$ - et la $\Delta^5$ -désaturase .....                  | 52 |
| .E Devenir des acides gras dans l'organisme.....                                                                                 | 55 |
| .1 Digestion et absorption.....                                                                                                  | 55 |
| .2 Transport et répartition dans les tissus.....                                                                                 | 55 |
| Acides gras polyinsaturés n-3 et réponse aux traitements anticancéreux dans le cancer du sein.....                               | 57 |
| .A Intervention nutritionnelle avec les acides gras polyinsaturés et réponse des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux..... | 57 |
| .1 Données cliniques.....                                                                                                        | 57 |
| .2 Données expérimentales in vitro.....                                                                                          | 58 |
| .3 Données expérimentales in vivo.....                                                                                           | 60 |
| .B Mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité cytotoxique des traitements anticancéreux. ....                         | 63 |
| .1 La modification de la fluidité membranaire : modification du captage et de                                                    |    |

|                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| l'efflux des agents anticancéreux.....                                                                                                                                             | 64  |
| .2 Modification du métabolisme des agents anticancéreux.....                                                                                                                       | 65  |
| .3 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des AGPI n-3.....                                                                                     | 65  |
| .4 L'inhibition de la signalisation Her-2/neu.....                                                                                                                                 | 67  |
| .5 L'induction de l'apoptose via la protéine P53.....                                                                                                                              | 68  |
| .6 Effets sur la vascularisation.....                                                                                                                                              | 68  |
| .7 Effets sur la production d'eicosanoïdes .....                                                                                                                                   | 69  |
| .8 Augmentation du stress oxydant.....                                                                                                                                             | 75  |
| Les acteurs du statut oxydant cellulaire.....                                                                                                                                      | 79  |
| .A Les espèces réactives de l'oxygène et les espèces radicalaires.....                                                                                                             | 79  |
| .1 Nature.....                                                                                                                                                                     | 79  |
| .2 L'anion superoxyde et ERO qui découlent de sa production.....                                                                                                                   | 80  |
| .B Production d'ERO et détoxification par les systèmes anti-oxydants .....                                                                                                         | 83  |
| .C Oxydation des molécules biologiques.....                                                                                                                                        | 92  |
| .1 Oxydation des lipides.....                                                                                                                                                      | 92  |
| .2 Oxydation des protéines.....                                                                                                                                                    | 94  |
| .3 Oxydation des acides nucléiques .....                                                                                                                                           | 95  |
| .D Détoxification des molécules biologiques .....                                                                                                                                  | 96  |
| .E Les ERO en tant que seconds messagers .....                                                                                                                                     | 97  |
| .F Le stress oxydant dans les cellules tumorales.....                                                                                                                              | 98  |
| La vascularisation tumorale.....                                                                                                                                                   | 99  |
| .A L'architecture tumorale.....                                                                                                                                                    | 99  |
| .1 L'architecture des vaisseaux en conditions physiologiques .....                                                                                                                 | 99  |
| .2 Désorganisation de l'architecture vasculaire dans les tumeurs.....                                                                                                              | 100 |
| .3 Formation de nouveaux vaisseaux.....                                                                                                                                            | 101 |
| .4 Les facteurs proangiogéniques.....                                                                                                                                              | 104 |
| .5 Les facteurs antiangiogéniques.....                                                                                                                                             | 107 |
| .6 La matrice extra cellulaire.....                                                                                                                                                | 108 |
| .7 Les molécules d'adhésion cellulaire .....                                                                                                                                       | 108 |
| .8 Conclusion.....                                                                                                                                                                 | 109 |
| .B Les thérapies antiangiogéniques .....                                                                                                                                           | 109 |
| .1 Les stratégies antiangiogéniques.....                                                                                                                                           | 109 |
| .2 Le concept de « normalisation » de la vascularisation tumorale par anti-angiogenèse.....                                                                                        | 110 |
| .3 Chimiothérapies antiangiogénique et cytotoxique.....                                                                                                                            | 111 |
| Objectif des travaux de thèse.....                                                                                                                                                 | 112 |
| .A Etude de l'effet des AGPI n-3 sur la modification de la perméabilité membranaire, le captage cellulaire et la métabolisation intracellulaire d'agents anticancéreux .....       | 114 |
| .B Etude de l'effet des AGPI n-3 sur le statut oxydant cellulaire .....                                                                                                            | 114 |
| .C Etude de l'effet des AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale.....                                                                                                              | 115 |
| 1er Projet.....                                                                                                                                                                    | 118 |
| Modifications du captage, de la distribution et de la métabolisation intracellulaire de l'agent anticancéreux par les AGPI n-3 dans les cellules tumorales mammaires humaines..... | 120 |
| .A Introduction.....                                                                                                                                                               | 120 |
| .B Matériel et méthodes.....                                                                                                                                                       | 120 |
| .1 Culture cellulaire.....                                                                                                                                                         | 120 |
| .2 L'imagerie confocale multispectrale (ICMS).....                                                                                                                                 | 122 |
| .3 Mesure de la fluorescence de la mitoxantrone dans les cellules en suspension.....                                                                                               | 123 |
| .4 Localisation du métabolite de la mitoxantrone dans les organites cellulaires .....                                                                                              | 124 |
| .C Principaux résultats et discussion.....                                                                                                                                         | 124 |

|                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2e Projet.....                                                                                                                                                                                            | 126 |
| Augmentation par le DHA de la sensibilité aux anthracyclines de cellules tumorales mammaires humaines et de tumeurs mammaires de rates via une modification du statut oxydant des cellules tumorales..... | 128 |
| .A Introduction.....                                                                                                                                                                                      | 128 |
| .B Matériel et méthodes.....                                                                                                                                                                              | 129 |
| .C Résumé des principaux résultats.....                                                                                                                                                                   | 129 |
| .D Conclusion.....                                                                                                                                                                                        | 130 |
| 3e Projet.....                                                                                                                                                                                            | 134 |
| Augmentation par le DHA de la sensibilité aux taxanes de tumeurs mammaires chez le rat : rôle de l'architecture vasculaire tumorale.....                                                                  | 136 |
| .A Introduction.....                                                                                                                                                                                      | 136 |
| .B Matériel et méthodes.....                                                                                                                                                                              | 137 |
| .1 Induction de la carcinogenèse mammaire par le NMU.....                                                                                                                                                 | 137 |
| .2 Chronologie de l'expérimentation animale.....                                                                                                                                                          | 138 |
| .3 Chimiothérapie.....                                                                                                                                                                                    | 140 |
| .4 Echographie.....                                                                                                                                                                                       | 141 |
| .5 Mesure de la pression partielle en oxygène dans les tumeurs.....                                                                                                                                       | 145 |
| .6 Sacrifice, autopsie et prélèvement de tissus.....                                                                                                                                                      | 145 |
| .7 Analyse de la composition en acides gras du tissu adipeux.....                                                                                                                                         | 146 |
| .8 Mesure des quantités de protéine VEGF-A dans le sérum.....                                                                                                                                             | 146 |
| .9 Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse par PCR quantitative en temps réel. ....                                                                                             | 146 |
| .10 Statistiques.....                                                                                                                                                                                     | 148 |
| .C ARCHIVASC : une nouvelle méthode d'analyse des compartiments vasculaires (micro-, medium- et macro-vascularisation) – Article en préparation.....                                                      | 150 |
| .D 1e objectif : les AGPI n-3 modifient-ils la vascularisation tumorale sans traitement anticancéreux ? .....                                                                                             | 152 |
| .1 Résultats.....                                                                                                                                                                                         | 152 |
| .2 Discussion.....                                                                                                                                                                                        | 155 |
| .E 2e objectif : les AGPI n-3 augmentent-ils l'efficacité du docetaxel ? La vascularisation tumorale est-elle impliquée dans cette chimiosensibilisation?. .....                                          | 156 |
| .1 Résultats.....                                                                                                                                                                                         | 156 |
| .2 Discussion.....                                                                                                                                                                                        | 160 |
| Discussion générale et Perspectives.....                                                                                                                                                                  | 164 |
| Références bibliographiques.....                                                                                                                                                                          | 170 |



## Liste des publications et communications

### Liste des manuscrits publiés, en lien direct avec le travail de thèse :

Mahéo K, **Vibet S**, Steghens JP, Dartigeas C, Lehman M, Bougnoux P, Goré J. *Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation*. **Free Radic Biol Med**. 2005 Sep 15;39(6):742-51.

**Vibet S**, Mahéo K, Goré J, Dubois P, Bougnoux P, Chourpa I. *Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines*. **Drug Metab Dispos**. 2007 May;35(5):822-8. Epub 2007 Feb 12.

**Vibet S**, Goupille C, Bougnoux P, Steghens JP, Goré J, Mahéo K. *Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response*. **Free Radic Biol Med**. 2008 Apr 1;44(7):1483-91. Epub 2008 Jan 26.

### Liste des posters exposés lors de congrès internationaux :

**Vibet S**, Goupille C, Goré J, Bougnoux P, Steghens JP, Mahéo K. *Sensitization of breast cancer cells to anthracyclines by docosahexaenoic acid (DHA) through loss of glutathione peroxidase response*. **The 20st Meeting of the European Association for Cancer Research**. July 2008, Lyon, France.

**Vibet S**, Mahéo K, Goré J, Hardy T, Bougnoux P, Tranquart F, Goupille C. *Potentiation of antitumoral and antiangiogenic actions of docetaxel by fish oil diet (DHA/EPA): impact on micro – and macro- vascularization*. **The 20st Meeting of the European Association for Cancer Research**. July 2008, Lyon, France.

**Vibet S**, Goupille C, Goré J, Bougnoux P, Tranquart F, Hardy T, Mahéo K. *Potentiation by docosahexaenoic acid of antiangiogenic and antitumor action of docetaxel*. **Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**, April 2007, Los Angeles, USA.

**Vibet S**, Goupille C, Tranquart F, Goré J, Bougnoux P, Mahéo K. *Potentiation by docosahexaenoic acid of the antiangiogenic and antitumor actions of docetaxel in autochthonous rat mammary carcinoma*. **3rd International Meeting on Angiogenesis**, March 2007, Amsterdam, Netherlands.

**Vibet S**, Mahéo K, Goré J, Bougnoux P, Chourpa I. *Chemosensitization of mitoxantrone by DHA is correlated to drug subcellular distribution in breast cancer cells*. **4th World Congress of Cellular and Molecular Biology**, October 2005, Poitiers, France.

### Communication orale lors de congrès internationaux :

**Vibet S**, Mahéo K, Goré J, Bougnoux P, Chourpa I. *Chemosensitization of mitoxantrone by DHA is correlated to drug subcellular distribution in breast cancer cells*. **4th World Congress of Cellular and Molecular Biology**, October 2005, Poitiers, France.



## Liste des abréviations

4-HNE : 4-Hydroxynonénal  
AA : Acide arachidonique  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire  
AG : Acides gras  
AGPI : Acide gras polyinsaturé  
AGS : Acide gras saturé  
ALA : Acide alpha linoléinique  
ALA : Acide alpha-linolénique  
ARN : Acide ribonucléique  
BRCA : Breast cancer gene  
CAT : Catalase  
CCM : Chromatographie sur couche mince  
CEUS : Contrast-enhanced ultrasonography  
CEUS-I : Contrast-enhanced ultrasonography index  
CMLV : Cellules musculaire lisse des vaisseaux  
COX : Cyclooxygénase  
CYP450 : Cytochrome P450  
DGLA : Acide dihomo-gamma-linolénique  
DHA : Acide docosahexaénoïque  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DOX : Doxorubicine  
DPA : Acide docosapentaénoïque  
EGF : Epithelial growth factor  
EGFR : Récepteur du facteur de croissance de l'épithélium.  
EPA : Acide eicosapentaénoïque  
EPA : Acide pentaénoïque  
EPO : Erythropoïétine  
ER : Récepteurs des oestrogènes  
ERH : Élément de réponse hormonal  
ERO : Espèce réactive de l'oxygène  
ERO : Espèces réactives de l'oxygène  
EtOH : Ethanol  
FADH2 : Flavine adénine dinucléotide  
FAS : Fatty acid synthase  
FDA : Food and Drug Administration  
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes  
FMNH2 : Flavine dinucléotide  
G6PD : Glucose 6 phosphate deshydrogénase  
GC : Chromatographie en phase gazeuse  
GLA : Acide gamma-linolénique  
GPx : Glutathion peroxydase  
GR : Glutathion réductase  
GSH : Glutathion réduit  
GSH  $\Sigma$ ase : Glutathion synthétase  
GSSG : Glutathion oxydé  
GST : Glutathion -S-transférase  
HIF : Hypoxia inducible factor  
HRE : Hypoxia response element  
ICMS : Imagerie confocale multispectrale  
IL : Interleukine

INF : Interféron  
iNOS : Inducible nitric oxide synthase  
LA : Acide linoléique  
LDL : Low density lipoprotein  
LOX : Lipoxygénase  
LPL : lipoprotéine lipase  
LT : Leucotriènes  
MDA : malondialdéhyde  
MMP : métalloprotéase  
NAC : N-Acétyl cystéine  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NFκB : Nuclear Factor κB  
NMU : N-méthyl nitrosourée  
OA : Acide oléique  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
P53 : Protéine P53  
PDGF : Facteurs de croissance des cellules endothéliales dérivés des plaquettes  
PDI : Power Doppler index  
PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule  
PF-4 : Facteur Plaquettaire 4  
PG : Prostaglandine  
PGI : Prostacycline  
PgP : P-glycoprotéine  
PgP : P-glycoprotéine  
PHD : Prolyl hydroxylase  
PO2 : Pression partielle en oxygène  
PPAR : Peroxisome Proliferator Activated-Receptor  
PPRE : Peroxisome proliferator response élément  
PR : Récepteur de la progestérone  
Q-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, quantitative  
RAR : Récepteur de l'acide rétinoïque  
RE : Réticulum endoplasmique  
ROI : Région d'intérêt  
ROOH : Hydroperoxydes lipidiques  
RXR : Récepteur du rétinoïde X  
SOD : Superoxyde dismutase  
TEP : Tomographie par émission de positrons  
TGF : Transforming growth factor  
THBS : Thrombospondine  
TIMP : Inhibiteur tissulaire de métalloprotéases  
TNF : Facteur de nécrose tumorale  
TR : Hormone thyroïdienne  
TX : Thromboxanes  
VDR : récepteur de la vitamine D  
VECAM : Vascular cell adhesion molecule  
VEGF : Vascular endothélium growth factor  
VEGFR : Récepteur au VEGF  
VHL : Protéine von Hippel Lindau  
Vit A : Vitamine A  
Vit C : Vitamine C  
Vit E : Vitamine E  
VLDL : Very low density lipoprotein  
γGCS : Gamma glutamyl cystéine synthétase

## Préambule

Actuellement, le cancer du sein est le plus fréquent des cancers dans le monde chez la femme et représente la première cause de décès par cancer chez la femme. Ainsi le cancer du sein représente un problème mondial majeur de santé publique.

La chimiothérapie et la radiothérapie, avec l'hormonothérapie, constituent les deux grandes thérapeutiques du cancer du sein. Cependant, l'efficacité de ces traitements est limitée principalement par l'existence ou l'apparition de résistance des cellules tumorales. Ainsi, l'augmentation de l'activité de ces agents anticancéreux constitue l'objectif prioritaire du traitement du cancer du sein.

L'intérêt de la Cancérologie pour les lipides d'origine marine (acides gras polyinsaturés n-3 – AGPI n-3) prend son origine dans les données de l'épidémiologie qui indiquent que des apports alimentaires réguliers de ces acides gras sont associés à un moindre risque de cancers du sein, du colon, du rectum et de la prostate, suggérant qu'ils pourraient être protecteurs vis-à-vis de ces cancers. Certaines études ont montré que les apports alimentaires en AGPI n-3 inhibent le développement et la croissance des tumeurs mammaires dans divers systèmes expérimentaux chez le rongeur et cela a renforcé cet intérêt en offrant la perspective d'une prévention alimentaire de certains cancers. Cet intérêt s'est récemment accru lors d'études où l'analyse des acides gras du tissu adipeux de patientes atteintes de cancer du sein (reflétant les apports en acides gras de l'alimentation passée) a montré que la présence d'AGPI n-3, notamment d'acide docosahexaénoïque (22:6n-3, DHA) améliore la réponse des tumeurs à la chimiothérapie<sup>1</sup>.

De précédentes études du laboratoire ont montré *in vitro* (sur des lignées tumorales mammaires humaines) et *in vivo* (modèle de carcinogenèse mammaire chimioinduite chez le rat) qu'une supplémentation en DHA est capable d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux anthracyclines (chimiosensibilisation)<sup>2, 3</sup>. L'annulation de l'action chimiosensibilisante du DHA par l'addition d'un antioxydant, la vitamine E, dans le régime alimentaire suggère que le stress oxydant pourrait être impliqué dans l'effet du DHA.

Outre le stress oxydant, la diminution de la vascularisation tumorale semble être aussi un mécanisme important de l'effet du DHA. Dans l'expérimentation *in vivo* citée ci-dessus, parallèlement à la mesure de croissance tumorale, la vascularisation tumorale a été observée par échographie Doppler-puissance avant et au cours de cette chimiothérapie à l'épirubicine. Une réduction de la vascularisation tumorale par le régime alimentaire enrichi en DHA avant même toute injection d'épirubicine suggère que le DHA pourrait augmenter la chimiosensibilisation des tumeurs en modifiant le réseau vasculaire tumoral<sup>4</sup>.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action du DHA dans la sensibilisation des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux. Pour cela plusieurs pistes ont été explorées :

1/ le captage, la distribution et la métabolisation d'agents anticancéreux dans les cellules tumorales mammaires humaines

<sup>1</sup> Bougnoux P. Br J Cancer. 1999. PMID: 10206290.

<sup>2</sup> Germain E. Int J Cancer. 1998. PMID: 9466659.

<sup>3</sup> Colas S. Nutr Cancer. 2005. PMID: 15860440.

<sup>4</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.

2/ le stress oxydant des cellules tumorales mammaires.

3/ la modification de l'ensemble de la vascularisation tumorale (micro-, medium- et macro-vascularisation).

# Introduction



## Le Cancer du sein

### .A Epidémiologie : situation actuelle

Source : Données sur la situation sanitaire et sociale en France établi par la Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques), et l'étude de Remontet et ses collaborateurs <sup>5</sup>.

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde (**Figure 1**). Il existe cependant une grande variabilité géographique de son incidence. En effet, dans les pays industrialisés, l'incidence est 5 fois plus élevée que dans les pays en voie de développement. C'est en Afrique et en Asie que l'incidence est la plus faible (< 30 pour 100 000). En Amérique du Sud et en Europe de l'Est, l'incidence est intermédiaire (entre 40 et 30 pour 100 000). Enfin c'est l'Europe de l'Ouest et l'Amérique du Nord où l'incidence la plus forte (100 pour 100 000) <sup>6,7</sup> (**Figure 2**).

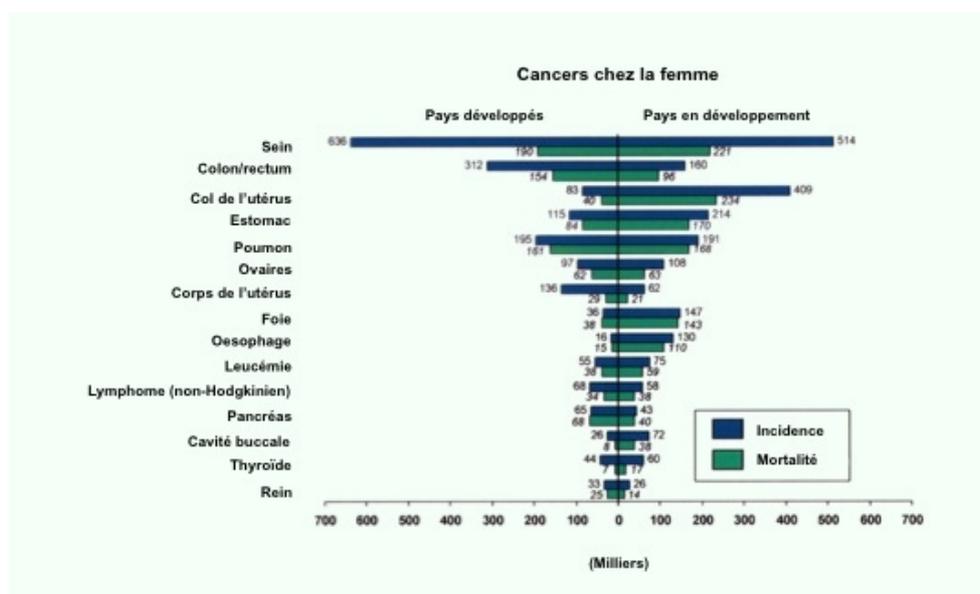
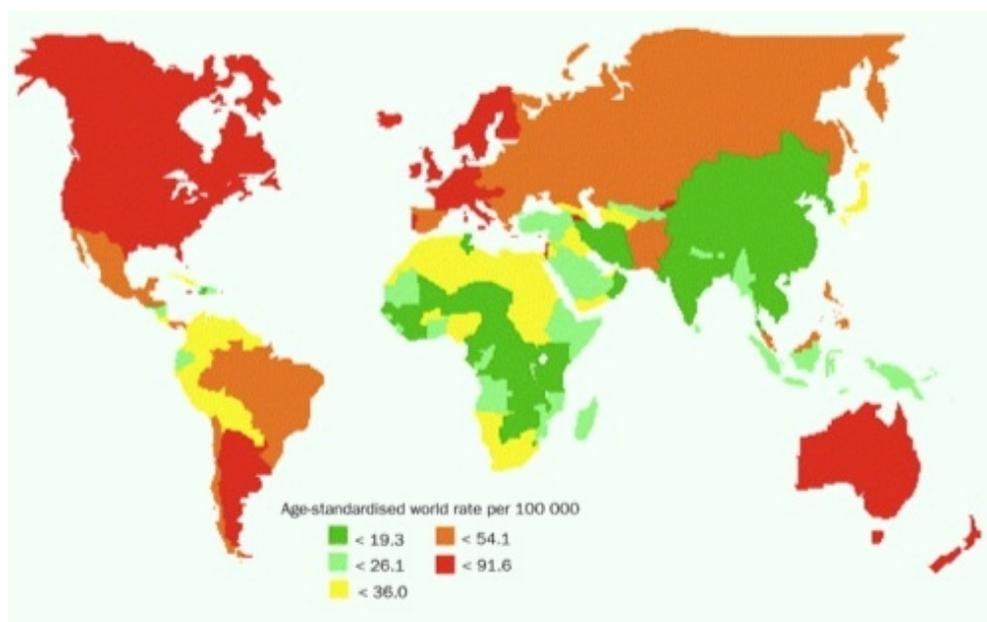


Figure 1 : Incidence et mortalité par cancers dans le monde chez la femme en 2002 (tirée de Parkin DM. CA Cancer J Clin. 2005. PMID : 15761078.)

<sup>5</sup> Remontet L. Rev Epidemiol Sante Publique. 2003. PMID : 12684578.

<sup>6</sup> Jemal A. CA Cancer J Clin. 2004. PMID : 14974761.

<sup>7</sup> Parkin DM. CA Cancer J Clin. 2005. PMID : 15761078.



**Figure 2 : Disparité géographique mondiale des taux d'incidence du cancer du sein chez la femme**

(tirée de Parkin DM. Lancet Oncol. 2001. PMID : 11905707.) Les taux d'incidence sont donnés pour 100 000 femmes.

Parmi les pays européens, la France a une incidence élevée de cancer du sein (89 pour 100 000 femmes) qui ne cesse d'augmenter d'année en année<sup>8</sup> et surtout depuis 1985 du fait du dépistage. Cependant pour interpréter ces variations, il faut tenir compte de l'augmentation du nombre d'habitants en France (de 22 % entre 1968 et 2000), et du vieillissement de la population puisque la fréquence des cancers augmente rapidement avec l'âge au delà de 45 ans.

Outre le vieillissement de la population, l'augmentation de l'incidence pourrait s'expliquer par trois principaux facteurs classés par ordre d'importance selon le rapport sur les « causes du cancer en France en 2000 »<sup>9</sup> :

- « un effet dépistage » : en effet l'introduction de méthodes diagnostiques ultrasensibles et peu traumatisantes telle que la mammographie, augmente le nombre de cancers détectés et découvre des petits cancers dont le potentiel évolutif est faible, dont le volume aurait pu rester stable pendant de longues périodes.
- les facteurs de risque individuel tels que les traitements hormonaux et l'obésité.
- des facteurs comportementaux tels que le tabagisme, la consommation d'alcool, le manque d'exercice physique, l'exposition aux rayonnements ultraviolets.

Le cancer du sein représente environ 36 % des cancers de la femme avec 41845 nouveaux cas de cancers du sein pour 117 228 cas de cancers. Les chiffres sont accablants : une femme sur dix sera atteinte d'un cancer au cours de sa vie et un cancer sur trois est un cancer du sein pour les femmes de 50 à 65 ans<sup>10</sup>.

Le cancer du sein occupe également le premier rang de mortalité par cancer chez la femme de 35 à 55 ans (Réseau français des registres du cancer, 2003). Depuis plus de dix ans, le taux de mortalité diminue lentement en France

<sup>8</sup> Remontet L. Rev Epidemiol Sante Publique. 2003. PMID : 12684578.

<sup>9</sup> Attributable causes of cancer in France in the year 2000, OMS-Centre international de recherche sur le cancer, Group reports volume 3, 2007.

<sup>10</sup> Renaud R. Rev Prat. 1992. PMID : 1604167

(-1 % par an) malgré une incidence qui ne cesse de croître. L'amélioration des traitements serait une des causes de la stagnation de la mortalité. Malgré ces avancées qui permettent une survie globale d'environ 80 % à 5 ans, plus d'un tiers des personnes atteintes décèderont. On estime à 50 % le taux de rechute dans les 10 ans, une fois sur quatre sous forme locale, sur la paroi ou le sein conservé, et trois fois sur quatre sous forme métastatique.

## .B Gènes prédisposant/ facteurs environnementaux

Les facteurs de risques sont multiples, on distingue :

### .1 Facteur de risque familial

Les cancers du sein héréditaires représentent 5 à 10 % de l'ensemble des cancers mammaires . Un antécédent de cancer du sein dans une famille augmente le risque de chaque parent de développer un cancer du sein au cours de sa vie. La fréquence des formes familiales de cancer du sein et les cancers du sein précoce chez de jeunes femmes conduisent à évoquer le caractère héréditaire de ce cancer.

L'association entre les gènes *BRCA* (Breast Cancer gene) et le risque de survenue d'un cancer familial précoce du sein a été décrit pour la première fois en 1992 par Hall et al <sup>11</sup>. En effet, la mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* est impliquée dans 10 % des cas de cancers du sein et de l'ovaire avec *BRCA1* plus associé au cancer du sein et de l'ovaire et *BRCA2* plutôt lié au cancer du sein <sup>12</sup>. Le gène *BRCA1* muté est retrouvé dans 40 à 45 % des cas de cancers du sein héréditaires mais dans le cas de cancers sporadiques ce gène n'est quasiment jamais muté <sup>13</sup>.

### .2 Facteur de risque hormonal

L'exposition aux hormones qu'elles soient de nature endo- ou exogènes est associée à une augmentation du risque de cancer du sein. Les hormones endogènes sont largement impliquées dans le développement de la glande mammaire et jouent, de ce fait, un rôle important dans le risque du cancer du sein. En effet, une surexposition aux œstrogènes endogènes est associée à un risque élevé <sup>14</sup> car ils favorisent la prolifération tissulaire mammaire <sup>15</sup>. Au contraire la progestérone aurait un rôle protecteur. De plus, une grossesse menée à terme avant 20 ans, ainsi que l'allaitement, diminuent considérablement les risques. Les facteurs endogènes incluent aussi l'apparition précoce des règles (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans), la nulliparité, l'absence de grossesse menée à terme avant 30 ans <sup>16 17</sup>.

L'utilisation d'hormones exogènes incluant la contraception orale et les traitements hormonaux prescrits au moment de la ménopause augmentent le risque de cancer du sein de 24 % selon le groupe d'étude « Collaborative group on

<sup>11</sup> Hall JM. Am J Hum Genet. 1992. PMID : 1598904.

<sup>12</sup> McPherson K. BMJ. 2000. PMID: 10977847

<sup>13</sup> Rosen EM. J Cell Physiol. 2003. PMID: 12767038.

<sup>14</sup> Keen JC. Cancer. 2003. PMID: 12548582.

<sup>15</sup> Platet N. Crit Rev Oncol Hematol. 2004. PMID: 15207254.

<sup>16</sup> Clavel-Chapelon F. Br J Cancer. 2002. PMID: 11875733.

<sup>17</sup> Chajès V. Am J Epidemiol. 2008. PMID : 18390841.

hormonal factors in breast cancer »<sup>18</sup>.

### **.3 Mastopathies bénignes**

Un grand nombre d'études ont montré que les femmes ayant eu une ou plusieurs biopsies du sein pour mastopathie ont un risque plus élevé de développer un cancer. Cependant, lorsque les résultats sont analysés en fonction du caractère prolifératif ou non, seul le groupe avec des lésions prolifératives présente un risque augmenté<sup>19</sup>.

### **.4 Facteur de risque nutritionnel : les lipides alimentaires**

Plusieurs études ont établi des disparités géographiques dans l'incidence du cancer du sein, et certaines conduites au niveau des populations migrantes ont montré le rôle important des facteurs environnementaux comme l'alimentation<sup>20</sup>. Dans le cas de la carcinogenèse mammaire, un exemple bien décrit est celui de la migration des japonaises aux Etats-Unis. En effet, l'incidence du cancer du sein au Japon est plus faible que celle des Etats-Unis. Des études ont montré que lorsque les japonaises émigrées aux Etats-Unis adoptaient le régime alimentaire de la terre d'accueil, leur risque de cancer du sein était alors équivalent à de celui des américaines<sup>21</sup>. Ces modifications de l'incidence du cancer du sein ont été corrélées à un changement des habitudes alimentaires, en particulier dans le type d'acides gras consommés. La relation entre les lipides alimentaires et le risque de cancer du sein dépendrait plus du type d'acides gras (saturés, monoinsaturés, polyinsaturés n-6 et n-3) que de la quantité d'acides gras totaux<sup>22</sup>.

Certaines études analysant le rapport des AGPI n-6/n-3 sur le risque de cancer du sein<sup>23 24 25</sup> ont montré que ces deux familles d'AGPI pouvaient influencer de façon opposée le risque de cancer du sein ainsi que son évolution. Les études épidémiologiques descriptives ont montré qu'une consommation élevée en poisson (riche en AGPI n-3) était corrélée avec une faible incidence du cancer du sein<sup>26 27</sup>. De plus, l'étude de l'évolution des habitudes alimentaires des femmes japonaises au cours de ces dernières décennies a permis de mettre en évidence qu'une diminution de la consommation en poisson au profit d'une augmentation de la consommation d'huiles végétales riches en AGPI n-6 s'accompagnait d'une augmentation de l'incidence du cancer du sein<sup>28</sup>. L'effet protecteur des AGPI n-3 est dépendant des niveaux d'AGPI n-6<sup>29</sup> et d'antioxydants<sup>30</sup> présents dans l'alimentation.

En revanche, cet effet protecteur des AGPI n-3 n'est pas toujours retrouvé

---

<sup>18</sup> Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. (1996). Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer." Contraception 54(3 Suppl): 1S-106S

<sup>19</sup> Ferrero JM. 1999. <http://www.medespace.com/cancero/doc/sein.html>

<sup>20</sup> Kolonel LN. Nat Rev Cancer. 2004. PMID : 15229477.

<sup>21</sup> Muir CS. Br J Cancer Suppl. 1996. PMID : 8782793.

<sup>22</sup> Wynder EL. Cancer. 1986. PMID : 3756804.

<sup>23</sup> Simonsen N. Am J Epidemiol. 1998. PMID : 9508101.

<sup>24</sup> Goodstine SL. J Nutr. 2003. PMID : 12730430.

<sup>25</sup> Bagga D. Nutr Cancer. 2002. PMID : 12416257.

<sup>26</sup> Sasaki S. Prev Med. 1993. PMID : 8483858.

<sup>27</sup> Caygill CP. Br J Cancer. 1996. PMID : 8679451.

<sup>28</sup> Lands WE. Biochim Biophys Acta. 1992. PMID : 1463766.

<sup>29</sup> Chajès V. World Rev Nutr Diet. 2003. PMID : 14579688.

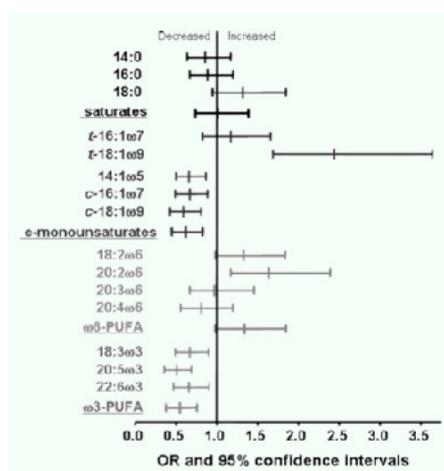
<sup>30</sup> Bougnoux P. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1999. PMID : 10453342.

## Introduction

du fait, en partie, de difficultés méthodologiques dans l'estimation des apports alimentaires<sup>31</sup>. L'utilisation de biomarqueurs permet de pallier à ses difficultés en assurant des mesures objectives et qualitatives des apports alimentaires.

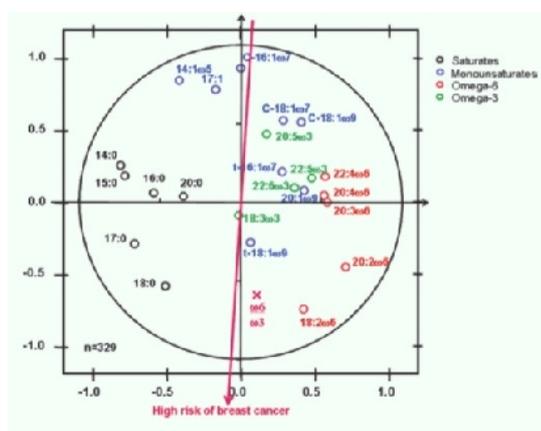
Il est aussi nécessaire de distinguer les études qui évaluent la répartition des acides gras dans les phospholipides des membranes des hématies (reflet de la ration lipidique à court terme), de celles étudiant la répartition des acides gras dans les triglycérides du tissu adipeux (reflet de la ration lipidique à long terme)<sup>32</sup>. Pour exemple : une étude récente de cohorte<sup>33</sup> étudiant la relation entre la composition en acides gras des phospholipides des hématies et le risque du cancer du sein n'a pas montré d'effet protecteur des AGPI n-3. A contrario, une autre étude portant cette fois sur l'analyse des triglycérides du tissu adipeux a permis d'associer plusieurs AGPI n-3 à une diminution du risque de cancer du sein, ainsi qu'à une diminution de la probabilité de métastases chez les patients ayant développé un cancer du sein. Ces lipides sont l'acide alpha linoléique (18:3n-3) et le DHA (22:6n-3)<sup>34</sup> et l'acide eicosapentaénoïque (EPA)<sup>35</sup> (**Figure 3**).

Il est difficile de prendre en compte le risque de cancer du sein associé à chaque acide gras dans le tissu adipeux des patientes de l'étude citée précédemment. En effet, un seul acide gras ne peut être considéré comme un biomarqueur indépendant du risque du cancer du sein. La notion de lipidome a récemment été développée au laboratoire d'après l'analyse du tissu adipeux de 329 patients<sup>36</sup> afin de rendre compte du profil global en acides gras du tissu adipeux trouvé chez chaque individu (**Figure 4**). Chaque acide gras peut ainsi être positionné par rapport au risque de cancer du sein (flèche rouge). L'analyse tient compte de plus de l'index de masse corporelle et de l'âge. Ainsi, un profil de tissu adipeux avec peu d'acide linoléique, un ratio AGPI n-6 / AGPI n-3 faible, et de forts taux d'acides gras mono-insaturés diminue le risque du cancer du sein. Ce profil protecteur reflète assez bien les apports des régimes de type « méditerranéens ».



**Figure 3 : Risque relatif de cancer du sein par acide gras du tissu adipeux.**

Tiré de Bougnoux P. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006. PMID: 16537692. OR = odd ratio.



**Figure 4 : Analyse en composantes principales des acides gras du tissu adipeux et risque de cancer du sein.**

Tiré de Bougnoux P. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006. PMID: 16537692.

Analyse en composantes principales qui permet de positionner chaque acide gras par rapport au

<sup>31</sup> Chajès V. Int J Cancer. 1999. PMID: 10521790.

<sup>32</sup> Kohlmeier L. Environ Health Perspect. 1995. PMID : 7635122.

<sup>33</sup> Chajès V. Am J Epidemiol. 2008. PMID : 18390841.

<sup>34</sup> Maillard V. IARC Sci Publ. 2002. PMID: 12484221.

<sup>35</sup> Bougnoux P. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006. PMID: 16537692.

<sup>36</sup> Bougnoux P. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006. PMID: 16537692.

risque de cancer du sein (flèche rouge).

## .5 Autres facteurs de risques

D'autres facteurs tels que l'âge, une taille élevée des femmes à l'adolescence, traduisant une croissance rapide <sup>37</sup>, un tabagisme élevé de longue durée, la sédentarité l'obésité sont des facteurs de risque <sup>38 39</sup>.

Plus de 100 études épidémiologiques ont montré l'association entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein. L'augmentation du risque du cancer du sein par l'obésité <sup>40</sup> ou l'alcool <sup>41</sup> est certainement liée à l'augmentation des taux circulants d'oestrogènes.

## .C La Glande mammaire : structure, évolution, et tumourisation

### .1 La Glande mammaire : structure, évolution.

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme. La glande mammaire se compose de 15 à 25 lobes disposés en rayons autour de l'aréole. Les lobes sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif dense et du tissu adipeux. À l'intérieur de chaque lobe se trouvent des unités plus petites appelées lobules qui renferment des groupes de glandes alvéolaires. Les glandes alvéolaires de chaque lobule sécrètent le lait dans les conduits lactifères qui s'ouvrent par un ostium à la surface du mamelon (**Figures 5 et 6**).

---

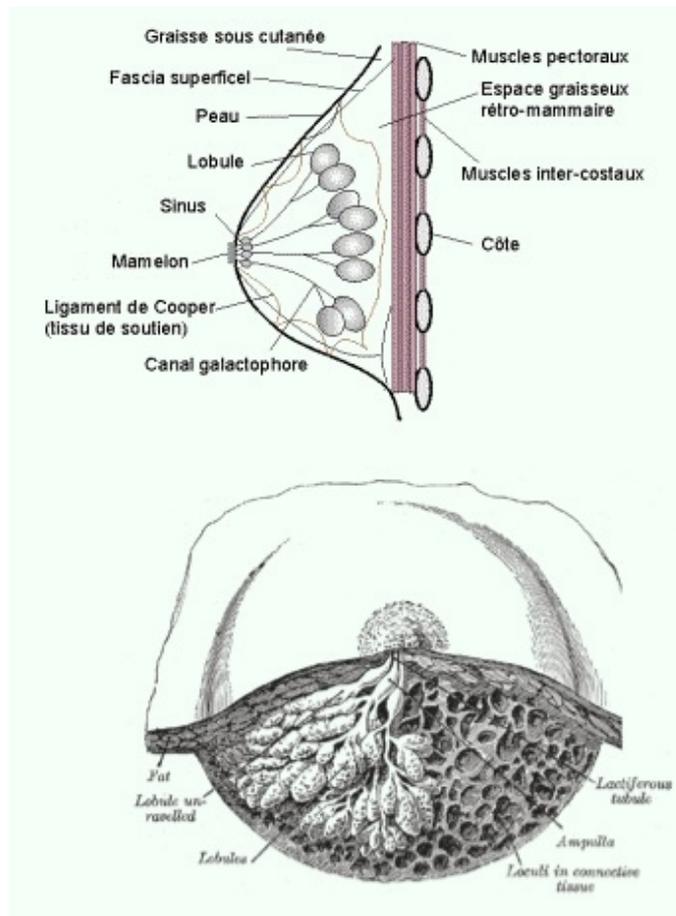
<sup>37</sup> Chajès V. Am J Epidemiol. 2008. PMID : 18390841.

<sup>38</sup> Gerber B. Breast Cancer Res Treat. 2003. PMID: 12825861.

<sup>39</sup> World Health Organisation. CI (2003). KP Stewart B, editors. (ed.), world cancer report. Lyon: IARC press, pp. 11-9

<sup>40</sup> Gerber B. Breast Cancer Res Treat. 2003. PMID: 1282586.

<sup>41</sup> World Health Organisation. CI (2003). KP Stewart B, editors. (ed.), world cancer report. Lyon: IARC press, pp. 11-9



**Figure 5 : Coupes schématiques d'une glande mammaire à l'état adulte**

Tirées de

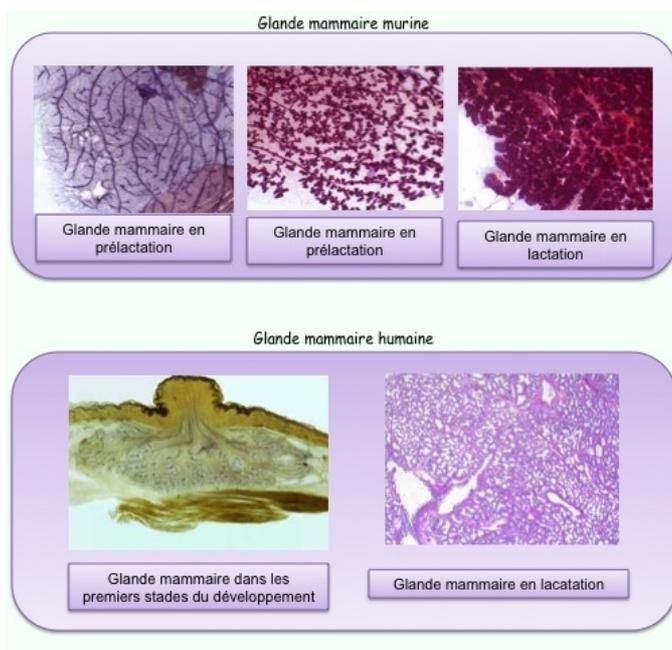
[http://accres.inrp.fr/accres/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemammaire/glande\\_mamm\\_cancerisation](http://accres.inrp.fr/accres/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemammaire/glande_mamm_cancerisation) et de Gray H. Anatomy of the human body. bartleby.com.

Cette architecture se construit tout au long de la vie, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance et une coopération permanente s'établit entre les deux compartiments cellulaires.

Au cours de la vie fœtale, et plus particulièrement lors du troisième trimestre de la grossesse, la mère produit des œstrogènes et de la progestérone qui provoquent chez le fœtus une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme mammaire, la formation des canaux galactophores, ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Après la naissance, la glande reste dans cet état rudimentaire jusqu'à la puberté où les premières modifications ovariennes apparaissent, avec la mise en place des cycles menstruels. La glande mammaire est alors soumise à une alternance d'exposition aux œstrogènes (1<sup>ère</sup> moitié du cycle) et aux œstrogènes + progestérone (2<sup>ème</sup> moitié du cycle). Durant la phase folliculaire, la production d'œstrogènes est associée à une prolifération de l'épithélium canalaire. Pendant la seconde moitié du cycle (la phase lutéale) l'augmentation de la progestérone provoque la dilatation des canaux et une différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires <sup>42</sup>. En l'absence de grossesse, la glande reste dans cet état. Au cours de la grossesse, sous l'influence des œstrogènes, de la progestérone et de facteurs de

<sup>42</sup> Anderson TJ. Br J Cancer. 1982. PMID: 7126427.

croissance, les ramifications terminales des canaux se multiplient (développement de l'appareil sécrétoire) et de nombreuses alvéoles se développent. En fin de grossesse et tout au long de la lactation, les alvéoles produisent du lait, qui sera acheminé jusqu'au mamelon par les canaux galactophores. Lors du sevrage, les alvéoles régressent. Lors de la ménopause, le déclin des fonctions ovariennes provoque une régression des structures de la glande mammaire, les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent à régresser avec l'âge (lobule de type 1).



**Figure 6 : Coupes histologiques de glandes mammaires murine et humaine.**  
Tirées de <http://ccm.ucdavis.edu/bcancercd/contents.html>.

Ainsi, sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance, la glande mammaire est en évolution permanente et représente une cible privilégiée pour les transformations malignes <sup>43</sup>.

## .2 La lésion mammaire : évolution et facteurs pronostiques

Les carcinomes *in situ* correspondent à une prolifération tumorale maligne épithéliale limitée à l'épithélium et n'ayant donc pas encore franchi la membrane basale, par opposition au carcinome infiltrant. Plus de 80 % des tumeurs mammaires sont des carcinomes canaux infiltrants.

Toutes les patientes ayant une tumeur de taille semblable n'auront pas une évolution identique : certaines resteront en rémission complète pendant de nombreuses années voire définitivement après leur traitement initial ; d'autres rechuteront, soit localement, soit en développant des métastases. Les facteurs pronostiques permettent d'identifier des sous-groupes de patientes dont les risques de rechute locale ou à distance sont comparables et de leur proposer un traitement adapté.

La classification la plus répandue en matière de cancer du sein est la

<sup>43</sup> Olsson H. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000. PMID: 11162943.

**classification TNM** (nomenclature retenue par l'Union Internationale Contre le Cancer, UICC). Elle recueille lors du stade pré-thérapeutique de la maladie, les informations concernant :

- *la taille de la tumeur* (T), mesurée par palpation et imagerie médicale;
- *les adénopathies satellites* (N) : le statut ganglionnaire recherché par la palpation ;
- *l'existence de métastases* (M), déterminée par examen clinique et imagerie.

D'une façon générale, à ces 3 lettres, des chiffres sont associés. Leur valeur augmente avec la gravité. Ils varient de 0 à 4 pour le T, de 0 à 3 pour le N, et 0 ou 1 pour le M. Les combinaisons lettres + chiffres donnent une description abrégée de l'extension de l'état de la tumeur maligne. Le nombre de combinaisons étant très important, un regroupement en stades (de 0 à IV) est effectué.

Parallèlement à ces renseignements cliniques, des **paramètres anatomo-pathologiques** permettent d'apprécier les potentialités cellulaires invasives, prolifératives et métastatiques. Au sein de ces facteurs, l'étude du *grade Scarff, Bloom et Richardson* (grade histopronostique SBR) permet de déterminer le grade des cancers canaux (soit plus de 80% des cas) en donnant un score entre 1 et 3 aux trois éléments histologiques suivants : pauvreté en structures glandulaires bien définies, irrégularité des noyaux et richesse en mitose. Les éléments sont successivement additionnés afin d'obtenir le score global. Plus ce score est élevé, plus la tumeur est agressive et plus le pronostic est mauvais <sup>44</sup>.

À côté de ces facteurs traditionnels, des **facteurs biologiques** ont un intérêt pronostique important. Parmi ces facteurs, l'étude des *récepteurs hormonaux* (de la progestérone et des œstrogènes) représente l'un des paramètres les plus reproductibles. Leur mesure permet une information directe quant au degré d'hormono-dépendance de la tumeur, paramètre étroitement corrélé à l'hormono-sensibilité. Soixante dix pour cent des tumeurs mammaires possèdent des récepteurs aux œstrogènes. D'autres éléments permettent d'évaluer *l'activité proliférative tumorale*, comme par exemple la détermination du nombre de cellules en phase S par cytométrie de flux, ou encore *le potentiel invasif tumoral*, déterminé par exemple à l'aide d'un dosage de protéases.

---

<sup>44</sup> Elston CW. Histopathology. 1991. PMID : 1757079.

# La chimiothérapie dans le cancer du sein

Outre la prévention, les principales approches pour diminuer le risque de cancer du sein et le guérir sont la détection précoce (autopalpation des seins), le diagnostic qui fait appel à des techniques d'imagerie (échographie, endoscopie, radiographie) et histologiques (anatomopathologie), et enfin les traitements curatifs et palliatifs.

Le traitement du carcinome canalaire *in situ* se limite au traitement loco-régional. Le risque métastatique étant minime, il n'y a donc pas d'indication à un traitement adjuvant systémique.

Au contraire, dans le cas de la majorité des cancers du sein, à savoir des carcinomes canauxaires infiltrant, la maladie doit être considérée comme hétérogène à la fois locale et générale. En conséquence, le traitement sera à la fois <sup>45</sup>

- loco-régional : chirurgie et radiothérapie. Dans la grande majorité des cas c'est le premier des traitements. En revanche, dans certains cas tels que les cancers inflammatoires ou certaines tumeurs très volumineuses, la prise en charge par la chirurgie en premier lieu est contre-indiquée. En effet ces situations vont nécessiter une **thérapeutique systémique dite néo-adjuvante** puisqu'elle intervient avant le traitement loco-régional.

- général ou systémique : en traitement néo-adjuvant (comme cité ci-dessus) ou adjuvant (qui a lieu après le traitement loco-régional) pour prévenir ou traiter des métastases grâce à la chimiothérapie et/ou l'hormonothérapie, les thérapies ciblées à visée moléculaire (ex : le trastuzumab anticorps anti ErbB-2). En effet, même si le cancer ne se présente que sous une forme localisée, il est en réalité dans la majorité des cas, une maladie à fort potentiel métastatique. Près de la moitié des patientes atteintes d'un cancer du sein et traitées exclusivement au niveau loco-régional, vont développer des métastases dans les cinq ans.

La séquence de ces diverses modalités thérapeutiques s'intègre dans une stratégie de prise en charge individuelle du patient, en fonction des caractéristiques cliniques, anatomo-pathologiques et biologiques de chaque tumeur citées ci-dessus.

*Les travaux de la présente thèse ayant consistés à étudier l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à l'action des agents anticancéreux, nous nous intéresserons donc plus particulièrement à cette approche.*

## .A Principe de la chimiothérapie

Les agents anticancéreux interfèrent le plus souvent avec la biosynthèse de macromolécules (ADN, ARN, protéines), inhibent la prolifération cellulaire (inhibition des mitoses) et entraînent la mort cellulaire. La chimiothérapie est d'autant plus efficace que les cellules ont une haute fréquence de réplication. Elle est donc surtout active sur les tumeurs à croissance rapide et toxique sur les tissus sains à taux de renouvellement élevé (moelle osseuse, tube digestif, phanères).

---

<sup>45</sup> Namer M. Springer Edition. 2003. Cancer du sein - compte-rendu du cours supérieur francophone de cancérologie. ISBN 2-287-00664-8.

## .B Les différentes classes d'agents chimiothérapeutiques

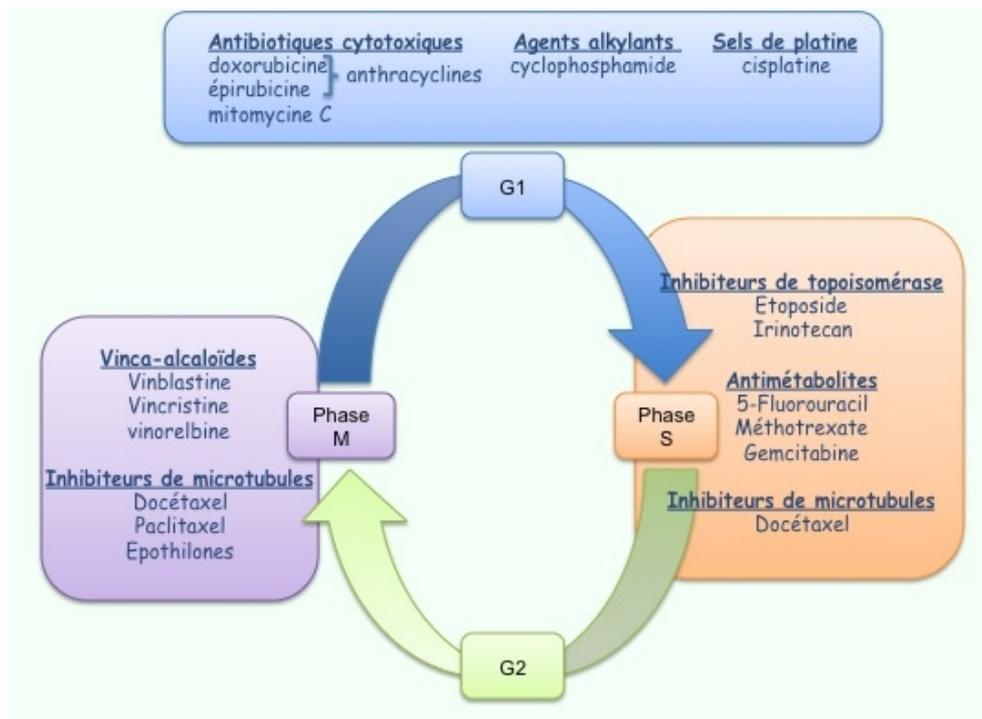
Le cancer du sein est l'un des cancers les plus chimiosensibles. Une réponse tumorale, c'est-à-dire la diminution de plus de 50 % du volume de la tumeur, est observée dans la plupart des cas suivant les agents utilisés. Depuis 25 ans, le traitement du cancer du sein métastatique a évolué de l'ère des anthracyclines dans les années 80, à celle des taxanes dans les années 90, et aujourd'hui à l'ère biologique avec les thérapies ciblées <sup>46</sup>.

Les différentes classes d'agents anticancéreux et leur mode d'action sont résumées dans le **Tableau I** et dans la **Figure 7**.

| CLASSE                                               | ACTION                                                                                                                                                                 |                                                                 | SOUS-CLASSE                                                         | MEMBRES            |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Alkylants                                            | - se lie de manière covalente avec atomes riches en électrons (souffre, azote) de molécules cellulaires (alkylation de la guanine)<br>- produisent des radicaux libres | agents mutagènes                                                | moutardes azotées                                                   | cyclophosphamide   |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | ifosfamide         |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | melphalan          |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | chlorambucil       |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | prednimustine      |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | agents non alkylants (pas de radicaux alkyles mais même action) | moutardes couplées à l'hormonothérapie                              | estramustine       |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | busulfan           |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 | aziridines                                                          | thiotepa           |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | altréamine         |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 | nitroso-urées                                                       | carmustine         |
|                                                      | lomustine                                                                                                                                                              |                                                                 |                                                                     |                    |
|                                                      | streptozotocine                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     |                    |
| Intercalants et inhibiteurs de topoisomérase I et II | - s'intercalent dans l'ADN<br>- inhibent les topoisomérases (complexe stable de topoisomérase / ADN / agent anticancéreux)<br>- produisent des radicaux libres         | anthracyclines                                                  |                                                                     | daunorubicine      |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | doxorubicine       |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | épirubicine        |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | amsacrine          |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | mitoxantrone       |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | acridines                                                       |                                                                     | dactinomycine      |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | campthothécine     |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | inhibiteurs de la topoisomérase I                               |                                                                     | topotécan          |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     |                    |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     |                    |
| Anti-métabolites                                     | - interfèrent avec étapes enzymatiques de synthèse ADN ou ARN                                                                                                          | analogues de l'acide folique                                    |                                                                     | méthotrexate       |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     |                    |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | analogues structuraux des bases puriques                        |                                                                     | cis-mercaptopurine |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | fludarabine        |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | analogues structuraux des bases pyrimidiques                    |                                                                     | 5-fluorouracile    |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | cytarabine                                                      |                                                                     |                    |
| Agents tubulo-affins                                 | - agissent sur le cytosquelette en bloquant l'équilibre dynamique polymérisation/dépolymérisation des microtubules au moment de la mitose                              | inhibiteur de polymérisation des microtubules                   | alcaloïdes dérivés de la pervenche de Madagascar (vinca-alcaloïdes) | vincristine        |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | vinblastine        |
|                                                      |                                                                                                                                                                        | inhibiteurs de dépolymérisation des microtubules                | dérivés de l'If (taxanes)                                           | paclitaxel         |
|                                                      |                                                                                                                                                                        |                                                                 |                                                                     | docetaxel          |
|                                                      | nouveaux taxanes                                                                                                                                                       | épothilones                                                     |                                                                     |                    |

**Tableau I : Les différentes classes d'agents anticancéreux et de leur mode d'action.**

<sup>46</sup> Nabholz JM. Exp Rev Anticancer Ther. 200. PMID : 12113239.



**Figure 7 : Schéma récapitulatif des anticancéreux et de leur action sur le cycle cellulaire.**  
Adapté de McGrogan BT. Biochem Biophys Acta. 2008. PMID : 18068131.

Dans cette partie présentant les différentes classes d'agents anticancéreux, nous développerons plus en détails les caractéristiques des molécules utilisées pour les travaux de cette thèse :

- des anthracyclines et notamment la doxorubicine, l'épirubicine
- des anthracènediones, et notamment la mitoxantrone
- des taxanes et plus particulièrement le docetaxel.

### .1 Les anthracyclines

La doxorubicine (ou adriamycine), composée d'un noyau tétracyclique chromophore relié par une liaison glucosidique à un substitut glucosamine, est l'anthracycline de référence (**Figure 8**).

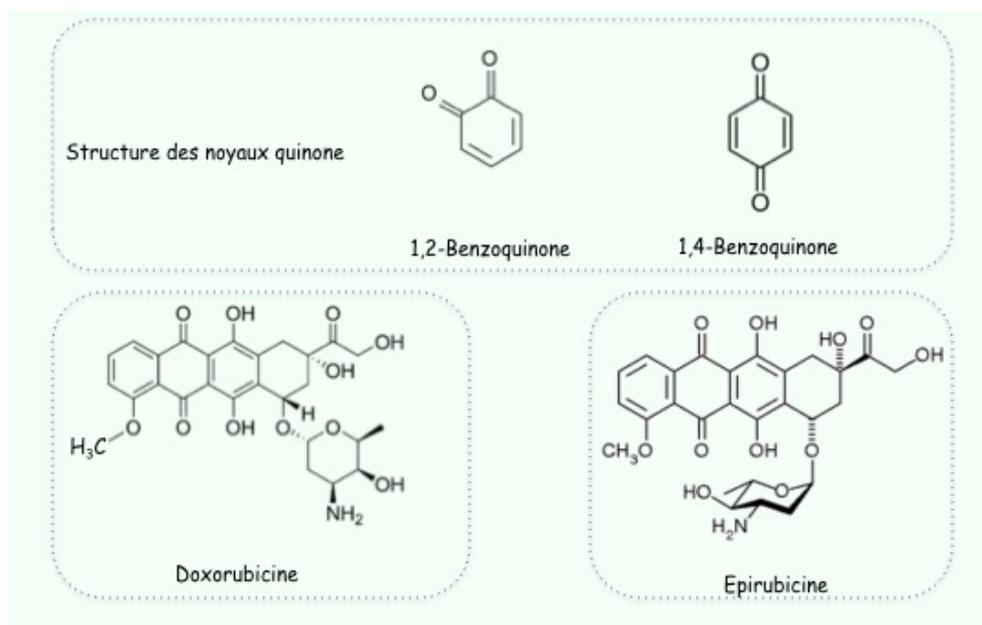


Figure 8 : Structure moléculaire des anthracyclines.

Au pH intracellulaire, le groupement sucré se charge positivement, ce qui permet de stabiliser la drogue intercalée via des liaisons électrostatiques. L'épirubicine est un épimère en 4' de la doxorubicine. Bien que cette différence structurale soit modeste, il en découle quelques spécificités dont les plus manifestes sont une meilleure pénétration cellulaire du fait d'un pKa plus faible et une élimination par glucuronication plus active. Comparée à la doxorubicine, ses caractéristiques donnent à l'épirubicine une meilleure activité anti-tumorale et une toxicité réduite.

Les anthracyclines sont utilisées par voie veineuse. La demi-vie de l'épirubicine est de 35 heures et elle possède une importante diffusion tissulaire. Son transport transmembranaire associe une diffusion passive et un efflux actif (notamment dans les cellules qui expriment la P-glycoprotéine ou PgP). Elle est métabolisée sous forme d'épirubicinol mais également sous forme de dérivés glucuroconjugués de l'épirubicinol et de l'épirubicine. Elle est éliminée principalement par voie biliaire mais également par voie rénale (10 à 15 % de la dose administrée sont retrouvés dans les urines en 7 jours).

Les mécanismes d'actions de ces molécules sont multiples :

En raison de l'existence dans leur structure de cycles plans qui **s'intercalent dans la double hélice des acides nucléiques** et en gênent les fonctions, les anthracyclines entraînent une inhibition de la réplication et la transcription.

**En interférant avec l'activité des topoisomérases** les anthracyclines vont bloquer la réplication et entraîner la mort cellulaire<sup>47</sup>. Les topoisomérases sont des enzymes qui permettent la séparation des brins d'ADN lors des phases de transcription, de réplication et de réparation. Ces topoisomérases sont de deux types : la topoisomérase I, qui crée une rupture monocaténaire et la topoisomérase II, qui coupe les deux brins de l'ADN. La relaxation de la molécule d'ADN est suivie d'une religation du ou des brins coupés. Les agents inhibiteurs des topoisomérases forment un complexe ternaire stable avec l'enzyme et l'ADN

<sup>47</sup> Duguet M. Médecine Sciences. 1994. 10 : 962-72.

scindé, empêchant ainsi la soudure des brins d'ADN.

**L'inhibition de la synthèse d'ADN** par une voie de signalisation impliquant la protéine P53<sup>48</sup> est un autre mode d'action. En effet, la doxorubicine peut induire l'expression de la protéine P53 de manière dose dépendante<sup>49</sup>. En réponse à des niveaux élevés de P53, la synthèse d'ADN est inhibée.

La doxorubicine peut également exercer son action cytotoxique en **interagissant avec les membranes plasmiques**. En effet, la doxorubicine modifie les propriétés de fluidité membranaire<sup>50</sup>. De plus, l'inhibition de l'entrée dans la cellule par couplage de la doxorubicine avec une molécule volumineuse ne supprime pas l'action cytotoxique de la drogue<sup>51</sup>.

Les anthracyclines sont connues pour majorer la **production de radicaux libres oxygénés** et cela contribue à leur action cytotoxique. Ainsi, des études ont mis en évidence une corrélation entre la quantité de radicaux hydroxyles formés et la cytotoxicité induite par la doxorubicine. Cette formation de radicaux libres est induite soit directement lors de la formation de complexes, soit indirectement lors d'une activation métabolique :

En effet les xénobiotiques tels que les anthracyclines, peuvent subir des réactions d'oxydo-réductions par les enzymes de phase I, telles que les cytochromes P450 pour les rendre plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminables par l'organisme. Ce processus est connu pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les anthracyclines peuvent subir d'autres étapes de biotransformation qui consistent en des réactions de réduction impliquant le transfert d'un ou de deux électrons et conduisant à la formation de radical semi-quinone ou d'hydroquinone respectivement. Ces réductions sont catalysées par différentes réductases telles que la NADPH cytochrome P450 réductase, la cytochrome b5 réductase, la xanthine oxydase ou la xanthine déhydrogénase. En présence d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène, le radical semiquinone est oxydé et perd cet électron pour produire des ERO telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, et l'oxygène singulet<sup>52</sup>.

Enfin, le radical semi-quinone des anthracyclines est un réducteur de métaux (en particulier du fer) et forme avec ceux-ci des complexes qui réagissent avec l'oxygène moléculaire ou d'autres espèces oxygénées pour donner des radicaux hydroxyles. Dans ce cas, la formation de radicaux libres oxygénés est indépendante de toute activité enzymatique<sup>53</sup> (**Figure 9**).

Ces radicaux libres induisent une fragmentation de l'ADN et réagissent également avec les AGPI des membranes, provoquant la dégradation des membranes par augmentation de la peroxydation lipidique<sup>54</sup>. De plus, il a été montré que le taux de peroxydes lipidiques générés par la doxorubicine est réduit dans une lignée tumorale mammaire résistante à la doxorubicine, comparativement à celui mesuré dans la lignée homologue sensible<sup>55</sup>.

---

<sup>48</sup> Kastan MB. Cancer Res. 1991. PMID : 1933891.

<sup>49</sup> Lorenzo E. J Biol Chem. 2002. PMID : 11779855.

<sup>50</sup> Siegfried JA. J Biol Chem. 1983. PMID : 6848505.

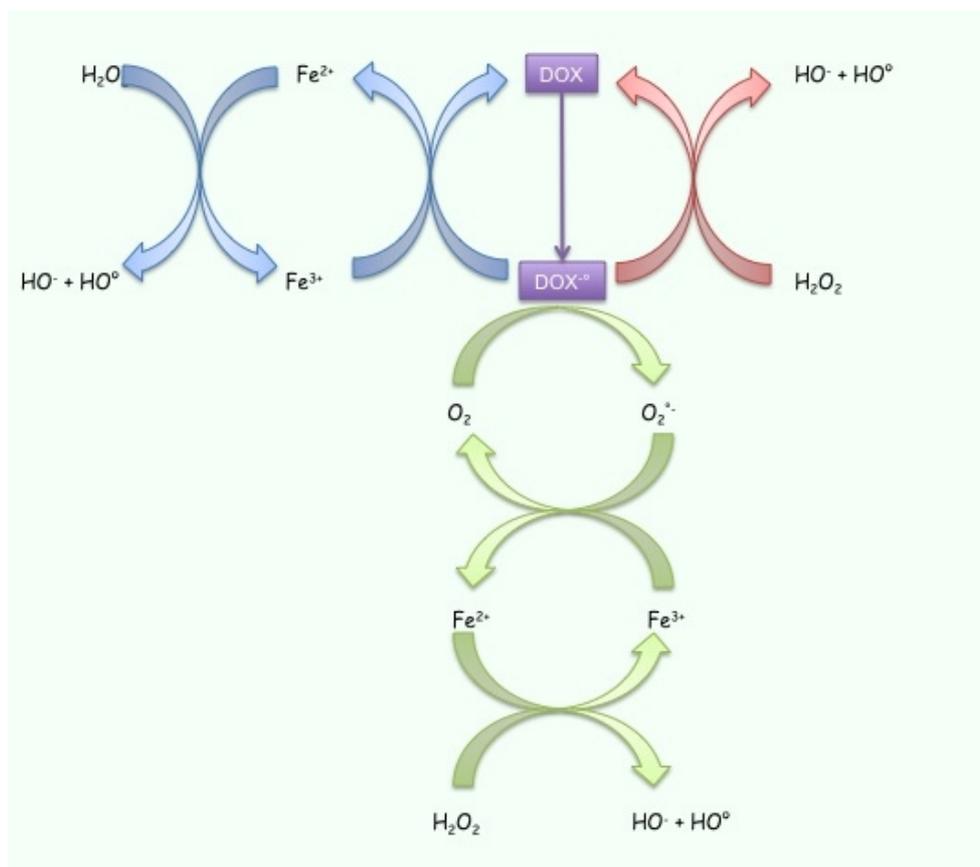
<sup>51</sup> Triton TR. Science. 1982. PMID : 7089561.

<sup>52</sup> O'Brien PJ. Chem Biol Interact. 1991. PMID : 1913977.

<sup>53</sup> Muindi J. Mol Pharmacol. 1985. PMID: 2983184.

<sup>54</sup> Benchekroun MN. Anal Biochem. 1992. PMID: 1632521.

<sup>55</sup> Benchekroun MN. FEBS Lett. 1993. PMID: 8392002.



**Figure 9 : Production de radicaux libres oxygénés au cours de la transformation métabolique de la doxorubicine.**

Trois mécanismes ont été proposés dans la production de radical hydroxyle par le radical semi-quinone de la doxorubicine (indiqués par trois couleurs différentes sur le schéma). DOX : forme native, DOX<sup>•-</sup> : radical semi-quinone, HO<sup>•</sup> : radical hydroxyle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène. A partir de Muindi J. Mol Pharmacol. 1985. PMID: 2983184.

## .2 Les anthracènediones

Les anthracènediones (**Figure 10**) sont des analogues des anthracyclines qui ont été développés pour diminuer les effets secondaires des anthracyclines comme la cardiotoxicité<sup>56</sup>. Tout comme pour les anthracyclines, les acides nucléiques constituent la cible première des anthracènediones par intercalation, ou liaison non covalente<sup>57</sup>. Ces molécules sont aussi connues pour inhiber la prolifération et la synthèse de macromolécules (via l'inhibition des topoisomérases) dans plusieurs lignées tumorales<sup>58</sup>.

Du fait de la présence d'un groupement quinone au sein de sa structure, la mitoxantrone va aussi subir une réduction métabolique comme décrite précédemment pour les anthracyclines. Cependant la génération d'espèces réactives de l'oxygène paraît moins impliqué dans la cytotoxicité de cet agent que pour la doxorubicine<sup>59</sup>.

<sup>56</sup> Smith IE. Cancer Treat Rev. 1983. PMID: 6347376.

<sup>57</sup> Reszka K. Biochem pharmacol. 1998. PMID : 2597197.

<sup>58</sup> Duthie SJ. Br J Cancer. 1989. PMID: 2553092.

<sup>59</sup> Germain E. Int J Cancer. 1998. PMID: 9466659.

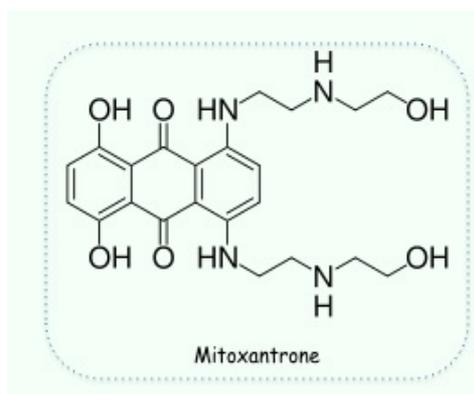


Figure 10 : Structure moléculaire de la mitoxantrone.

### .3 Les taxanes<sup>60</sup>

Les taxanes se fixent sur la tubuline bêta. La fixation ne se fait que sur la tubuline polymérisée et conduit à l'augmentation de la stabilité des microtubules. Les taxanes en inhibant la dépolymérisation de la tubuline (Figure 11) et donc le désassemblage du fuseau mitotique, entraînent ainsi un blocage en mitose en phase G2/M. Les mitoses sont incomplètes, et les cellules s'accumulent en phase G2/M ce qui a pour conséquence la mort cellulaire par apoptose ou par catastrophe mitotique. Le phénomène de catastrophe mitotique se produit notamment lors de cycle cellulaire incomplet où la division cellulaire n'a pas eu lieu alors que les chromosomes se sont dupliqués conduisant à la formation de cellules tétraploïdes après un cycle cellulaire ou à la polyploïdie après plusieurs cycles. Ces cellules anormales sont décrites pour être résistantes à l'apoptose<sup>61</sup>. Par ailleurs, les autres fonctions cellulaires, qui requièrent l'intervention de la tubuline, peuvent aussi être touchées. C'est le cas du transport intracellulaire et de la motilité cellulaire.

Le paclitaxel fut extrait à l'origine de l'if, *Taxus brevifolia*. Il stabilise les microtubules polymérisés, et altère la tension de part et d'autre des kinetochores lors de la mitose.

Le docetaxel qui est un taxane de seconde génération (dérivé semi-synthétique par estérification de la chaîne latérale en 10-deactetyl-baccatin III -le précurseur inactif), présente une affinité supérieure pour le site de fixation sur la tubuline que le paclitaxel. Il affecte l'organisation du centrosome, ce qui a des conséquences sur les phase S, et la transition entre les phases G2/M.

Des études ont montré également un effet antiangiogénique des taxanes *in vitro*<sup>62 63 64</sup> et *in vivo*<sup>65 66</sup>.

<sup>60</sup> McGrogan BT. Biochem Biophys Acta. 2008. PMID : 18068131.

<sup>61</sup> Ivanov A. J. Cell Sci., 2003. PMID : 12953071.

<sup>62</sup> Klauber N. Cancer Res. 1997. PMID : 8988045.

<sup>63</sup> Belotti D. Clin Cancer Res. 1996. PMID : 9816139.

<sup>64</sup> Sweeney CJ. Cancer Res. 2001. PMID : 11309294.

<sup>65</sup> Kushlan DM. J Nat Prod. 1991. PMID : 1800643.

<sup>66</sup> Sweeney CJ. Cancer Res. 2001. PMID : 11309294.

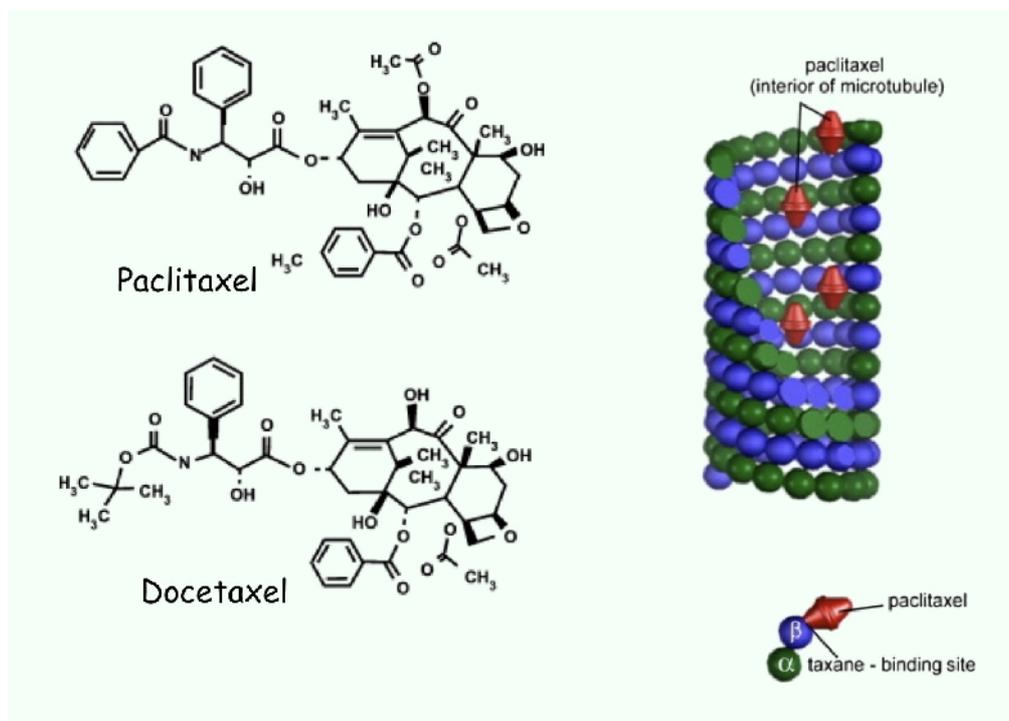


Figure 11 : Structure moléculaire des taxanes et site de fixation sur les microtubules  
Tiré de McGrogan BT. Biochem Biophys Acta. 2008. PMID : 18068131.

## .C Limites de la chimiothérapie

Une des limites de la chimiothérapie est que son effet est non spécifique, non sélectif des cellules tumorales ce qui peut entraîner une toxicité. Son efficacité étant maximale sur des cellules proliférantes, elle ne touche pas les tumeurs à cellules non proliférantes. Il existe une sensibilité variable des cellules au sein d'une même tumeur et cela peut conduire à la sélection de cellules résistantes.

### .1 Effets secondaires

Les principales toxicités communes à la plupart des drogues par effet antiprolifératif atteignent l'appareil digestif (nausées et vomissements, diarrhées ou constipation, mucites), la peau et les phanères (troubles cutanés, alopecie) et le système hématopoïétique (neutropénie, thrombopénie, anémie). Il existe également des toxicités spécifiques du type de drogue utilisée. Ainsi des atteintes de l'appareil cardiovasculaire (mycardiopathie responsables d'insuffisance ventriculaire retardée) sont principalement observées lors de l'utilisation d'anthracyclines, tandis qu'une neuro-toxicité sera plutôt observée avec des agents tubulo-affins, des agents alkylants et des agents anti-métabolites.

### .2 Chimio-résistances

La résistance peut être de deux types : innée, lorsque la tumeur ne répond pas d'emblée à la chimiothérapie, ou acquise, lorsque la tumeur est initialement

## Introduction

---

sensible à la chimiothérapie mais devient progressivement résistante et échappe en cours de traitement, ou lorsqu'elle entre en rémission mais est insensible au traitement lors de la rechute.

La résistance à la chimiothérapie des tumeurs est de mieux en mieux connue. Elle est dépendante de différents mécanismes qui font intervenir des déterminants moléculaires tels que les gènes codant pour la Pgp, les topoisomérases I et II, et les glutathion-S-transférases (GST). De plus des altérations dans d'autres voies de signalisation telles que le contrôle du cycle cellulaire, la croissance et l'apoptose peuvent aussi contribuer à la chimiorésistance.

Elle peut être la conséquence d'un captage insuffisant ou d'une excrétion excessive de la drogue, d'une inactivation ou d'un défaut d'activation intracellulaire de la drogue, ou encore de l'utilisation par la cellule de voies métaboliques parallèles. Cette résistance peut également s'exprimer au niveau tumoral en raison, par exemple, d'une cinétique de croissance trop lente ou d'une proportion trop faible de cellules dans le cycle. Enfin, elle peut être due à une mauvaise distribution de la drogue, conséquence d'une mauvaise vascularisation tumorale.

*L'apparition de résistances étant la première cause d'échec des traitements anticancéreux, augmenter l'efficacité des traitements demeure donc une priorité. Une des stratégies serait d'augmenter les doses d'agents anticancéreux (en augmentant la fréquence des administrations ou la quantité d'agent anticancéreux administré). Cependant la chimiothérapie est connue pour induire des effets secondaires très toxiques, et on ne peut donc pas raisonnablement retenir cette option. Au contraire, augmenter l'efficacité des traitements en augmentant la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux présente un meilleur bénéfice pour le patient car cela permet de réduire les doses administrées. Cette dernière stratégie constitue l'objectif de cette thèse et cela grâce à une supplémentation alimentaire par des acides gras polyinsaturés d'origine marine comme présenté dans le chapitre suivant.*

**Objectif** des travaux de thèse.

---

## Acides gras et cancer

### .A Nomenclature des acides gras (AG)

Les acides gras ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-COOH}$ ) sont composés de deux parties :

- une partie hydrophobe représentée par une chaîne carbonée terminée par un groupe méthyle,
- une partie hydrophile correspondant à un groupe acide carboxylique.

Leur classification est basée sur plusieurs critères <sup>67 68</sup>.

- **La longueur de la chaîne carbonée** toujours constituée d'un nombre pair d'atomes de carbone (le plus souvent de 12 à 22 atomes).

- De 4 à 10 carbones, on parle d'acides gras à courte chaîne
- entre 12 et 14 carbones, d'acides gras à moyenne chaîne
- et au delà de 16 carbones, d'acides gras à longue chaîne.

- **Le nombre d'insaturation (doubles liaisons éthyléniques)** entre deux carbones. Les acides gras (i) ne comportant pas de double liaison sont appelés **acides gras saturés**, (ii) ceux possédant une double liaison sont dits **monoinsaturés** et (iii) ceux ayant plus d'une double liaison sont les acides gras **polyinsaturés (AGPI)**. A l'état naturel, on trouve entre 0 et 6 insaturations. Elles sont distantes de trois atomes de carbones. (**Figure 12**)

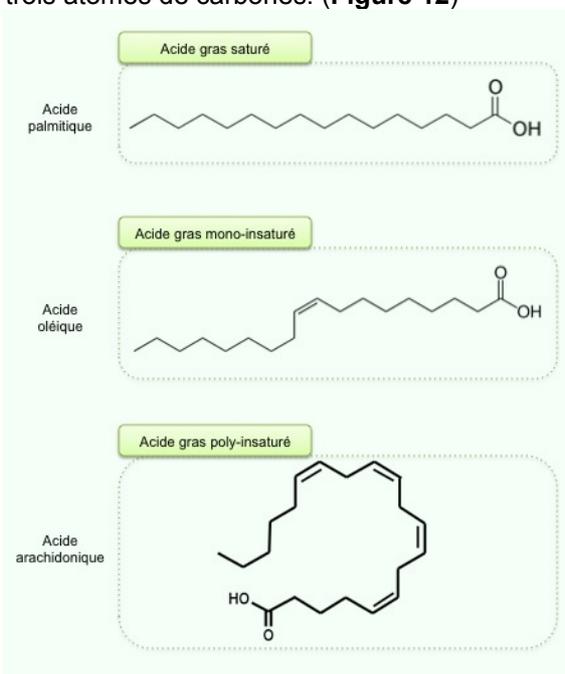


Figure 12 : Exemple d'acide gras saturé, mono-insaturé ou polyinsaturé.

#### - La conformation des doubles liaisons (isomérisation géométrique)

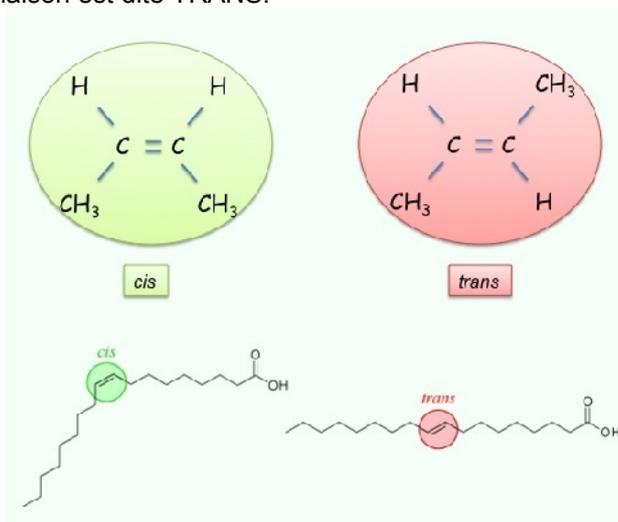
<sup>67</sup> Gunstone FD. Fatty Acid and Lipid Chemistry. Aspen Publishers. 1996. ISBN : 0751402532.

<sup>68</sup> ITERG 2002. Informations générales sur les corps gras.

<http://www.iterg.com/IMG/pdf/infogenecorpsgras.pdf>

La double liaison carbone-carbone -HC = CH- peut adopter 2 configurations dans l'espace, i.e. CIS et TRANS (**Figure 13**) :

- lorsque les hydrogènes H sont du même côté, la liaison est dite CIS.
- lorsqu'ils sont de part et d'autre de la double liaison, la liaison est dite TRANS.



**Figure 13 : Conformation CIS ou TRANS des liaisons.**

L'orientation CIS ou TRANS va modifier la structure tridimensionnelle des acides gras. Une double liaison CIS crée un coude dans la chaîne carbonée, tandis que la double liaison TRANS implique une structure étendue. La majorité des acides gras à l'état naturel sont de configuration CIS alors que les acides gras TRANS sont rares. Ces acides gras TRANS proviennent chez les ruminants d'AGPI hydrogénés par les enzymes des bactéries du rumen. Ils peuvent également être formés lors de processus industriels d'hydrogénation visant à fabriquer les margarines ou certaines huiles destinées à la friture<sup>69</sup>.

**- la position des doubles liaisons (isomérisation de position)**

- A l'état naturel, les acides gras sont dits isoléniques (les doubles liaisons sont séparées par un carbone) :  
$$- C = C - C - C = C -$$
- Si un carbone d'une double liaison est lié à un carbone impliqué dans une autre insaturation, les acides gras sont dits conjugués :  
$$- C = C - C = C -$$

Il existe deux règles de nomenclature : la nomenclature normalisée et la nomenclature dite des "chimistes"<sup>70</sup> (**Figure 14**). La première fait référence au nombre de carbones de la molécule (Cx), au nombre d'insaturations (y) et à la position des doubles liaisons à partir du groupement carboxylique terminal (a), qui représente le carbone n°1.

$$Cx : y \Delta a, b.$$

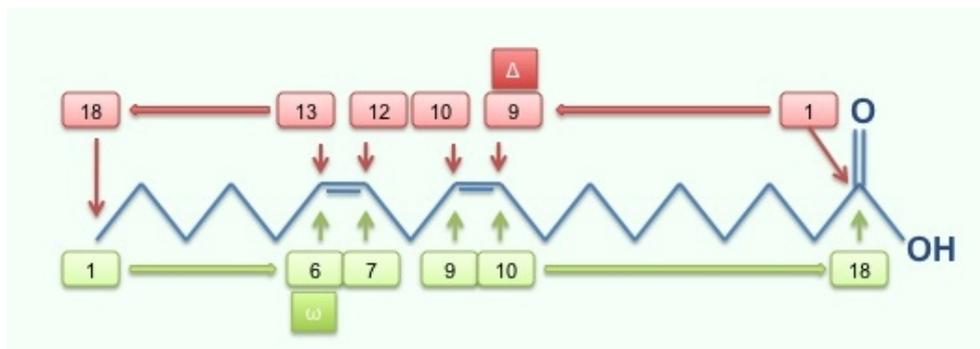
La seconde, dite des « biologistes », de loin la plus utilisée, fait référence au nombre de carbones, au nombre de doubles liaisons et à la position de la première double liaison à partir du groupement méthyle terminal, qui est choisi comme le

<sup>69</sup> Fritsche KL. J Nutr. 1990. PMID : 1979807.

<sup>70</sup> ITERG 2002. Informations générales sur les corps gras.  
<http://www.iterg.com/IMG/pdf/infogenecorpsgras.pdf>

## Introduction

carbone n°1. Elle présente deux possibilités de représentation :  
Cx : y n-c ou Cx : y ω c.



**Figure 14 : Nomenclature de l'acide linoléique**

18 :2n-6: nomenclature des « biologistes » (flèches vertes) : la numérotation commence de l'extrémité méthyle ainsi les doubles liaisons sont entre les atomes de carbone 6 et 7 / 9 et 10.

18:2Δ9, 12 : nomenclature des « chimistes » (flèches rouges) : la numérotation commence à l'extrémité carboxylique ainsi les doubles liaisons sont entre les atomes de carbone 9 et 10 / 12 et 13.

Un nom systématique peut ainsi être attribué aux acides gras. Par exemple, l'acide 9,12-octadécadiénoïque est un acide carboxylique (acide 9,12-octadécadiénoïque) à 18 atomes de carbone (acide 9,12-**octadécadiénoïque**) avec deux insaturations (acide 9,12-octadécadiénoïque) dont la première se situe entre les carbones 9 et 10 (en comptant à partir de la fonction carboxylique). Sa formule simplifiée est donc : C18:2n-6 (nomenclature la plus utilisée) ou C18:2 Δ9,12. Cependant, il est souvent préféré à ce nom systématique un nom commun, choisi afin d'indiquer la provenance de cet acide gras. Ainsi l'acide gras choisi ici comme exemple est appelé acide linoléique en raison de son abondance dans l'huile de lin. La formule simplifiée 18 :2n-6 est aussi couramment utilisée.

La position de la double liaison sur le carbone omega permet de déterminer les classes d'AGPI : les AGPI omega 3 ou n-3, et les AGPI omega 6 ou n-6.

Le **tableau II** rassemble ces 2 types d'appellation pour les principaux acides gras.

**Objectif** des travaux de thèse.

| Classe                         | Nom systématique                        | Nom commun                     | Abbréviation | Formule simplifiée |
|--------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------------|
| Acides Gras Saturés            | Acide hexadécanoïque                    | Acide palmitique               |              | 16:0               |
|                                | Acide octadécanoïque                    | Acide stéarique                |              | 18:0               |
|                                | Acide eicosanoïque                      | Acide arachidique              |              | 20:0               |
|                                | Acide docosanoïque                      | Acide béhénique                |              | 22:0               |
|                                | Acide tétracosanoïque                   | Acide lignocérique             |              | 24:0               |
| Acides Gras Mono-Insaturés     | Acide 9-hexadécénoïque                  | Acide palmitoléique            |              | 16:1 n-7           |
|                                | Acide 9-octadécénoïque                  | Acide oléique                  | OA           | 18:1 n-9           |
|                                | Acide 11-eicosénoïque                   | Acide gadoléique               |              | 20:1 n-9           |
|                                | Acide 13-docosénoïque                   | Acide érucique                 |              | 22:1 n-9           |
|                                | Acide 15-tétracosénoïque                | Acide nervonique               |              | 24:1 n-9           |
| Acides Gras Poly-Insaturés n-6 | Acide 9,12-octadécadiénoïque            | Acide linoléique               | LA           | 18:2 n-6           |
|                                | Acide 6,9,12-octadécatriénoïque         | Acide gamma-linolénique        | GLA          | 18:3 n-6           |
|                                | Acide 8,11,14-eicosatriénoïque          | Acide dihomo-gamma-linolénique | DGLA         | 20:3 n-6           |
|                                | Acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque      | Acide arachidonique            | AA           | 20:4 n-6           |
|                                | Acide 7,10,13,16-docosatétraénoïque     | Acide docosatétraénoïque       |              | 22:4 n-6           |
| Acides Gras Poly-Insaturés n-3 | Acide 4,7,10,13,16-docosapentaénoïque   |                                |              | 22:5 n-6           |
|                                | Acide 9,12,15-octadécatriénoïque        | Acide alpha-linolénique        | ALA          | 18:3 n-3           |
|                                | Acide 11,14,17-eicosatriénoïque         |                                |              | 20:3 n-3           |
|                                | Acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque   | Acide eicosapentaénoïque       | EPA          | 20:5 n-3           |
|                                | Acide 7,10,13,16,19-docosapentaénoïque  | Acide docosapentaénoïque       | DPA          | 22:5 n-3           |
|                                | Acide 4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque | Acide docosahexaénoïque        | DHA          | 22:6 n-3           |

**Tableau II : Nomenclature systématique et commune des principaux acides gras.**

### .B Propriétés physiques

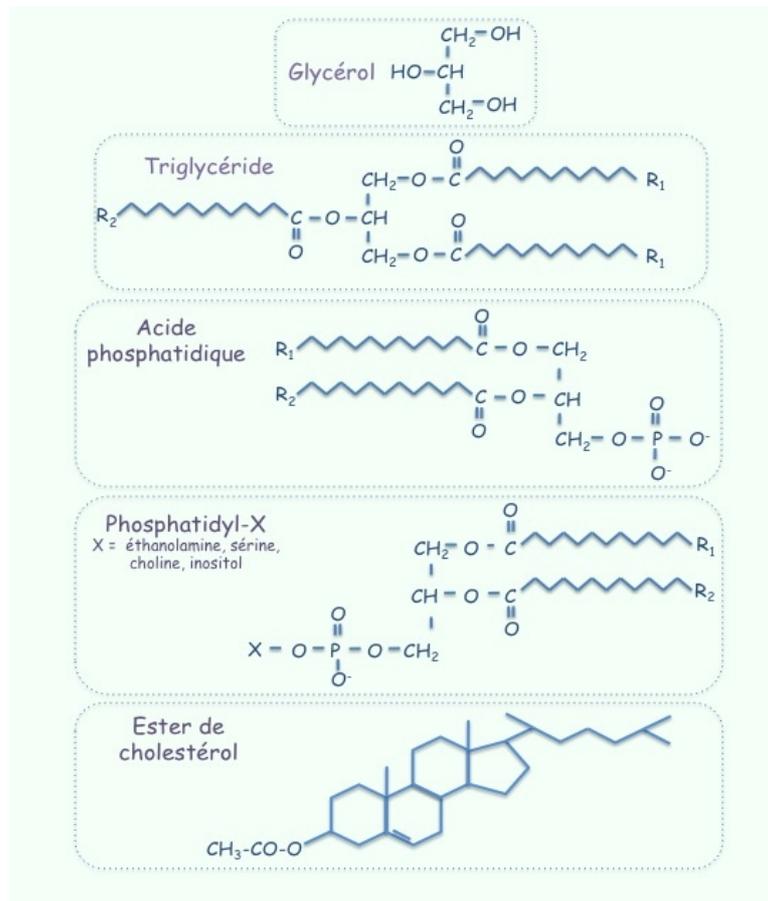
Les acides gras sont des molécules très hydrophobes compte tenu de leurs longues chaînes carbonées. Ils sont par conséquent insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques, tels que l'hexane, l'éther ou le chloroforme. Ainsi, le caractère hydrophobe d'un acide gras croît avec la longueur de la chaîne carbonée. Le point de fusion d'un corps gras est la température à laquelle se produit le passage de l'état solide à l'état liquide. Cette valeur diminue avec le degré d'insaturations et augmente avec la longueur de la chaîne carbonée.

La présence des doubles liaisons confère aussi aux acides gras une grande instabilité. Au niveau de ces doubles liaisons se produisent des réactions chimiques d'addition : fixation d'hydrogène (processus d'hydrogénation naturel ou industriel), d'iode (sert au dosage des acides gras insaturés). Ces doubles liaisons rendent les acides gras particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation enzymatique et non enzymatique.

### .C Sources Alimentaires

Les acides gras sont présents dans l'alimentation essentiellement sous forme de triglycérides (glycérol auquel 3 acides gras sont branchés), puis sous forme de phospholipides (esters d'acides gras et d'acide phosphatidique), et enfin d'esters de cholestérol (esters d'acides gras et de cholestérol) (**Figure 15**).

**Objectif des travaux de thèse.**



**Figure 15 : Structure moléculaire des triglycérides, phospholipides, et cholestérol.**

Les principales sources alimentaires sont indiquées dans la **Figure**

**16** <sup>71</sup> <sup>72</sup> <sup>73</sup>

<sup>71</sup> AFSSA <http://www.afssa.fr/TableCIQUAL/index.htm>

<sup>72</sup> ITERG 2002. Informations générales sur les corps gras. <http://www.iterg.com/IMG/pdf/infogenecorpsgras.pdf>

<sup>73</sup> Gunstone FD. Fatty Acid and Lipid Chemistry. Aspen Publishers. 1996. ISBN : 0751402532.

## Introduction

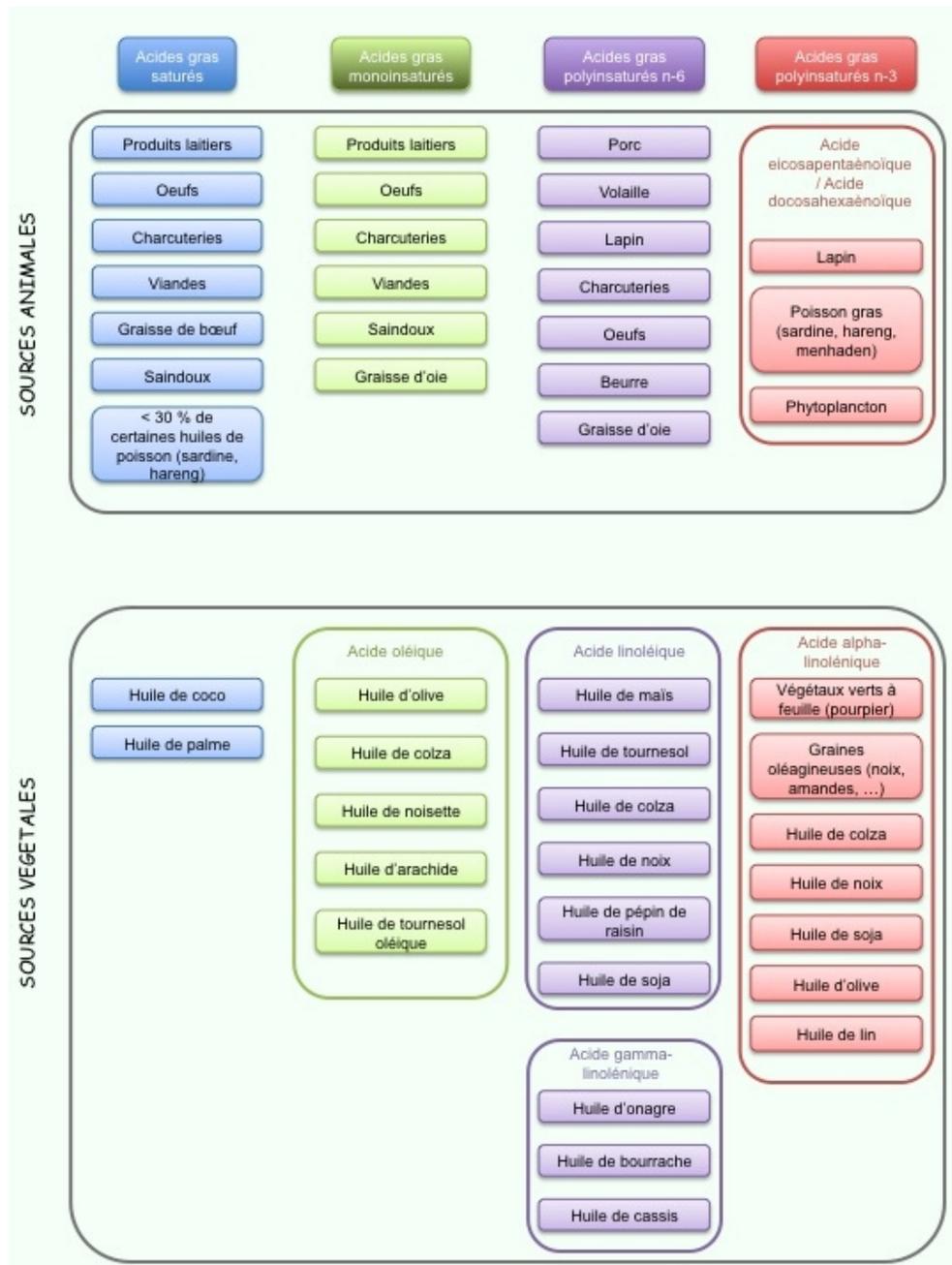


Figure 16 : Principales sources alimentaires des classes d'acides gras.



chaîne a atteint 16 atomes de carbone (acide palmitique). L'élongation et l'insertion des doubles liaisons (désaturation) sont réalisées par d'autres systèmes enzymatiques que FAS.

### .2 L'élongation de la chaîne carbonée

L'élongation de la chaîne carbonée d'un acide gras (**Figure 18**) s'effectue par des élongases à partir des acides gras saturés ou insaturés. Ces enzymes, situées dans la membrane du réticulum endoplasmique, ajoutent deux atomes de carbone supplémentaires à l'extrémité carboxylique. Les acides gras réagissent avec l'acétyl- ou le malonyl-CoA pour produire, après avoir subi le même cycle que lors de la synthèse *de novo*, un acide gras comportant deux atomes de carbone supplémentaires ajoutés à la terminaison carboxylique de la molécule. L'acide palmitique (16C) est ainsi converti en acide stéarique (18C) et en AGS de plus longue chaîne (jusqu'à 30 atomes de carbone). De la même manière, l'acide oléique (18:1 n-9) est converti en acides gras monoinsaturés n-9 à longue chaîne.

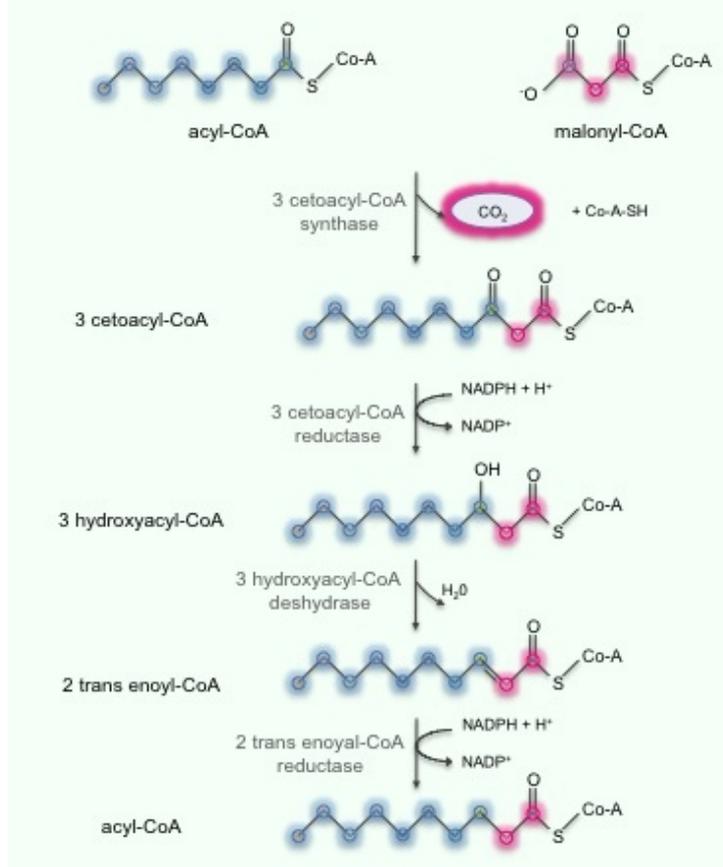


Figure 18 : Élongation microsomale.

### .3 la production des acides gras insaturés par la $\Delta^9$ -, $\Delta^6$ - et la $\Delta^5$ -désaturase

La désaturation des acides gras (**Figure 19**) est sous le contrôle d'enzymes (désaturases) qui ajoutent des doubles liaisons entre les atomes de

## Objectif des travaux de thèse.

carbone 9 et 10 pour la  $\Delta$ -9 désaturase, 6 et 7 pour la  $\Delta$ -6 désaturase et 5 et 6 pour la  $\Delta$ -5 désaturase, à une distance de trois atomes de carbone entre les doubles liaisons. Ces réactions de désaturation, qui ont lieu dans la membrane du réticulum endoplasmique, peuvent se faire sur tous les acides gras saturés ou insaturés.

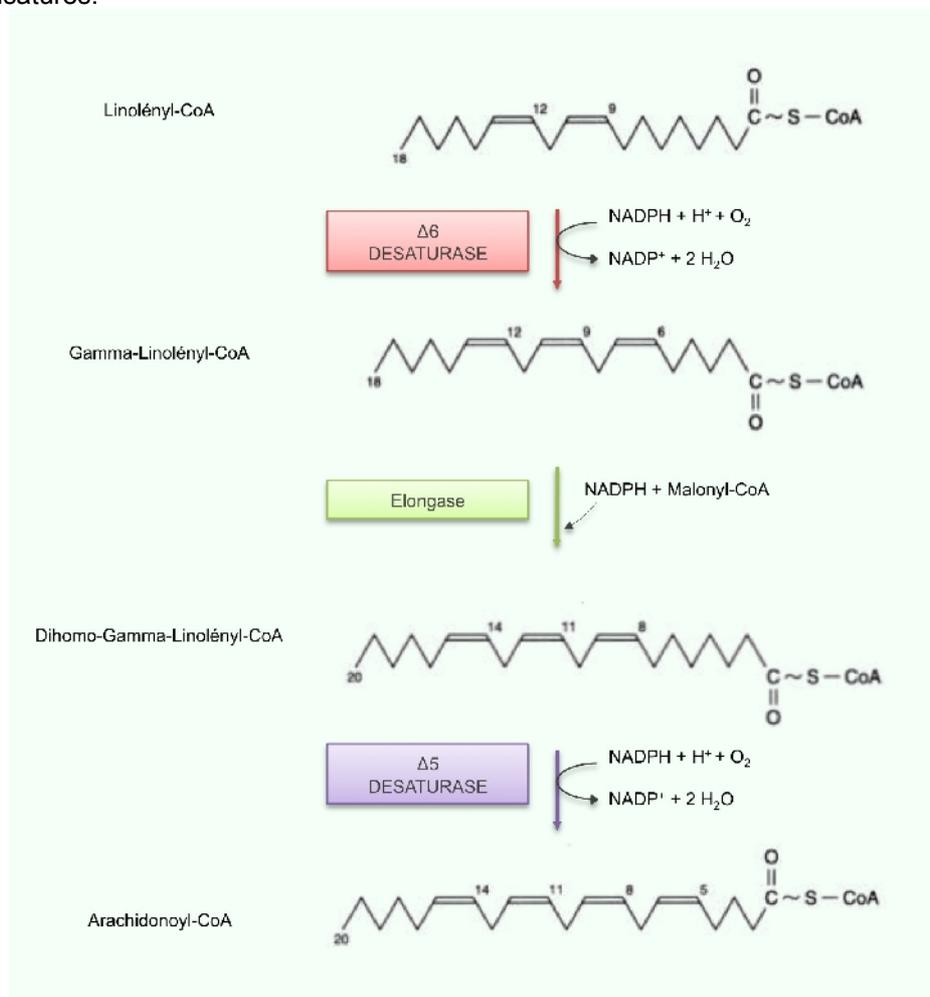


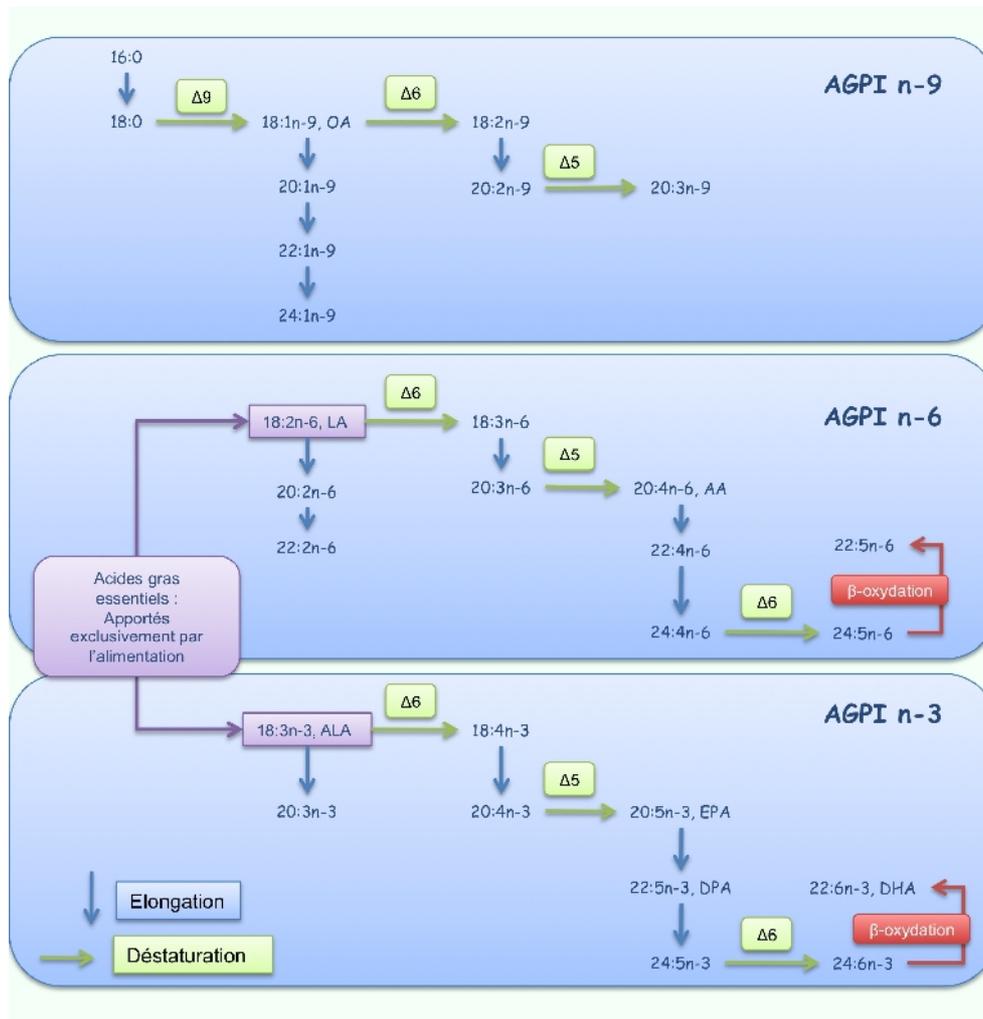
Figure 19 : Production des acides gras insaturés.

Les familles d'acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 et n-3 sont particulières. En effet, la plupart des AGPI de ces deux familles peuvent être synthétisés par les animaux, mais il faut obligatoirement apporter leurs précurseurs (acides linoléique (18:2n-6) et  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3)) par des aliments d'origine végétale. On qualifie donc le 18:2n-6 et le 18:3n-3 d'acides gras essentiels. Les deux AGPI précurseurs indispensables peuvent cependant être synthétisés par notre organisme par des voies métaboliques spécifiques, mais vraisemblablement de façon très limitée et dans des situations nutritionnelles extrêmes. Le mécanisme impliqué serait l'élongation d'AGPI à 16 atomes de carbone présents spécifiquement dans les légumes verts (16:2n-6 et 16:3n-3)<sup>74</sup>.

Une fois dans l'organisme, ces acides gras peuvent être métabolisés par les élongases et les désaturases, comme tous les autres acides gras, pour donner les acides gras plus insaturés et à plus longue chaîne des familles n-6 et n-3 (**Figure 20**).

<sup>74</sup> Cunnane SC. Lipids. 1995. PMID : 7475996.

## Introduction



**Figure 20 : Biosynthèse des acides gras chez les animaux (adaptée de Cook HW. Can J Biochem Cell Biol. 1985. PMID: 4075230. - Brossard N. Am J Clin Nutr. 1996. PMID: 8839503.- Wallis JG. Trends Biochem Sci. 2002. PMID: 12217522.)**

L'acide linoléique (18:2n-6 ou LA) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3 ou ALA) sont des acides gras essentiels, apportés uniquement par l'alimentation. La biosynthèse des autres acides gras est sous le contrôle d'enzymes (désaturases) qui ajoutent des doubles liaisons entre les atomes de carbone 9 et 10 pour la  $\Delta$ -9 désaturase, 6 et 7 pour la  $\Delta$ -6 désaturase et 5 et 6 pour la  $\Delta$ -5 désaturase. Les réactions d'élongation permettent d'allonger la chaîne carbonée de deux atomes de carbone. La  $\beta$ -oxydation a l'effet inverse.

Chez les mammifères, la conversion de l'acide docosapentaénoïque (DPA ; 22:5n-3) en acide docosahexaénoïque (DHA ; 22:6n-3) se fait après (i) élongation en 24:5n-3, (ii)  $\Delta$ 6-désaturation en 24:6n-3, puis (iii)  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes <sup>75</sup>. L'existence d'une  $\Delta$ 4-désaturase, permettant de passer du 22:5n-3 ( $\Delta$ 7,10,13,16,19) au 22:6n-3 ( $\Delta$ 4,7,10,13,16,19) en plaçant une double liaison entre les atomes de carbone 4 et 5, n'a jamais été démontrée chez les mammifères. Enfin, une rétroconversion du DHA en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) a été mise en évidence chez l'animal et chez l'Homme <sup>76</sup>.

## **.E Devenir des acides gras dans l'organisme**

### **.1 Digestion et absorption**

La digestion des lipides alimentaires, contenant triglycérides, phospholipides, cholestérols et vitamines liposolubles, commence dans la cavité buccale sous l'action de la lipase sub-linguale puis dans l'estomac et se termine dans le duodénum <sup>77 78</sup>.

Après ingestion, les lipides alimentaires sont hydrolysés par la lipase linguale qui scinde préférentiellement les AG à chaîne courte. Dans l'estomac, intervient la lipase gastrique, plus spécifique des AG à courte et moyenne chaîne. A l'entrée de l'intestin grêle, 70 % des graisses alimentaires sont encore sous la forme de triglycérides non hydrolysés. La bile et la lipase pancréatique qui se déversent dans le duodénum permettent alors la digestion de la majorité des lipides alimentaires. L'action détergente des sels biliaires permet d'émulsionner les amas lipidiques rendant ainsi les triglycérides accessibles pour hydrolyse par la lipase pancréatique. La structure micellaire permet l'absorption entérocytaire dans l'intestin des nutriments soit par diffusion passive, soit grâce à l'action de transporteurs membranaires. Notons que les acides gras à courte chaîne (relativement polaires) ne sont pas incorporés dans ces micelles, mais absorbés directement à travers la muqueuse intestinale, puis gagnent le foie, par la veine porte, où ils sont métabolisés.

### **.2 Transport et répartition dans les tissus**

Après leur passage dans les entérocytes, les acides gras servent à la resynthèse de triglycérides qui sont incorporés dans les chylomicrons. Ces derniers sont sécrétés dans la lymphe et entrent dans la circulation sanguine au niveau de la veine cave supérieure. Les lipides étant insolubles dans l'eau, la formation de lipoprotéines est nécessaire à leur transport. Ces dernières sont constituées de l'association de lipides apolaires (triglycérides et esters de cholestérol) à des lipides amphiphiles (phospholipides et cholestérol) et à des protéines (appelées apolipoprotéines ou apoprotéines). On identifie trois groupes de lipoprotéines :

- les chylomicrons provenant de la digestion et de l'absorption intestinale des triglycérides,
- les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) qui transportent les triglycérides à partir du foie,

<sup>75</sup> Wallis JG. Trends Biochem Sci. 2002. PMID : 12217522.

<sup>76</sup> Brossard N. Am J Clin Nutr. 1996. 8839503.

<sup>77</sup> Murray R. (2002b). Transport et stockage des lipides. Université DB, editor. Biochimie de HARPER. 25ème Edition ed. Laval: Les presses de l'Université de Laval. ISBN : 2804141187.

<sup>78</sup> Gunstone FD. Fatty Acid and Lipid Chemistry. Aspen Publishers. 1996. ISBN : 0751402532.

## Introduction

---

- les lipoprotéines de basse densité (LDL) qui proviennent du métabolisme des VLDL et qui sont riches en cholestérol,

Leurs triglycérides sont hydrolysés au niveau de la surface des capillaires sanguins par la lipoprotéine lipase (LPL), libérant ainsi des acides gras captés par les tissus sous-jacents. Dans le foie, les acides gras sont utilisés pour synthétiser de nouveau des triglycérides et des phospholipides qui sont incorporés dans les lipoprotéines et acheminés vers les autres organes. Les graisses sont transférées sous forme d'acides gras libres dans le tissu adipeux, où ils sont convertis en triglycérides qui sont libérés après hydrolyse par la lipase hormonosensible (stimulée par l'adrénaline et la noradrénaline, inhibée par l'insuline). Les acides gras libres sont alors liés à l'albumine sérique pour être transportés aux tissus où ils sont utilisés comme source importante de carburant.

Ainsi, dans l'organisme, les acides gras sont stockés majoritairement dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides, où ils représentent une source importante d'énergie, et dans le foie sous forme de lipoprotéines. Cependant, les acides gras sont présents dans tous les tissus puisqu'ils jouent un rôle structural en tant que composants essentiels des membranes biologiques (sous forme de phospholipides, glycolipides ou cholestérol).

## **Acides gras polyinsaturés n-3 et réponse aux traitements anticancéreux dans le cancer du sein**

### **.A Intervention nutritionnelle avec les acides gras polyinsaturés et réponse des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux**

Dans le cancer du sein, la sensibilité des tumeurs aux traitements est imprévisible et différente d'un individu à un autre. Le fait qu'aucun facteur pronostique conventionnel n'ait pu être clairement associé à la sensibilité de ces tumeurs aux traitements anticancéreux suggère que celle-ci n'est pas déterminée uniquement par les propriétés intrinsèques des tumeurs.

Les acides gras des tumeurs proviennent en plus de la synthèse de novo, des lipides apportés par l'alimentation. Ainsi il est possible d'influencer la composition lipidique des tumeurs via l'alimentation <sup>79</sup>. La fraction phospholipidique des cellules tumorales présente un turnover très rapide qui permet de modifier la composition en acide gras des tumeurs par des interventions nutritionnelles en une période de temps assez courte.

#### **.1 Données cliniques**

Des observations suggèrent, de manière indirecte, que les acides gras alimentaires pourraient influencer sur le traitement du cancer du sein. En effet, chez des patientes traitées par chimiothérapie pour un cancer du sein, il a été montré que le risque d'échec du traitement était associé à un apport élevé en acides gras saturés, estimé à l'aide de questionnaires alimentaires <sup>80</sup>. D'autres données proviennent d'études utilisant le tissu adipeux comme biomarqueur de l'apport en AGPI n-3 chez des patientes traitées par chimiothérapie pour un cancer du sein initialement localisé. Ainsi, un faible taux d'acide alpha linoléique (ALA) dans le tissu adipeux mammaire est lié à une augmentation de la survenue de métastases <sup>81</sup>. De même, cette étude montre un taux de DHA plus élevé chez les patientes présentant une réponse complète ou partielle par rapport à celles dont les tumeurs stagnent ou continuent à progresser <sup>82</sup>. Dans une étude de type intervention nutritionnelle, il a été montré qu'un apport par voie orale de 170 mg/jour d'EPA et de 117 mg/jour de DHA augmente significativement la survie de patients atteints de cancer généralisé et traités <sup>83</sup>.

Il existe actuellement peu de données cliniques concernant l'influence potentielle des AGPI sur la réponse des cancers du sein aux différents traitements anticancéreux. Récemment, un autre essai clinique mené par Bougnoux et collaborateurs, impliquant une supplémentation nutritionnelle avec 1.8 g de DHA quotidiennement en parallèle d'un traitement à base d'anthracycline a été réalisé chez 25 patients durant 18 semaines. Cette étude a montré que l'incorporation en

<sup>79</sup> Pardini RS. Chem Biol Interact. 2006. PMID : 16846596.

<sup>80</sup> Holm LE. J Natl Cancer Inst. 1993. PMID : 8416253.

<sup>81</sup> Bougnoux P. Br J Cancer. 1994. PMID : 7914425.

<sup>82</sup> Bougnoux P. Br J Cancer 1999. PMID : 10206290.

<sup>83</sup> Gogos CA. Cancer. 1998. PMID : 9445198.

DHA (mesurée dans les phospholipides du sérum) ne se faisait pas de manière identique chez tous les patients. En séparant les patients selon leur taux d'incorporation en DHA, il a été montré que les patients présentant un fort taux d'incorporation présentaient une médiane de survie (> 42 mois) plus importante que ceux présentant un faible taux (18 mois). Enfin, il a été montré des améliorations au niveau des effets toxiques de la chimiothérapie, avec moins d'anémie, de thrombopénie, et de neutropénie dans le groupe « fort incorporateur ». Cette étude suggère donc qu'une supplémentation suffisante en DHA pourrait réduire les effets toxiques et augmenter l'efficacité du traitement à base d'épirubicine <sup>84</sup>.

## .2 Données expérimentales *in vitro*

*In vitro*, de nombreuses études (**Tableau III**) ont montré que la modification du profil lipidique des cellules tumorales après une exposition aux omega-3 augmente la sensibilité aux agents anticancéreux (doxorubicine, épirubicine, paclitaxel, 5-fluorouracil, mitomycine) de diverses lignées cancéreuses (mammaire, du colon, de neuroblastome, de la vessie et issu de glioblastome). Il se dégage de ces observations que le mécanisme d'action des AGPI n-3 pour augmenter la chimiosensibilité des cellules tumorales doit donc impliquer plusieurs voies.

Parmi les acides gras testés, il a été observé que le DHA est le plus efficace pour augmenter la sensibilité des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 à la doxorubicine <sup>85</sup>.

De plus, des études ont montré une sensibilisation, par certains AGPI, de cellules résistantes (lignée de cellules humaines issus de carcinome pulmonaire à petites cellules résistantes à la doxorubicine, lignée de cellules murines de leucémie résistantes à la doxorubicine P3888/dox, lignée de cellules humaines de cancer ovarien résistantes à la doxorubicine 2780AD) au traitement comme, par exemple, une diminution de la résistance à la doxorubicine par le DHA <sup>86 87</sup> et par l'EPA <sup>88</sup>.

---

<sup>84</sup> Bougnoux P. AACR Meeting Abstracts. 2006 : 1237a.

<sup>85</sup> Germain E. Int J Cancer. 1998. PMID : 9466659.

<sup>86</sup> Zijlstra JG. Int J Cancer. 1987. PMID : 2826341.

<sup>87</sup> Liu QY. Life Sci. 2000. PMID : 10954054.

<sup>88</sup> Plumb JA. Br J Cancer. 1993. PMID : 8385976.

**Objectif** des travaux de thèse.

| Chimiothérapie   | Lignée cellules                   | Supplémentation |                                  | Mécanisme impliqué                        | Référence               |                           |
|------------------|-----------------------------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                  |                                   | AGPI n-3        | concentration $\mu\text{M}$      |                                           | Premier Auteur          | Identifiant PubMed (PMID) |
| Doxorubicine     | MDA-MB-231                        | DHA             | 29 $\mu\text{M}$ - 6 jours       | stress oxydant                            | Germain E - 1998        | 9466659                   |
| Paclitaxel       | MDA-MB-231                        | ALA>EPA>DHA     | 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 24h | stress oxydant                            | Menendez JA - 2001      | 11239764                  |
|                  | MCF-7                             | Seal oil        |                                  | apoptose                                  | Wang Z - 2007           | 17640170                  |
|                  | MDA-MB-231                        |                 |                                  | stress oxydant                            |                         |                           |
| Arsenic trioxide | SK-Br-3 (résistantes à l'arsenic) | DHA             | 25-100 $\mu\text{M}$ - 72h       | stress oxydant                            | Baumgartner M - 2004    | 15382055                  |
|                  | MDA-MB-468                        |                 |                                  | stress oxydant                            |                         |                           |
| Génistéine       | MCF-7                             | EPA             |                                  | apoptose                                  | Nakagawa H - 2000       | 10961387                  |
|                  | MDA-MB-231                        |                 |                                  | arrêt cycle cellulaire en phase G2/M      |                         |                           |
|                  | MDA-MB-231                        | EPA DHA         | 50-100 $\mu\text{M}$ - 24h       | ↓ PGE2<br>↓ invasion<br>↑ PPAR g          | Horia E - 2007          | 17052999                  |
| Tamoxifen        | MCF-7 (résistantes au tamoxifen)  | EPA             | 40 $\mu\text{M}$ - 96 h          | Inhibition de l'activité de la kinase AtK | DeGraffenreid LA - 2003 | 12853346                  |

**Tableau III : Augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux par les AGPI n-3 dans des modèles *in vitro*.**

Tiré de Pardini RS. Chem Biol Interact. 2006. PMID : 16846596.

D'autres études ont montré une augmentation de l'activité du cisplatine sur des cellules résistantes à ce traitement. Cet effet est obtenu par un apport de DHA à des cellules issues de carcinome pulmonaire <sup>89</sup> et par un apport en EPA à des cellules issues de cancer de l'ovaire <sup>90</sup>. Dans ces deux études, l'activité du cisplatine n'a pas été augmentée chez les homologues sensibles à la drogue des deux lignées cellulaires.

Une augmentation de la chimiosensibilité des cellules tumorales mammaires suite à une supplémentation d'AGPI n-3 a été retrouvée avec d'autres molécules anticancéreuses telles que le paclitaxel <sup>91</sup>, l'arsenico trioxide <sup>92</sup>, la génistéine <sup>93</sup> ou le tamoxifen <sup>94</sup>.

Les dernières études expérimentales *in vitro* de chimiosensibilisation avec des AGPI n-3 sur des lignées cancéreuses mammaires ainsi que leurs principaux résultats sont résumés dans le **Tableau III**. Toutes ces observations mettent en évidence l'intérêt de l'étude de ces AGPI dans le but de les utiliser comme adjuvants à la chimiothérapie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

### .3 Données expérimentales *in vivo*

Dans les modèles animaux de différents cancers, l'association « suppléments alimentaires + agents anticancéreux » (doxorubicine, épirubicine, irinotecan, methotrexate) ont comme effet : une diminution de la taille de la tumeur une diminution des effets secondaires et une augmentation de la survie (**Tableau IV**).

---

<sup>89</sup> Timmer-Bosscha H. J Natl Cancer Inst. 1989. PMID : 2544740.

<sup>90</sup> Plumb JA. Br J Cancer. 1993. PMID : 8385976.

<sup>91</sup> Wang Z. Nutr Cancer. 2007. PMID : 17640170.

<sup>92</sup> Vassilatis DK. J Biol Chem. 1992. PMID : 1382055.

<sup>93</sup> Horia E. Carcinogenesis. 2007. PMID : 17052999.

<sup>94</sup> DeGraffenried LA. Ann Oncol. 2003. PMID : 12853346.

**Objectif des travaux de thèse.**

| Chimiothérapie             |                                                                     | Modèle Animal | Modèle de tumeur                           | Régime riche en AGPI n-3 | Résultats                                                                                                                                                                                                                                | Référence          |                           |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Type                       | Dose/Cycle                                                          |               |                                            |                          |                                                                                                                                                                                                                                          | Premier Auteur     | Identifiant PubMed (PMID) |
| Epirubicine                | IP -15 mg/m <sup>2</sup> - Cycle d'une semaine - pendant 6 semaines | Rat           | NMU                                        | DHASCO                   | ↓ vascularisation tumorale                                                                                                                                                                                                               | Colas S - 2006     | 17020996                  |
|                            | IP - 18 mg/m <sup>2</sup> - Cycle d'une semaine pendant 3 semaines  | Rat           | NMU                                        | HUILE DE SARDINE         | Stress oxydant                                                                                                                                                                                                                           | Germain E - 1999   | 10419150                  |
| Doxorubicine               | IV-15 mg/m <sup>2</sup> - Cycle de 4 jours - pendant 5 semaines     | Souris nude   | xénogreffe de cellules MDA-MB-231          | HUILE DE POISSON (       | Stress oxydant (↓ ratio activité GPx / activité SOD, ↑ peroxydation lipidique)                                                                                                                                                           | Hardman WE - 2001  | 11448922                  |
| Mitomycin C                |                                                                     | Souris nude   | xénogreffe de cellules MX-1                | HUILE DE MENHADEN        | Stress oxydant (↑ activité xanthine oxidase tumorale, ↑ peroxydation lipidique, ↑ oxydation des protéines, ↑ activité catalase, ↑ activité superoxyde dismutase, ↑ activité glutathion peroxydase, ↑ activité glutathion S transférase.) | Shao Y - 1995      | 8569432                   |
| Mitomycin C / Doxorubicine |                                                                     | Souris nude   | xénogreffe de cellules MX-1                | HUILE DE MENHADEN        | ↑ activité carnitine acyltransférase                                                                                                                                                                                                     | Borgeson CE - 1998 | 2502698                   |
| cyclophosphamide           | 150 mg/m <sup>2</sup>                                               | Souris nude   | xénogreffe de cellules MX-1                | HUILE DE MENHADEN        | ↑ activité pharmacologique cyclophosphamide (↑ activité CYP2B1)                                                                                                                                                                          | Shao Y - 1997      | 9200152                   |
| CPT-11 (irinotecan)        | IV- 180 mg/m <sup>2</sup> - Cycle de 4 jours - pendant 6 semaines   | Souris nude   | xénogreffe de cellules MCF-7               | HUILE DE POISSON         | ↑ activité antitumorale CPT-11                                                                                                                                                                                                           | Hardman WE - 1999  | 10507768                  |
| Indométhacine              |                                                                     | Souris nude   | xénogreffe de cellules MDA-MB-435, fat pad | HUILE DE MENHADEN        | ↓ fréquence et sévérité des métastases pulmonaires                                                                                                                                                                                       | Connolly JM - 1997 | 9383784                   |
|                            |                                                                     |               |                                            |                          | ↓ niveaux prostaglandines                                                                                                                                                                                                                |                    |                           |

**Tableau IV : Augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux par les AGPI n-3 dans des modèles animaux.** NMU : N-méthyl-nitroso-urée. Tiré de Biondo PD. J Nutr Biochem. 2008. PMID : 18602809 et de Pardini RS. Chem Biol Interact. 2006. PMID : 16846596.

## Introduction

---

Ainsi, la sensibilité à l'épirubicine de tumeurs mammaires chimioinduites par un carcinogène, le N-méthyl nitrosourée, augmente avec une supplémentation du régime alimentaire en DHASCO<sup>95 96</sup>. Dans un autre modèle animal, avec des cellules tumorales mammaires MX-1 ou MDA-MB-231 d'origine humaine greffées chez la souris nude la chimiosensibilité à la doxorubicine est augmentée lorsque l'alimentation de ces animaux est supplémentée en huile de poisson, riche en EPA et en DHA<sup>97</sup>. Cette augmentation de l'effet de la doxorubicine par les AGPI n-3 a également été observée pour d'autres types de cancer, comme le cancer du poumon<sup>98</sup> ou le lymphome<sup>99</sup>. De plus, l'utilisation de DHA combiné à la chimiothérapie, n'augmente pas la toxicité cardiaque induite par l'épirubicine<sup>100</sup>.

Cette amélioration de la réponse aux traitements anticancéreux par les AGPI n-3 a également été observée avec les agents alkylants. En effet, la sensibilité à la mitomycine C de tumeurs mammaires MX-1 greffées est augmentée lorsque l'alimentation de ces animaux est supplémentée en huile de poisson<sup>101</sup>. L'activité de la cyclophosphamide, un autre agent alkylant, est également augmentée par un apport en AGPI n-3, dans le même modèle expérimental que les études précédemment décrites<sup>102</sup>. De plus, dans cette étude, la perte de poids ainsi que les effets secondaires aigus du traitement sont diminués chez les souris recevant l'alimentation enrichie en AGPI n-3 comparativement à celles recevant de l'huile de maïs. Ceci pourrait être dû à une augmentation de l'activité des aldéhydes déshydrogénases hépatiques, résultant en une amélioration de la détoxification des métabolites toxiques de la cyclophosphamide<sup>103</sup>.

L'effet antitumoral de l'irinotécan, un inhibiteur de la topoisomérase I, est également retrouvé augmenté dans un modèle de tumeurs mammaires MCF-7 greffées par un apport alimentaire d'huile de poisson<sup>104</sup>. De plus, les régimes enrichis en huile de poisson diminuent les effets toxiques secondaires de l'irinotécan.

La majorité des études *in vivo* montrent un effet global bénéfique d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la réponse des tumeurs aux chimiothérapies. Les dernières études expérimentales *in vivo* de chimiosensibilisation avec des AGPI n-3 sur des modèles expérimentaux de tumeurs mammaires ainsi que leurs principaux résultats sont résumés dans le **Tableau IV**.

---

<sup>95</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID : 17020996.

<sup>96</sup> Germain E. Lipids. 1999. PMID : 10419150.

<sup>97</sup> Hardman WE. Clin Cancer Res. 2001. PMID : 11448922.

<sup>98</sup> Hardman WE. Cancer Lett. 2000. PMID : 10738108.

<sup>99</sup> Ogilvie GK. Cancer. 2000. PMID : 10760770.

<sup>100</sup> Germain E. Pharmacol Res. 2003. PMID : 12543058.

<sup>101</sup> Shao Y. Lipids. 1995. PMID : 8569432.

<sup>102</sup> Shao Y. Nutr Cancer. 1997. PMID : 9200152.

<sup>103</sup> Shao Y. Nutr Cancer. 1997. PMID : 9200152.

<sup>104</sup> Hardman WE. Br J Cancer. 1999. PMID : 10507768.

## .B Mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité cytotoxique des traitements anticancéreux.

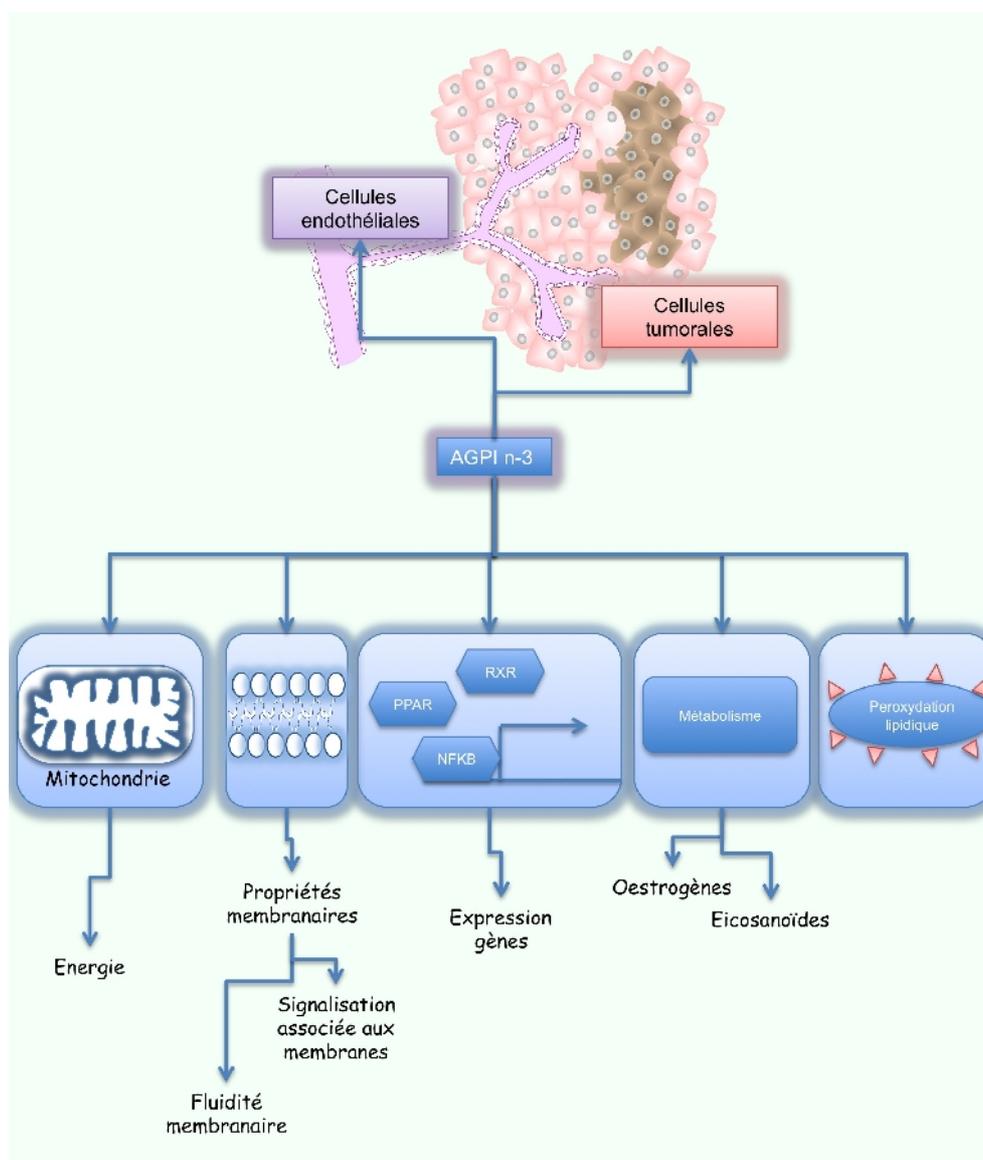


Figure 21 : Mécanismes d'action des AGPI n-3.

L'interprétation des mécanismes impliqués dans les effets sensibilisants aux traitements anticancéreux des AGPI n-3 doit tenir compte des effets propres des AGPI n-3 (Figure 21) indépendamment de leur association aux drogues anticancéreuses. En effet, il a été montré qu'ils pouvaient avoir un effet sur la croissance et sur la viabilité des cellules tumorales, et sur l'angiogenèse tumorale. Les principaux effets des AGPI n-3 sont énumérés dans le Tableau V. Nous développerons ici des effets en rapport avec les travaux de la thèse.

## Introduction

| Voie de signalisation modifiée       | Mode d'action                                                                | Référence                                                                                                                                   | Effet                                                        |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Transcription de gènes (oncogènes)   | ↑ Voie des RXR                                                               | Radominska-Pandya A. 2002. PMID: 11939783.<br>Larsson JC. 2004. PMID: 15159222                                                              | ↓ Angiogenèse (via ↓ de COX2, ↓ molécules proinflammatoires) |
|                                      | ↑ Voie des PPAR (PPAR gamma et delta ont des propriétés anti-inflammatoires) |                                                                                                                                             | ↓ Angiogenèse                                                |
|                                      | ↓ Voie NFκB                                                                  |                                                                                                                                             | ↑ Apoptose                                                   |
| Signalisation Ras                    | modifie la localisation membranaire de Ras<br>↓ de l'expression              | Singh J. 1998. PMID : 9667735<br>Collett ED. 2001. PMID : 11287318.                                                                         | Antitumoral                                                  |
| Signalisation PI3/Akt                | ↓ de l'expression<br>↓ de l'activité                                         | Karmali RA. 1989. PMID : 2510583.                                                                                                           | Antitumoral<br>↓ Angiogenèse                                 |
| Voie protéine kinase C               | ↓ de l'expression                                                            | Collett ED. 2001. PMID : 11287318.                                                                                                          | Antitumoral                                                  |
|                                      | ↓ de l'activité                                                              | Moore NapoG. 2001. PMID : 11561774.                                                                                                         | ↓ Angiogenèse                                                |
| Signalisation Her-2/neu              | ↓ de l'expression                                                            | Menéndez JA. 2005. PMID : 15901996.                                                                                                         | Antitumoral                                                  |
|                                      | ↓ de l'activité                                                              |                                                                                                                                             | ↑ sensibilité tumeurs aux taxanes                            |
| Protéine P53                         | ↑ de l'expression                                                            | Jiang WG. 1998. PMID : 9649932.                                                                                                             | ↑ Apoptose                                                   |
| Cycle cellulaire                     | ↓ du complexe CDK1-cycline B1                                                | Barasou A. 2006. PMID: 16194618.<br>Chiu LC. 2004. PMID : 15289877.<br>Chiu LC. 1999. PMID : 10530765.<br>Schley PD. 2005. PMID : 15986129. | ↑ Apoptose<br>↑ Prolifération cellules tumorales             |
|                                      | ↑ de Bax                                                                     |                                                                                                                                             |                                                              |
|                                      | ↓ de Bcl-2                                                                   |                                                                                                                                             |                                                              |
|                                      | ↑ activité caspases                                                          |                                                                                                                                             |                                                              |
|                                      | ↑ de l'expression P53                                                        |                                                                                                                                             |                                                              |
| Métabolisme des oestrogènes          | ↓ de la production                                                           | Chen J. 2007. PMID : 17720953                                                                                                               | Antitumoral                                                  |
| Monoxyde d'azote                     | ↓ de la production                                                           | Khair-El-Din T. 1996. PMID : 8642266.                                                                                                       | ↓ Angiogenèse                                                |
| VEGF                                 | ↓ de l'expression du récepteur Flk-1                                         | Tsuji. M. 2003. PMID : 12711251.                                                                                                            |                                                              |
|                                      | ↓ de l'expression du VEGF                                                    | Tevar R. 2002. PMID : 12216707.                                                                                                             |                                                              |
| Angiopoétine-2                       | ↓ de l'expression                                                            | Szymczak M. 2008. PMID : 18216296.                                                                                                          |                                                              |
| Métalloprotéase-3 de la matrice      | ↓ de l'expression                                                            | Badawi AF. 1998. PMID : 9635881                                                                                                             |                                                              |
| Stress oxydant                       | ↑ des eicosanoïdes anti-inflammatoires                                       | Colas S. 2006. PMID: 17020996.                                                                                                              | ↓ Angiogenèse                                                |
|                                      | ↑ peroxydation lipidique                                                     | Ding WQ. 2004. PMID : 15367705.                                                                                                             | ↑ sensibilité tumeurs aux chimiothérapies                    |
|                                      | ↓ systèmes antioxydants                                                      |                                                                                                                                             |                                                              |
| Eicosanoïdes                         | ↓ des eicosanoïdes proinflammatoires                                         | Calder PC. 2002. PMID: 12142955.                                                                                                            | ↓ Angiogenèse                                                |
|                                      | ↑ des résolvines et protectines anti-inflammatoires                          | Schwab JM. 2006. PMID: 16750421.                                                                                                            |                                                              |
| Jonctions GAP                        | ↓ de communication cellulaire                                                | Hasler CM. 1991. PMID : 1677533.                                                                                                            | Antitumoral                                                  |
| Fluidité membranaire                 | ↑ du captage des agents anticancéreux                                        | Liu QY. 2000. PMID : 10954054.                                                                                                              | ↑ sensibilité tumeurs aux chimiothérapies                    |
| Métabolisme des agents anticancéreux | ↑ activité cytochromes P450                                                  | Shao Y. 1997. PMID : 9200152.                                                                                                               |                                                              |

Tableau V : Principaux modes d'action des AGPI n-3 expliquant leur action chimiosensibilisante.

### .1 La modification de la fluidité membranaire : modification du captage et de l'efflux des agents anticancéreux.

Les doubles liaisons cis des AGPI introduisent des « coudes » dans les molécules d'acides gras. Ceci augmente l'espace intermoléculaire au sein des

phospholipides membranaires et donc la fluidité membranaire. Il en résulte une altération du transport membranaire et/ou du captage des agents anticancéreux (notamment les agents anticancéreux hydrophobes) <sup>105</sup>.

Les AGPI n-3 augmentent ainsi la perméabilité membranaire des cellules *in vitro* <sup>106</sup> et *in vivo* <sup>107</sup>. Ainsi, plusieurs études ont montré une augmentation de la chimiosensibilité des cellules tumorales par une modification du captage par les AGPI des agents anticancéreux tels que la doxorubicine <sup>108</sup>, le cisplatine <sup>109</sup>, vincristine <sup>110</sup>.

Enfin, le méthotrexate utilise des transporteurs membranaires pour pénétrer dans les cellules. Il a été observé, pour le méthotrexate, que l'augmentation du taux d'insaturations dans les membranes augmente l'affinité du transporteur pour son substrat <sup>111</sup>.

## **.2 Modification du métabolisme des agents anticancéreux**

Les AGPI seraient susceptibles d'augmenter l'efficacité des drogues antitumorales en stimulant l'activité des enzymes impliquées dans l'activation métabolique de ces dernières. Ainsi, il a été rapporté que le taux de trois isoformes du cytochrome P450 est affecté par la quantité et la qualité des apports en acides gras dans la ration alimentaire <sup>112</sup>. Des études *in vivo* ont montré que les AGPI n-3 (supplémentation en huile de poisson et en huile de menhaden), étaient plus efficaces dans cette modulation de l'activité des cytochromes P450 <sup>113 114</sup>.

## **.3 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des AGPI n-3.**

Des études expérimentales ont permis de mettre en évidence une régulation de l'expression de différents oncogènes par les AGPI (soit apportés aux cellules dans le milieu de culture, soit ajoutés dans les régimes alimentaires pour l'expérimentation animale).

### **)a Voie des RXR**

En 2000, l'équipe de Mata de Urquiza a montré que le DHA présente une activité rétinoïdique <sup>115</sup> bien que sa structure chimique soit très éloignée de celle des rétinoïdes habituels. De plus, il a été montré que cette activité passe spécifiquement par les Récepteurs du Rétinoïde X (RXR) <sup>116</sup> (**Figure 22**) formant la seconde sous-famille de récepteurs aux rétinoïdes, la première étant constituée par les Récepteurs de l'Acide Rétinoïque (RAR).

---

<sup>105</sup> Burns CP. Nutr Rev. 1990. PMID : 1365747.

<sup>106</sup> Lund EK. Ann Nutr Metab. 1999. PMID: 10749029.

<sup>107</sup> Hashimoto M. J Lipid Res. 2001. PMID: 11441145.

<sup>108</sup> Liu QY. Life Sci. 2000. PMID : 10954054.

<sup>109</sup> Ikushima S. Anticancer Res. 1991. PMID : 1888152.

<sup>110</sup> Das UN. Prostaglan Leukotrienes Essen Fatty Acids. 1998. PMID : 9482165.

<sup>111</sup> Burns CP. Cancer Res. 1979. PMID : 218733.

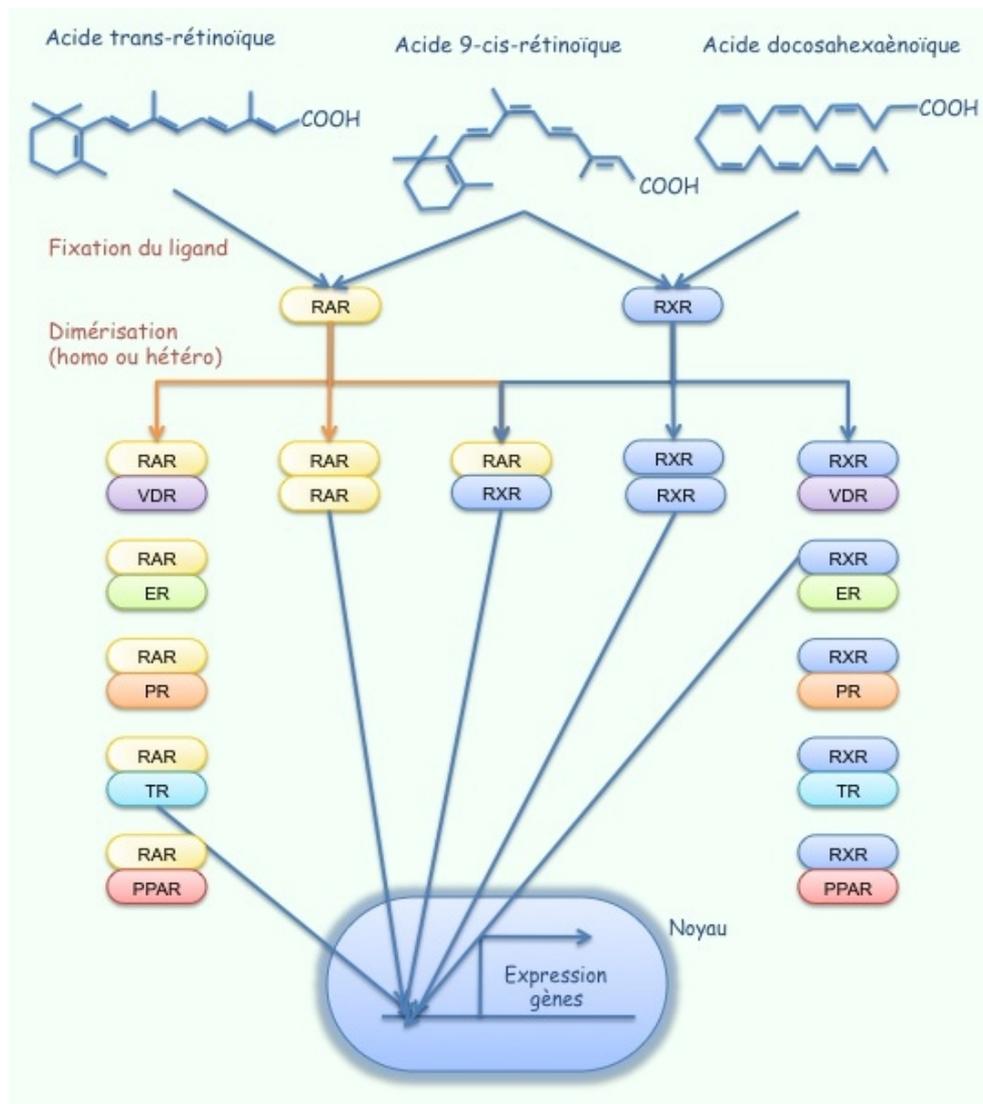
<sup>112</sup> Yang CS. FASEB J. 1992. PMID : 1537464.

<sup>113</sup> Chen HW. Nutr Cancer. 1997. PMID : 9427983.

<sup>114</sup> Chen HW. J Nutr. 2001. PMID: 11340096.

<sup>115</sup> de Urquiza AM. Science. 2000. PMID: 11118147.

<sup>116</sup> Radomska-Pandya A. Biochemistry. 2002. PMID: 11939783.



**Figure 22 : Fixation de l'acide docosahexaénoïque au récepteur des rétinoïdes.**

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque, VDR : récepteur de la vitamine D, PR : récepteur de la progestérone, RXR : récepteur du rétinoïde X, ER : récepteur des oestrogènes, TR : récepteur de l'hormone thyroïdienne, PPAR : Peroxisome Proliferator Activated-Receptor.

Ces deux sous-familles de récepteurs agissent comme facteurs de transcription de différents gènes cibles et jouent des rôles distincts dans la réponse aux rétinoïdes. Le DHA serait un ligand spécifique du RXR alpha murin <sup>117</sup> et RXR bêta humain <sup>118</sup>. Ces récepteurs sont monomériques à l'état inactif et deviennent actifs après dimérisation soit avec une autre monomère de récepteur des rétinoïdes (RAR ou RXR) <sup>119</sup>, soit avec un autre récepteur monomère de la superfamille des récepteurs nucléaires (Peroxisome Proliferator Activated-Receptor (PPAR) <sup>120</sup>, récepteurs de la vitamine D (VDR) <sup>121</sup>, récepteurs des

<sup>117</sup> de Urquiza AM. Science. 2000. PMID: 11118147

<sup>118</sup> Radomska-Pandya A. Biochemistry. 2002. PMID: 11939783

<sup>119</sup> Leid M. Cell. 1992. PMID : 1310259.

<sup>120</sup> Kliewer SA. Nature. 1992. PMID : 1324435.

<sup>121</sup> Bortman P. Braz J Med Biol Res. 2002. PMID : 11743608.

oestrogènes (ER)<sup>122 123</sup>, récepteurs de la progestérone (PR), récepteurs de l'hormone thyroïdienne (TR)<sup>124 125</sup>...). Ils vont alors se fixer en amont des promoteurs des gènes qu'ils induisent. Il en découle de nombreuses réponses différentes possibles selon la nature et les quantités relatives des récepteurs exprimés dans les cellules des différents tissus. En effet, chaque homo- ou hétéro-dimère peut reconnaître un élément de réponse hormonale (ERH)<sup>126</sup> qui lui est spécifique sur l'ADN, s'y fixer et donc réguler un gène particulier.

### **)b Voie des PPAR**

Les acides gras peuvent aussi interagir directement avec les PPAR<sup>127 128</sup>. Activés par la fixation de leurs ligands, les PPAR dimérisés se fixent sur des éléments de réponses spécifiques (PPRE ou « peroxisome proliferator response element ») au niveau du promoteur de leurs gènes cibles<sup>129</sup>. Il existe trois isoformes de PPAR : les PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  qui est équivalent à  $\delta$ , et  $\gamma$ . Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides et ont été récemment associés à la prolifération, la différenciation cellulaire et la réponse inflammatoire<sup>130 131</sup>. Les PPAR $\gamma$  lient préférentiellement les acides gras polyinsaturés tels que le LA, l'ALA, l'AA et l'EPA. Les PPAR $\alpha$  peuvent être activés par différents acides gras (saturés ou insaturés) tels que l'acide palmitique, l'OA, le LA, l'AA et l'EPA. Les acides gras DGLA, EPA, AA, acide palmitique, les prostaglandines PGA1 dérivées du DGLA ont une affinité intermédiaire pour les PPAR $\delta$  par rapport aux PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$ <sup>132 133</sup>. Les PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  possèdent des propriétés anti-inflammatoires<sup>134</sup>.

## **.4 L'inhibition de la signalisation Her-2/neu.**

La voie Her2 est impliquée dans la réponse aux chimiothérapies de 20% des cancers du sein<sup>135</sup>. La surexpression du récepteur Her-2/neu de la famille des récepteurs au facteur de croissance épithélial (EGF) confère la résistance à des chimiothérapies à base de taxanes et l'inhibition de son expression sensibilise les cellules aux taxanes<sup>136 137 138</sup>.

Plusieurs études ont montré qu'une supplémentation du milieu de culture en AGPI n-3 réduit l'expression de ce récepteur<sup>139 140</sup> et cet effet semble associé à une meilleure réponse des cellules tumorales aux taxanes. Cet effet dépend cependant du type cellulaire, puisque dans la lignée tumorale mammaire MCF-7, l'expression

<sup>122</sup> Lee SK. Mol Endocrinol. 1998. PMID : 9717844.

<sup>123</sup> Song MR. Biochem J. 1998. PMID : 9841885.

<sup>124</sup> Bortman P. Braz J Med Biol Res. 2002. PMID : 11743608.

<sup>125</sup> Glass CK. Cell. 1989. PMID : 2555064.

<sup>126</sup> Leid M. Trends Biochem Sci. 1992. PMID: 1333659.

<sup>127</sup> Escher P. Mutat Res. 2000. PMID: 10725467.

<sup>128</sup> Jump DB. Curr Opin Lipidol. 2002. PMID: 11891418.

<sup>129</sup> Kliewer SA. Nature. 1992. PMID: 1324435.

<sup>130</sup> Vamecq J. Lancet. 1999. PMID : 10408502.

<sup>131</sup> Grimaldi PA. Prog Lipid Res. 2001. PMID: 11412892.

<sup>132</sup> Berger J. Annu Rev Med. 2002. PMID: 11818483.

<sup>133</sup> Larsson SC. Am J Clin Nutr. 2004. PMID: 15159222.

<sup>134</sup> Vamecq J. Lancet. 1999. PMID : 10408502.

<sup>135</sup> Menéndez JA. Clin Transl Oncol. 2006. PMID : 17134970.

<sup>136</sup> Ueno NT. Oncogene. 1997. PMID : 9285690.

<sup>137</sup> Yu D. Oncogene. 1998. PMID : 9572489.

<sup>138</sup> Kim R. Oncol Rep. 2002. PMID : 11748447.

<sup>139</sup> Menéndez JA. Eur J Cancer Prev. 2005. PMID : 15901996.

<sup>140</sup> Menéndez JA. Clin Transl Oncol. 2006. PMID : 17134970.

d'Her-2/neu est stimulé par le DHA <sup>141</sup>.

Outre les modifications de l'expression, l'incorporation d'EPA ou de DHA dans des cellules tumorales mammaires *in vitro* est associée à la diminution des niveaux de récepteur à l'EGF dans les rafts et à une augmentation des niveaux de récepteur phosphorylé <sup>142</sup>. La phosphorylation du récepteur de l'EGF est associée à l'induction de l'apoptose.

### .5 L'induction de l'apoptose via la protéine P53

La régulation de la croissance tumorale par certains AGPI peut également être associée à des variations de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et/ou l'apoptose. Ainsi, des études rapportent que la régulation de la croissance cellulaire par les acides gras pourrait être partiellement liée aux taux intracellulaires de la protéine P53. En effet, l'acide linoléique (AGPI n-6) stimule la croissance cellulaire de tumeurs mammaires, un effet associé avec une diminution des taux de la protéine P53. A l'inverse, le DHA augmente l'apoptose, un effet corrélé avec une augmentation des taux de protéine P53 <sup>143</sup>.

### .6 Effets sur la vascularisation

Des études ont mis en évidence l'implication des AGPI dans le processus d'angiogenèse tumorale. Yang et ses collaborateurs en 1998 ont montré *in vitro* un effet inhibiteur des AGPI n-3 sur la croissance et la formation de tubes de cellules endothéliales vasculaires d'origine bovine, suggérant un effet potentiellement inhibiteur des AGPI n-3 sur l'angiogenèse <sup>144 145</sup>. Ces observations ont été confirmées *in vivo* par Rose et Connolly <sup>146</sup> et Tevar <sup>147</sup>, montrant que l'inhibition de la croissance tumorale par les AGPI n-3 s'accompagne d'une diminution de l'angiogenèse tumorale.

Parmi les hypothèses évoquées par des études précédentes, l'altération de l'expression de gènes ou de signaux de transduction impliqués dans le processus d'angiogenèse semble être un des modes d'action des AGPI n-3 (via les RXR notamment).

D'autres études montrent que les AGPI n-3, dont le DHA, inhibent la production de monoxyde d'azote (°NO) <sup>148 149</sup>, qui est un promoteur de l'angiogenèse <sup>150</sup>. Des études ont rapporté que le DHA et l'EPA diminuent la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF en inhibant l'expression des récepteurs Flk-1 <sup>151 152</sup>. Cependant, une autre étude montre que l'inhibition de la croissance tumorale induite par l'EPA est due à une altération de l'expression du VEGF lui-même et non pas de ces récepteurs <sup>153</sup>. Enfin, une étude a montré que l'expression de l'angiopoiétine-2, de la métalloprotéase-9 de la matrice était stimulée par les AGPI n-6 et diminuée par les AGPI n-3 <sup>154</sup>. Cet effet des AGPI n-3

<sup>141</sup> Park HJ. *Circ Res*. 2002. PMID : 12142347.

<sup>142</sup> Schley PD. *J Nutr*. 2007. PMID : 17311938.

<sup>143</sup> Jiang WG. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1998. PMID : 9649932.

<sup>144</sup> Yang SP. *J Cell Physiol*. 1998. PMID : 9648921.

<sup>145</sup> Tsuji. M. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003. PMID : 12711251.

<sup>146</sup> Rose DP. *Int J Oncol*. 1999. PMID: 10536186.

<sup>147</sup> Tevar R. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2002. PMID: 12216707.

<sup>148</sup> Khair-EI-Din T. *J Exp Med*. 1996. PMID : 8642266.

<sup>149</sup> Jeyarajah DR. *J Surg Res*. 1999. PMID: 10329109.

<sup>150</sup> Murohara T. *Circulation*. 1998. PMID : 9443437.

<sup>151</sup> Yang SP. *J Cell Physiol*. 1998. PMID : 9648921.

<sup>152</sup> Tsuji. M. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003. PMID : 12711251.

<sup>153</sup> Tevar R. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2002. PMID : 12216707.

<sup>154</sup> Badawi AF. *Carcinogenesis*. 1998. PMID : 9635881.

est lié à la synthèse de prostaglandines de la série 3 préférentiellement, tels que la prostaglandine E3 qui supprime l'induction de l'angiopoïétine 2 par les facteurs de croissance <sup>155</sup>.

Les AGPI n-3 pourraient exercer leur activité antiangiogénique via l'activation de facteurs de transcription, la modification du métabolisme des eicosanoïdes ou le stress oxydant <sup>156</sup>.

## **.7 Effets sur la production d'eicosanoïdes**

Les eicosanoïdes (**Figure 23**) sont des médiateurs dérivant d'acides gras, qui regroupent les prostaglandines (PG), les prostacyclines (PGI), les thromboxanes (TX), les leucotriènes (LT). Les eicosanoïdes présentent des activités biologiques très diverses. En effet, ils jouent un rôle dans les réponses inflammatoires et immunitaires, dans l'agrégation plaquettaire, ainsi que dans la croissance et la différenciation cellulaire.

Il existe deux familles d'eicosanoïdes : les eicosanoïdes dérivés des AGPI de la série n-6, issus de l'acide arachidonique (AA) et de l'acide dihomog-linolénique (DGLA) ; et les eicosanoïdes dérivés des AGPI de la série n-3, issus de l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Ces composés à vingt atomes de carbone (eicosa signifiant vingt), ont une durée de vie courte et présentent un comportement pouvant être comparé à celui des hormones <sup>157</sup>. Les eicosanoïdes sont classés par famille, selon le nombre de doubles liaisons qu'ils possèdent. Dans la nomenclature les lettres représentent les substituants fixés au cycle pentanique. Les chaînes alpha et bêta désignent les isomères

---

<sup>155</sup> Szymczak M. Blood. 2008. PMID : 18216296.

<sup>156</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.

<sup>157</sup> Larsson JC. Am J Clin Nutr. 2004. PMID : 15159222.

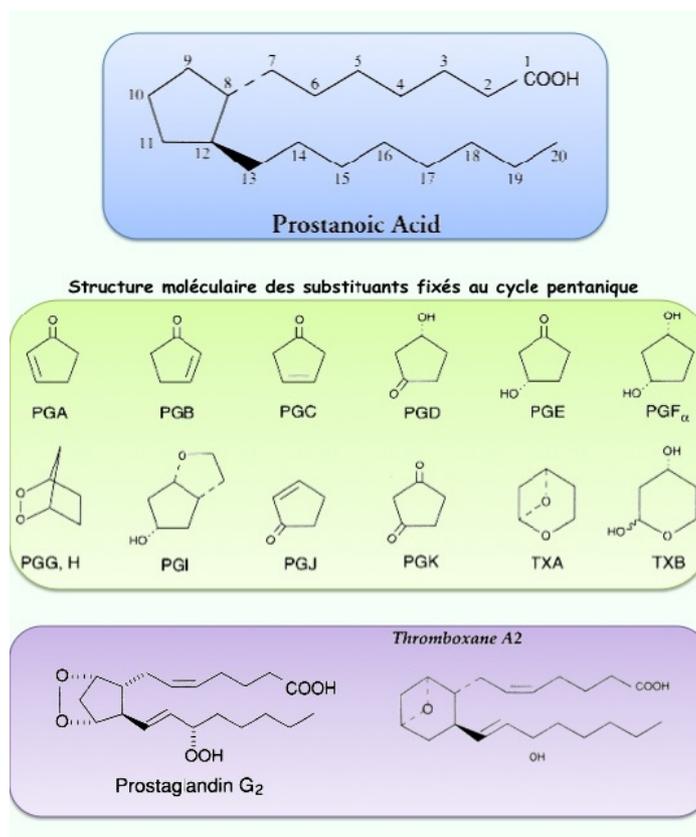


Figure 23 : Structure moléculaire des eicosanoïdes.

### ***)a Biosynthèse des eicosanoïdes***

La biosynthèse des eicosanoïdes comporte deux phases : la libération par la phospholipase A2 de l'acide arachidonique ou eicosapentaénoïque et sa transformation en produits actifs. Trois classes d'enzymes sont à l'origine de la formation de différents eicosanoïdes <sup>158 159</sup> :

- les cyclooxygénases (COX), qui catalysent la biosynthèse des prostanoïdes : prostaglandine, prostacycline et thromboxanes. L'oxydation par les COX enlève deux doubles liaisons C = C. Il existe deux formes de COX : la COX-1 qui est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus et génère les PG dans des conditions physiologiques, et la COX-2 qui est induite rapidement en réponse à une variété de stimuli, incluant des facteurs mitogènes, des cytokines et des hormones. La COX-2 semble jouer également un rôle important dans la carcinogenèse. Elle n'est pas détectée dans le tissu mammaire ou intestinal normal, elle est retrouvée exprimée dans la majorité des cancers du sein <sup>160</sup> et du colon <sup>161</sup>.
- les lipoxygénases (LOX), qui catalysent la biosynthèse des acides gras hydroxylés, des leucotriènes (LT) et des lipoxines. Les LOX jouent un rôle essentiel dans les mécanismes inflammatoires et immunitaires. L'oxydation par les LOX n'enlève pas de double liaison C = C.

<sup>158</sup> Calder PC. Eur J Clin Nutr. 2002. PMID: 12142955.

<sup>159</sup> Larsson JC. Am J Clin Nutr. 2004. PMID : 15159222.

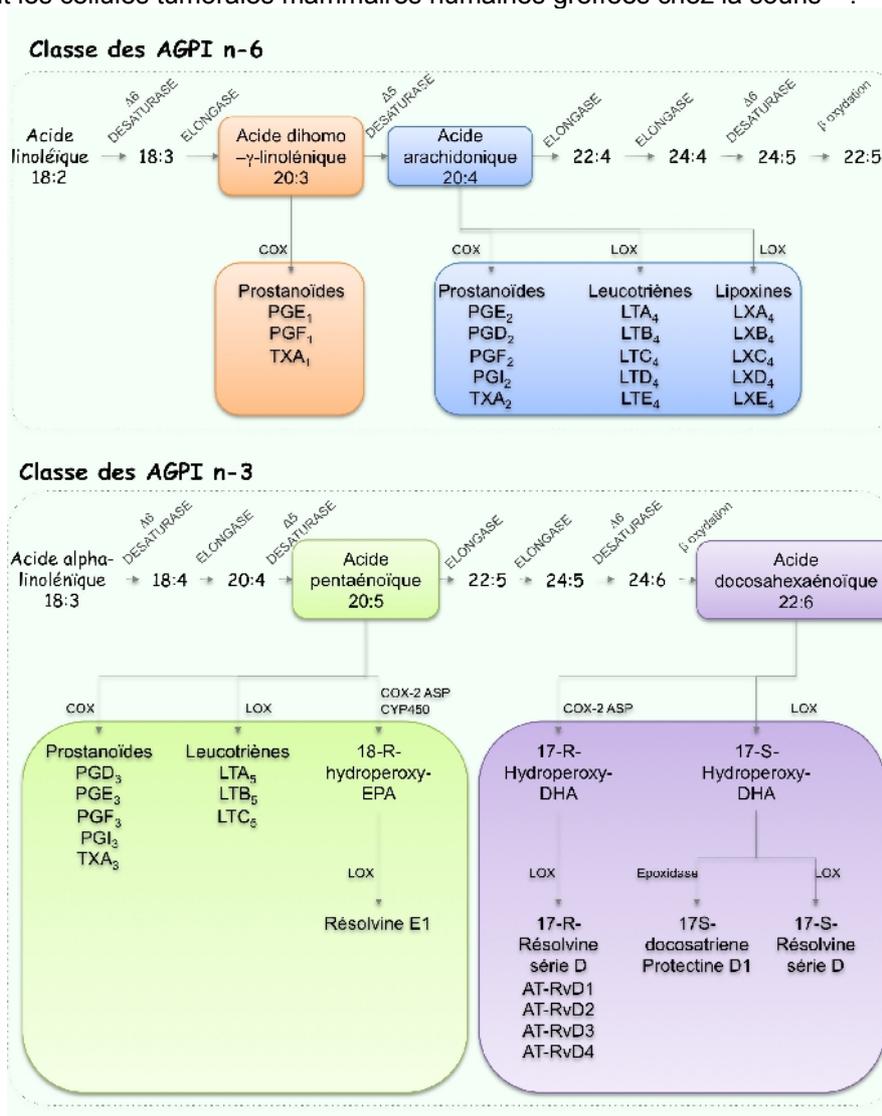
<sup>160</sup> Half E. Cancer Res. 2002. PMID : 11912139.

<sup>161</sup> Eberhart CE. Gastroenterology. 1994. PMID : 7926468.

## Objectif des travaux de thèse.

- les cytochromes P450 mono-oxygénases, qui génèrent des acides gras hydroxylés, di-hydroxylés ou époxydés <sup>162</sup>.

Ces enzymes semblent jouer un rôle dans la carcinogenèse mammaire puisque des études utilisant des inhibiteurs de LOX et de COX *in vitro* ou *in vivo* ont montré une diminution de la prolifération des cellules tumorales mammaires <sup>163</sup>. A l'inverse, une augmentation de l'expression de COX-2 et/ou 12-LOX a été associée à une inhibition de l'apoptose dans de nombreux types cellulaires <sup>164 165</sup>, dont les cellules tumorales mammaires humaines greffées chez la souris <sup>166</sup>.



**Figure 24 : Les métabolites dérivés des acides gras.**

PG : prostaglandine – PGI : prostacycline – TX : thromboxane – LT : leucotriènes – LX : lipoxine – COX : cyclooxygénase – LOX : lipoxygénase. Les chiffres en indice indiquent le nombre total de doubles liaisons dans la molécule et la série à laquelle le composé appartient. Voie de synthèse des nouveaux eicosanoïdes : COX-2 ASP : cyclooxygénase 2 acétylée par l'aspirine – CYP450 : cytochrome P450.

<sup>162</sup> Kroetz DL. Curr Opin Lipidol. 2002. PMID : 12045397.

<sup>163</sup> Rose DP. 1999. PMID : 10576293.

<sup>164</sup> Tsujii M. Cell. 1995. PMID : 8521479.

<sup>165</sup> Tang DG. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. PMID : 8643560.

<sup>166</sup> Connolly JM. Cancer Lett. 1998. PMID : 10397460.

### ***)b Effets des eicosanoïdes issus de l'acide arachidonique***

Les eicosanoïdes dérivés de l'AA (**Figure 24**), tels que la PGE<sub>2</sub>, le TXA<sub>4</sub> et l'acide hydroxy-eicosatétraénoïque (12-HETE), ont été associés à la carcinogenèse mammaire <sup>167</sup>, à l'angiogenèse <sup>168</sup> et sont retrouvés en quantité plus importante dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains <sup>169</sup>.

### ***)c Effets des eicosanoïdes issus des AGPI de la série n-3***

De nombreuses études mettent en évidence une diminution des eicosanoïdes dérivés de l'AA lors d'une supplémentation en AGPI n-3 <sup>170</sup>. Les eicosanoïdes dérivés de l'AA présentent, en général, une activité proinflammatoire tandis que les eicosanoïdes dérivés de l'EPA (**Figure 24**) présentent des effets anti-inflammatoires <sup>171</sup>. Il est donc possible que les AGPI n-3 exercent leur propriété anti-angiogénique en diminuant la synthèse de ces composés <sup>172</sup>.

Les études *in vitro* et *in vivo* montrent que les AGPI n-3 entrent en compétition avec la voie proinflammatoire de l'acide arachidonique à plusieurs niveaux. Tout d'abord, un apport élevé d'AGPI n-3 résulte en leur incorporation dans les phospholipides membranaires, où ils remplacent partiellement l'AA, diminuant ainsi la disponibilité de ce dernier <sup>173</sup>. Cette substitution est à l'origine de la suppression de la biosynthèse des eicosanoïdes dérivés de l'AA en faveur des eicosanoïdes dérivés de l'EPA. Les enzymes élongases et désaturases ayant une plus grande affinité pour les AGPI n-3, un apport élevé de ces derniers réduit la désaturation et l'élongation de LA en AA, et par conséquent, la production des eicosanoïdes qui en résulte <sup>174</sup>.

De plus l'EPA inhibe le relargage d'AA des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 <sup>175</sup>.

Les AGPI n-3 inhibent l'expression de la COX-2 <sup>176 177 178</sup> et entrent en compétition avec les AGPI n-6 pour la production d'eicosanoïdes catalysée par les COX <sup>179 180</sup>. Comparé à l'AA, l'EPA est un substrat préférentiel des LOX et des COX <sup>181</sup>. Enfin, la formation des eicosanoïdes dérivés de l'AA n'est pas seulement diminuée par les AGPI n-3 mais également par les eicosanoïdes qui en dérivent <sup>182</sup>.

Les eicosanoïdes proinflammatoires étant impliqués dans l'angiogenèse dans le cancer du colon <sup>183</sup>, la diminution de l'inflammation par un ratio n-3/n-6 plus important privilégie un environnement moins favorable à l'angiogenèse. De plus la diminution par l'EPA ou le DHA de la COX-2 aboutirait à la diminution de

<sup>167</sup> Rose DP. 1999. PMID : 10576293.

<sup>168</sup> Rose. 1999. PMID : 10576293.

<sup>169</sup> Chulada PC. Cancer Res. 2000. PMID : 10987272.

<sup>170</sup> Rose DP. Nutr Cancer. 2000. PMID: 11142082.

<sup>171</sup> Calder PC. Eur J Clin Nutr. 2002. PMID: 12142955.

<sup>172</sup> Rose DP. Nutr Cancer. 2000. PMID: 11142082.

<sup>173</sup> Crawford M. Ann Nutr Metab. 2000. PMID : 11146334.

<sup>174</sup> Rose DP. Pharmacol Ther. 1999. PMID : 10576293.

<sup>175</sup> Su KP. Eur Neuropsychopharmacol. 2003. PMID: 12888186.

<sup>176</sup> Singh J. Cancer Res. 1997. PMID : 9270014.

<sup>177</sup> Hamid R. Int J Oncol. 1999. PMID : .10024686

<sup>178</sup> Ringbom T. J Nat Prod. 2001. PMID : 11421736.

<sup>179</sup> Marshall LA. Lipids. 1982. PMID : 6298554.

<sup>180</sup> Corey EJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983. PMID : 6304720.

<sup>181</sup> Grimm H. Br J Nutr. 2002. PMID : 11895155.

<sup>182</sup> Tsunomori M. Biochim Biophys Acta. 1996. PMID : 8679681.

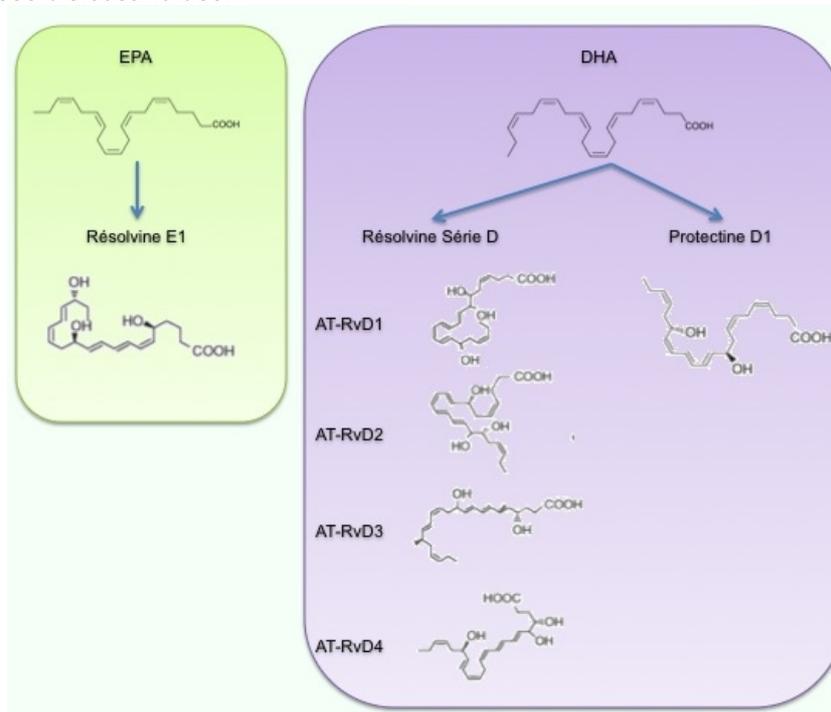
<sup>183</sup> Calviello G, Serini S, Piccioni E. Curr Med Chem. 2007. PMID: 18220742

l'expression de facteurs proangiogéniques inductibles par la COX-2 tels que le VEGF<sup>184</sup>.

*Tous ces effets des AGPI n-3 mis en commun concourent à la réduction des eicosanoïdes dérivés de l'AA qui sont associés à la carcinogénèse et à l'angiogénèse.*

### **)d Les « nouveaux » eicosanoïdes**

Il a été découvert récemment par l'équipe de Serhan<sup>185</sup>, de nouveaux médiateurs de nature lipidique issus de l'oxygénation enzymatique par les COX, les LOX, et les cytochromes P450 de deux AGPI n-3 : le DHA et l'EPA (**Figure 24**). Ce sont les résolvines E, issues de l'EPA et les résolvines D et protectines issus du DHA (**Figure 25**). Ces résolvines exercent une action de réduction de l'inflammation d'où leur nom anglais de resolvins<sup>186</sup>. Les métabolites issus du DHA portent également le nom de docosatriènes (docosa = 22 atomes de carbone). La biosynthèse des résolvines et des protectines est résumée dans la **Figure 25** et fait intervenir les mêmes enzymes LOX, cytochromes P450 et COX que pour la synthèse d'eicosanoïdes.



**Figure 25 : Structure moléculaire des résolvines et protectines issues de l'EPA et du DHA.**

Elles présentent des propriétés anti-inflammatoires, régulatrices du système immunitaire, et neuroprotectrices. Elles agissent en fin de processus inflammatoire. En effet l'inflammation comporte trois phases<sup>187</sup> (**Figure 26**):

- **initiation** : les neutrophiles des vaisseaux sanguins périphériques relarguent des médiateurs dérivés de l'acide arachidonique (classe AGPI n-6) : les eicosanoïdes cités précédemment, qui sont pour la plupart pro-

<sup>184</sup> Calviello G. Carcinogenesis. 2004. PMID: 15358633

<sup>185</sup> Schwab JM. Curr Opin Pharmacol. 2006. PMID: 16750421.

<sup>186</sup> Bazan NG. Cell Mol Neurobiol. 2006. PMID: 16897369.

<sup>187</sup> Schwab JM. Curr Opin Pharmacol. 2006. PMID: 16750421.

## Introduction

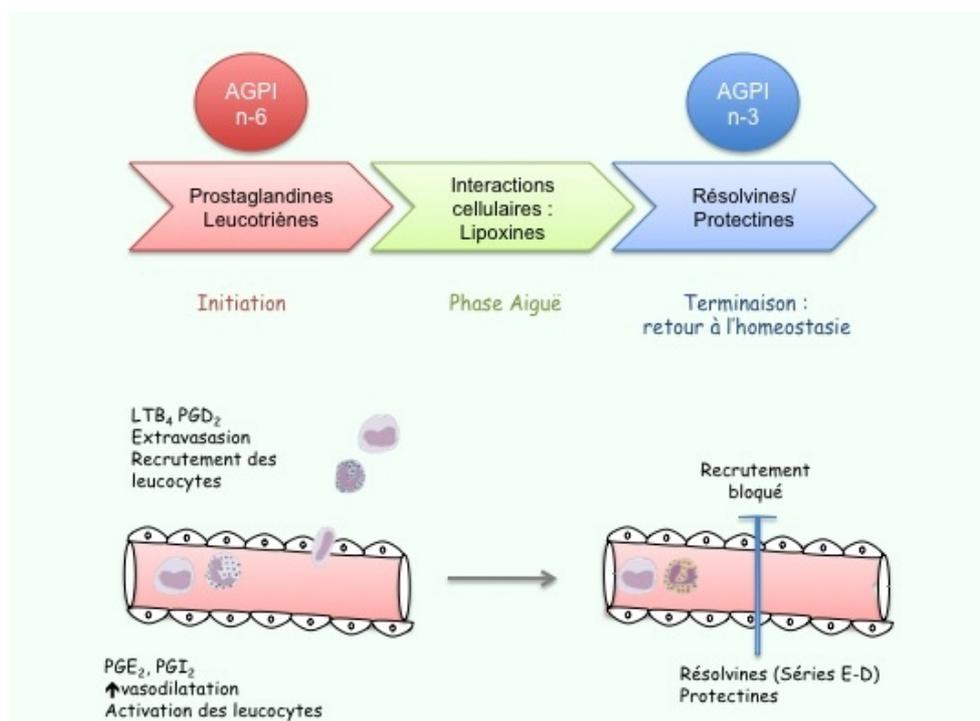
inflammatoires. Ces médiateurs lipidiques contrôlent l'extravasation des cellules de l'inflammation jusqu'au site de l'inflammation.

- **phase aiguë** : les interactions intercellulaires, (leucocytes – plaquettes par exemple) augmentent la synthèse de lipoxines.
- **réduction de l'inflammation** : en plus des médiateurs pro-inflammatoires, les leucocytes, peuvent excréter des médiateurs lipidiques protecteurs dérivés des AGPI n-3 qui limitent l'activation de l'inflammation et la réduisent en bloquant l'infiltration leucocytaire responsable de l'inflammation.

Le switch dans la production des eicosanoïdes pro-inflammatoires vers la production des métabolites anti-inflammatoires est un processus actif qui souligne la capacité des leucocytes à programmer une réponse limitée dans le temps <sup>188</sup>.

Ces molécules sont libérées pour protéger les cellules de l'inflammation induites dans des cas de stress, ou par exemple libérées par le rein lors de dysfonctionnements rénaux. La neuroprotectine D1 (protectine D1 synthétisée dans le cerveau), est formée dans les cellules pigmentaires de la rétine en cas de stress oxydant, dans le cerveau en cas de choc, dans les cellules neuronales en culture <sup>189</sup>.

Il est à noter que ces molécules sont très actives à des concentrations de l'ordre du picomolaire <sup>190</sup>.



**Figure 26 : Rôle des résolvines dans l'inflammation.**

Tiré de Schwab JM. Curr Opin Pharmacol. 2006. PMID: 16750421.

Une étude a montré un effet antiangiogénique dans la rétine des AGPI n-3 via la production de ces nouveaux eicosanoïdes <sup>191</sup>. En revanche, à ce jour, il n'y a

<sup>188</sup> Levy BD. Nat Immunol. 2001. PMID : 11429545.

<sup>189</sup> Bazan NG, Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007. PMID : 17285000.

<sup>190</sup> Hong S. J Biol Chem. 2003. PMID: 12590139.

<sup>191</sup> Connor KM. Nat Med. 2007. PMID : 17589522.

pas à notre connaissance d'études portant sur l'importance de ces nouveaux médiateurs lipidiques dans les effets antitumoraux des AGPI n-3.

## .8 Augmentation du stress oxydant

### )a Augmentation de la peroxydation lipidique.

Il existe deux voies d'oxydation des lipides : l'une procède par voie enzymatique et conduit à la formation des eicosanoïdes, l'autre est directe, initiée par les espèces activées de l'oxygène, et conduit à la formation de molécules instables. Les insaturations, nombreuses dans les AGPI à longue chaîne, les rendent très sensibles à l'oxydation par les espèces réactives de l'oxygènes (ERO)<sup>192</sup>. La peroxydation lipidique est l'attaque des AGPI à longue chaîne par les ERO, et est une réaction radicalaire générant des produits hautement délétères pour les cellules tels que les malondialdéhydes (cf le chapitre sur les acteurs du statut oxydant cellulaire).

Dans le cadre d'une thérapie générant des ERO<sup>193</sup> telles que la plupart des anthracyclines (doxorubicine, épirubicine, idarubicine), les camptothécines (topotécan et irinotécan), les sels de platines et leurs dérivés (cisplatine, carboplatine), ainsi que certains agents alkylants, la supplémentation en AGPI des cellules tumorales pourraient augmenter les cibles des ERO. Si les cellules tumorales n'ont pas les défenses antioxydantes suffisantes pour lutter contre cette génération d'ERO, les effets délétères de la peroxydation lipidique sur les cellules tumorales pourraient donc les sensibiliser aux traitements anticancéreux (**Figure 27**).

Plusieurs études confirment cette hypothèse. Ainsi, l'effet chimiosensibilisant des AGPI n-3 est augmenté par la présence de pro-oxydants et diminué par la présence d'anti-oxydants, phénomène observé aussi bien *in vitro*<sup>194</sup><sup>195</sup>, que *in vivo*<sup>196</sup><sup>197</sup><sup>198</sup>. La sensibilité à la mitomycine C de cellules tumorales greffées chez la souris athymique recevant une supplémentation en AGPI n-3, est positivement associée au taux de malondialdéhyde dosé dans les fragments tumoraux<sup>199</sup>. En revanche, le taux de malondialdéhyde reste stable dans le tissu hépatique quel que soit le régime alimentaire<sup>200</sup>.

Enfin, l'augmentation de la chimiosensibilité à la doxorubicine dans les tumeurs mammaires associée à une augmentation de la peroxydation lipidique se fait de manière concomitante à une diminution du ratio de l'activité GPx/SOD qui serait un indicateur de stress oxydant<sup>201</sup>.

---

<sup>192</sup> Cosgrove JP. Lipids. 1987. PMID : 3600206.

<sup>193</sup> Vile GF. Cancer Chemoth Pharmacol. 1989. PMID : 2543512.

<sup>194</sup> Petersen ES. Cancer Res. 1992. PMID : 1423272.

<sup>195</sup> Germain E. Int J Cancer. 1998. PMID : 9466659.

<sup>196</sup> Hardman WE. Br J Cancer. 1997. PMID : 9252202.

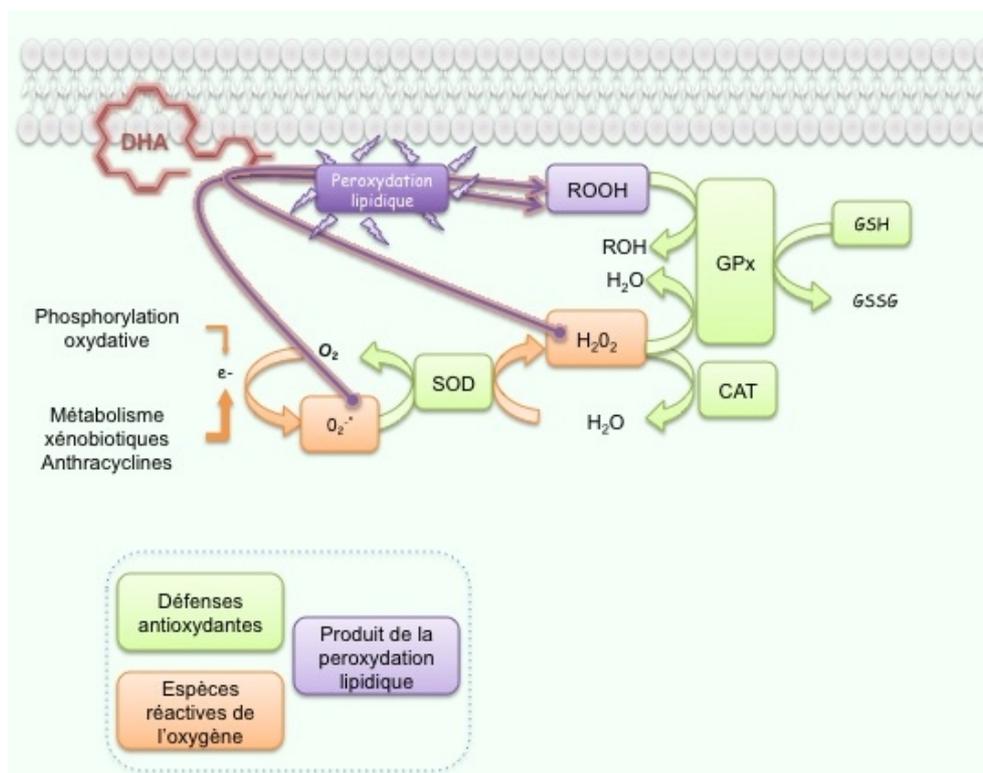
<sup>197</sup> Germain E. Lipids. 1999. PMID : 10419150.

<sup>198</sup> Colas S. Nutr Cancer. 2005. PMID : 15860440.

<sup>199</sup> Shao Y. Lipids. 1995. PMID : 8569432.

<sup>200</sup> Shao Y. Cancer Res. 1994. PMID : 7987842.

<sup>201</sup> Hardman WE. Cancer Cell Internat. 2002. PMID : 12296973.



**Figure 27 : Hypothèse sur le mode d'action du DHA sur le statut oxydant cellulaire.**

GPx : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit / GSSG : glutathion oxydé, CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase.

### ***)b Inhibition des défenses antioxydantes.***

L'équipe de Ding et al, a montré que le DHA est capable d'exercer des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales en inhibant l'expression des enzymes antioxydantes SOD<sup>202</sup> et GPx-4<sup>203</sup> (voir le chapitre dédié aux acteurs du statut oxydant cellulaire). De plus, lorsqu'ils invalident l'expression de ces enzymes par knock-out, ils observent une augmentation de la cytotoxicité du DHA via notamment une augmentation de la peroxydation lipidique. Schonberg a montré également que l'effet cytotoxique des AGPI n-3 sur les cellules tumorales pulmonaires est liée à une activité GPx faible<sup>204</sup>. Cet effet a aussi été retrouvé *in vivo*, sur un modèle murin de xélogreffe de cellules tumorales mammaires<sup>205</sup>. En revanche cet effet du DHA dépend de la lignée cellulaire et de la concentration en DHA. En effet, l'équipe de Lagarde et collaborateurs ont montré que la GPx est diminué pour de faibles doses de DHA dans des cellules endothéliales bovines issues de la rétine alors qu'elle est augmentée dans les cellules endothéliales bovines issues de l'aorte<sup>206</sup>. De plus la régulation de cette enzyme par les AGPI n-3 est complexe puisqu'une étude a montré que dans les HUVEC, le DHA augmente l'expression en ARNm et protéique de la GPx 4, alors que son activité est diminuée<sup>207</sup>. La régulation des autres enzymes antioxydantes par les AGPI n-3

<sup>202</sup> Ding WQ. Mol Canc Ther. 2004. PMID : 15367705.

<sup>203</sup> Ding WQ. Mol Canc Ther. 2007. PMID : 17431126.

<sup>204</sup> Schönberg SA. Carcinogenesis. 1997. PMID : 9363997.

<sup>205</sup> Hardman WE. Cancer Cell Int. 2002. PMID : 12296973.

<sup>206</sup> Delton-Vandenbroucke I. Free Radic Biol Med. 2001. PMID : 11295532.

<sup>207</sup> Sneddon AA. Atherosclerosis. 2003. PMID : 14642406.

## **Objectif des travaux de thèse.**

---

dépend elle aussi de la lignée considérée puisque des études ont aussi montré une augmentation de l'activité de la SOD <sup>208</sup> ou de la CAT <sup>209</sup> par les AGPI n-3.

*Pour cette thèse nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux mécanismes expliquant l'augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux, à savoir le stress oxydant et la vascularisation.*

---

<sup>208</sup> Leonardi F. Free Radic Res. 2007. PMID : 17577735.

<sup>209</sup> Venkatraman JT. J Am Coll Nutr. 1998. PMID : 9853538.



## Les acteurs du statut oxydant cellulaire

L'équilibre « redox » intracellulaire ou potentiel redox est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion s'apparente à la notion de pH intracellulaire associée aux couples acido-basiques.

Il existe donc au sein de la cellule des espèces moléculaires oxydantes qui pour gagner un électron attaquent les molécules cellulaires (réaction d'oxydation). L'oxygène, les espèces oxydantes issues de l'oxygène (ERO) et les espèces radicalaires (qui peuvent aussi être des ERO) sont fortement susceptibles d'attaquer les molécules cellulaires, et si leur production est trop importante, les effets sont délétères pour les cellules. Des molécules anti-oxydantes (glutathion, vitamine E...) peuvent jouer le rôle de tampon redox (à l'instar d'un tampon acido-basique) en réduisant ces ERO ou les espèces radicalaires. De plus les cellules sont dotées de défenses enzymatiques anti-oxydantes capables de lutter contre ces ERO. C'est la balance entre la production d'ERO et les défenses anti-oxydantes qui définit le statut oxydant cellulaire. En cas de déséquilibre, lors d'une surproduction d'ERO ou d'une défaillance des défenses anti-oxydantes, la cellule se trouve alors dans un état de stress oxydant.

### .A Les espèces réactives de l'oxygène et les espèces radicalaires

#### .1 Nature

Un atome possède sur sa couche externe un nombre d'électrons définis. Lorsque cet atome perd ou gagne un électron sur sa couche externe il se trouve sous forme ionique. Les électrons de la couche externe sont tous appariés ce qui confère une stabilité à ces atomes.

Les radicaux sont obtenus par rupture homolytique de liaisons chimiques (**Figure 28**). Ce sont des atomes (ou groupes d'atomes) qui possèdent sur leur couche externe un électron non apparié célibataire, ce qui leur confère des propriétés très instables car ils vont réagir avec d'autres molécules pour arracher un électron (réaction d'oxydation). Cet électron non apparié se note par un point. Les radicaux peuvent être neutres ou chargés positivement ou négativement (radical hydroxyle, HO<sup>•</sup>).

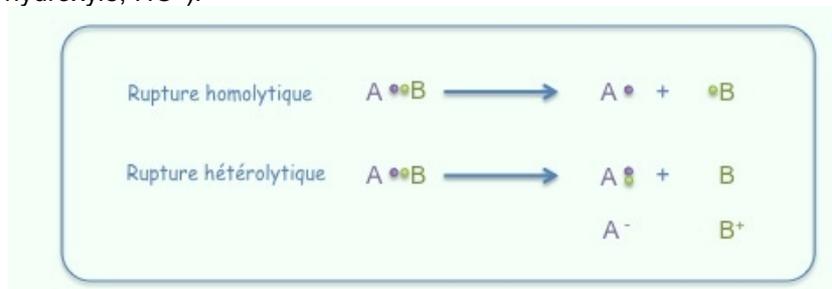
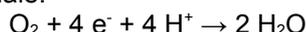


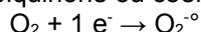
Figure 28 : Production d'espèces ioniques et radicalaires.

### .2 L'anion superoxyde et ERO qui découlent de sa production

Dans les cellules la majeure partie de l'oxygène subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale.



Toutefois cette chaîne de transport des électrons peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement (**Figure 29**). C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction mono-électronique (addition d'un seul électron,) conduisant à la formation du radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) au niveau de l'ubiquinone ou coenzyme Q <sup>210 211</sup>.

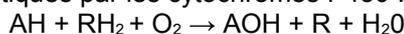


Ce phénomène de fuite des électrons intervient parce que les deux enzymes qui assurent l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en énergie (électrons et protons), les complexes I et II, présentent un potentiel d'activité conjoint supérieur à celui de réutilisation des électrons : la cytochrome oxydase (complexe IV). La production de radicaux libres au niveau de la chaîne respiratoire augmente avec l'activité de celle-ci après augmentation de l'apport de nutriments énergétiques <sup>212</sup> ou après un apport accru d'oxygène <sup>213</sup>.

De même la NADPH-deshydrogénase située dans la membrane interne des mitochondries, ou la NADPH oxydase des cellules endothéliales <sup>214</sup> peut conduire à la formation de radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de la détoxification des xénobiotiques par les cytochromes P450 :



où AH est le substrat et  $\text{RH}_2$  l'agent réducteur.

D'autres composés tels que le glycéraldéhyde, les thiols (sur la cystéine), le  $\text{FMNH}_2$ , le  $\text{FADH}_2$ , sont susceptibles de s'oxyder facilement en présence d'oxygène en transférant simultanément un électron sur la molécule de dioxygène, aboutissant à la formation de l'anion superoxyde <sup>215</sup>.

L'anion superoxyde est peu réactif par lui-même, mais sa toxicité est due au fait qu'il est à l'origine de la formation d'autres ERO (**Figure 30**). Les ERO peuvent être classées selon deux groupes :

- les espèces radicalaires : le radical hydroxyle ( $\text{HO}^{\cdot}$ ), le radical hydroperoxyde ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), le radical peroxyde ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ ), le radical alcoxyde ( $\text{RO}^{\cdot}$ )
- les espèces non radicalaires : le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ), l'ozone ( $\text{O}_3$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ , état excité de la molécule), peroxydinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ).

<sup>210</sup> Cadenas E. Free Radic. Biol. Med. 2000. PMID: 11035250.

<sup>211</sup> Dawson TL. Am J Physiol. 1993. PMID : 8386454.

<sup>212</sup> Boveris A. Biochem J. 1973. PMID : 4749271.

<sup>213</sup> Cadenas E. Arch Biochem Biophys. 1977. PMID : 195520.

<sup>214</sup> Griending KK. Circ Res. 2000. PMID : 10720409.

<sup>215</sup> Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Delattre J. Radicaux libres et anti-oxydants. Tiré de « Biochimie Pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires ». 2003. Ed.Flammarion Médecine-Sciences pages : 59 :81. ISBN : 2-257-10946-5.

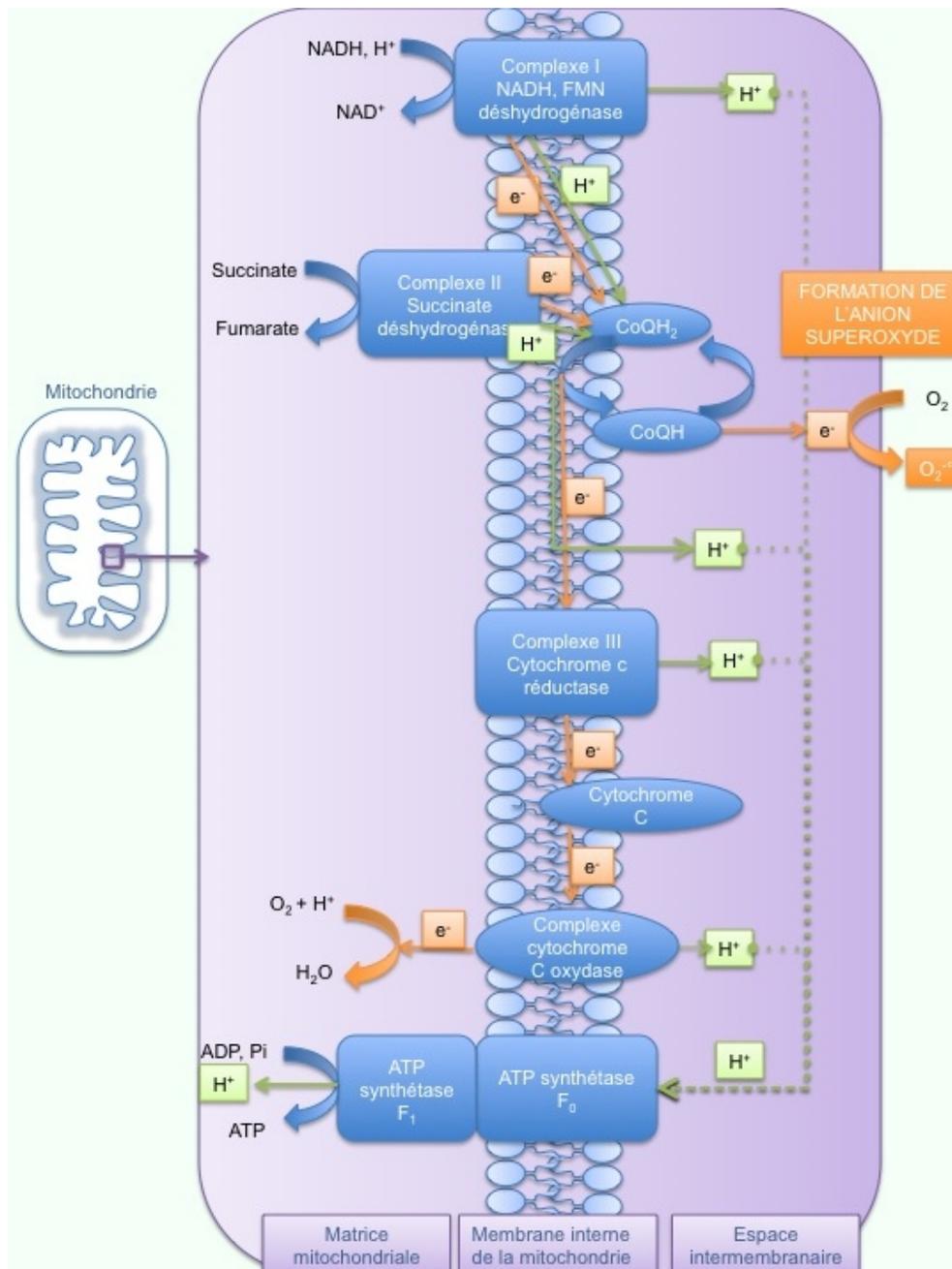


Figure 29 : Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale.  
Tiré de Arousseau B. INRA Prod Anim. 2002. 15(1), 67-82.

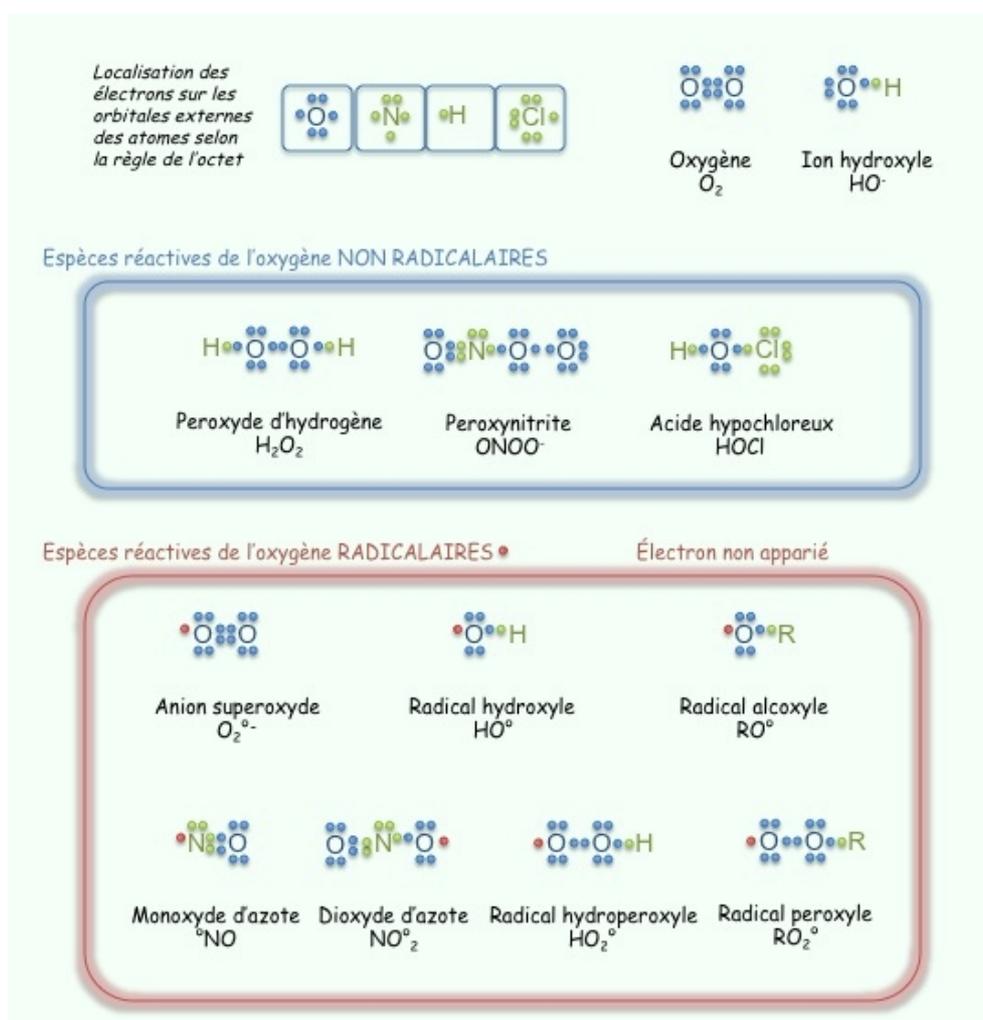


Figure 30 : Etat des orbitales atomiques externes des espèces réactives de l'oxygène selon la règle de l'octet.

Ces espèces activées de l'oxygène de part leur structure électronique instable peuvent attaquer les composants cellulaires, tels que les acides gras polyinsaturés comme le DHA. En effet, le DHA possède 6 doubles liaisons, ce qui le rend hautement peroxydable. La peroxydation lipidique est particulièrement redoutable pour la cellule en raison du mécanisme « explosif » de la propagation radicalaire et de la formation, à partir des AGPI, de produits hautement toxiques tels le 4 hydroxynonéal (4-HNE), le malondialdéhyde (MDA), le 4 hydroxyhexenal (4-HHE)<sup>216</sup> (cf paragraphe sur l'oxydation des lipides). De plus, les ERO peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes pour les espèces non chargées, et ainsi attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou pour atteindre d'autres cellules<sup>217</sup>.

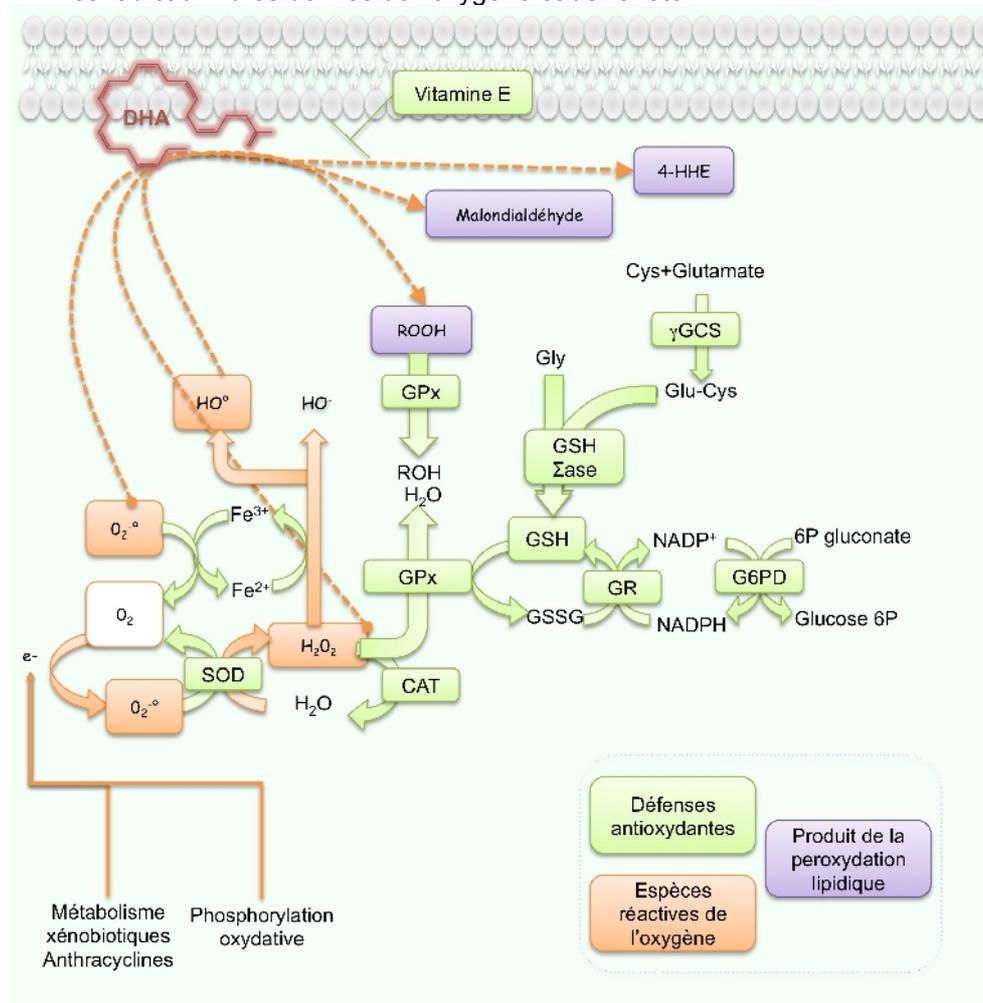
<sup>216</sup> Esterbauer H. Free Radic Biol Med. 1991. PMID: 1937131.

<sup>217</sup> Boveris A. Biochem J. 1972. PMID: 4404507.

## .B Production d'ERO et détoxification par les systèmes anti-oxydants

Les systèmes de défense anti-oxydants comportent (**Figure 31**):

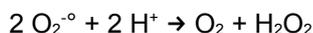
- des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la peroxydase, capables d'éliminer de façon catalytique des radicaux libres et d'autres espèces réactives
- des protéines (transferrine, haptoglobine, albumine) qui diminuent la disponibilité des pro-oxydants tels que les ions  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ;  $Cu^{2+}/Cu^+$
- des protéines, comme les protéines de choc thermique protégeant les biomolécules contre les agressions, notamment les oxydations
- des composés de faible masse moléculaire (glutathion, alpha-tocophérol ou vitamine E, acide ascorbique, bilirubine, acide urique) capables de piéger les radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote.



**Figure 31 : Equilibre des couples redox intracellulaires.**

Les espèces réactives de l'oxygène sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ). Les enzymes anti-oxydantes sont : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx). Les enzymes de synthèse ou de régénération du glutathion sont la gamma glutamyl cystéine synthétase ( $\gamma$ GCS), la glutathion synthétase (GSH Synthase), la glutathion réductase (GR), et la glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD). Les produits de peroxydation lipidique sont les hydroperoxydes lipidiques (ROOH), le malondialdéhyde, le 4-hydroxyhexenal (4HHE).

**Les superoxyde dismutases** assurent l'élimination par dismutation de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, ceci selon la réaction suivante :



Elles constituent ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. Ces enzymes sont ubiquitaires nécessitent pour fonctionner correctement des oligo-éléments comme :

- *le cuivre et le zinc*

- ★ pour la Cu/Zn-SOD ou SOD 1 présente dans le cytosol, le noyau et les lysosomes des cellules<sup>218 219 220 221</sup>. C'est une enzyme de 32 kDa<sup>222</sup>, constituée par deux sous-unités protéiques, chacune portant un atome de cuivre et un atome de zinc.

- ★ pour la EC-SOD ou SOD 3 extracellulaire dans la lymphe, dans le plasma, dans le liquide d'ascite, et dans les fluides cérébrospinaux<sup>223 224</sup>. C'est une glycoprotéine tétramérique de 135 kDa qui présente une forte affinité pour l'héparine<sup>225</sup>. Chaque sous-unité protéique porte un atome de cuivre et de zinc. Elle existe sous plusieurs formes (A, B et C), B et C se liant à l'héparine.

Les ions cuivre sont nécessaires à l'activité SOD, tandis que les ions zinc (qui n'ont qu'un seul état de valence possible) ne participent pas au cycle catalytique, mais stabilisent la structure de l'enzyme (**Figure 32**). Le cuivre est lié au site actif par interaction avec les atomes d'azote des noyaux imidazole des quatre histidines (His 44, 46, 61, 118) et le zinc est lié au cuivre par interaction avec le noyau imidazole de l'histidine 61 ainsi que His 69, His 78 et Asp 81. L'histidine 61 interagit donc avec les deux métaux et fournirait les protons nécessaires à la réaction de dismutation. L'activité de la Cu/Zn-SOD est inhibée par le cyanure et par le diéthylthiocarbamate (qui lie le cuivre et le retire du site actif) (à l'inverse de la Mn-SOD ce qui permet une détermination différentielle de ces activités).

---

<sup>218</sup> Chang LY. J Cell Biol. 1988. PMID : 3058718.

<sup>219</sup> Keller GA. Proc Natl Acad Sci USA. 1991. PMID : 1651504.

<sup>220</sup> Crapo JD. Proc Natl Acad Sci USA. 1992. PMID : 1332049.

<sup>221</sup> Liou W. Free Radic Biol Med. 1993. PMID : 8425722.

<sup>222</sup> Zelko IN. Free Radic Biol Med. 2002. PMID: 12126755.

<sup>223</sup> Marklund SL. Holme E. Clin Chim Acta. 1982. PMID : 7172448.

<sup>224</sup> Marklund SL. Bjelle A. Ann Rheum Dis. 1986. PMID : 3789819.

<sup>225</sup> Marklund SL. Proc Natl Acad Sci USA. 1982. PMID : 6961438.

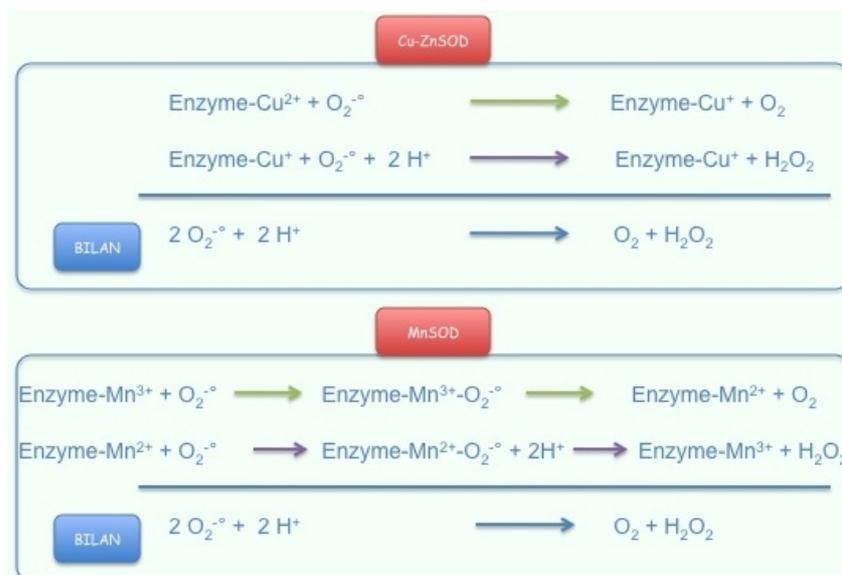


Figure 32 : Dégradation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase cytosolique (Cu/Zn-SOD) ou mitochondriale (Mn-SOD).

- le manganèse pour la Mn-SOD ou SOD 2 présente dans la mitochondrie. C'est une enzyme tétramérique de 92 kDa. Il a été montré que son activité est diminuée dans les cellules tumorales<sup>226</sup>. Cette perte de l'activité SOD2 pourrait être responsable du phénotype malin. De plus, elle pourrait jouer un rôle dans la sensibilité aux agents anticancéreux générant des ERO. La transfection de plasmide SOD2 supprime le phénotype tumoral de cellules de mélanome<sup>227</sup>.

La dismutation de l'anion superoxyde par les superoxyde dismutases produit du peroxyde d'hydrogène, une autre ERO. La bêta oxydation est aussi connue pour produire du peroxyde d'hydrogène<sup>228</sup>.

**Le peroxyde d'hydrogène** peut se comporter aussi bien en oxydant qu'en réducteur lors de sa dismutation (**Figure 33**). Cette réaction de dismutation est lente.

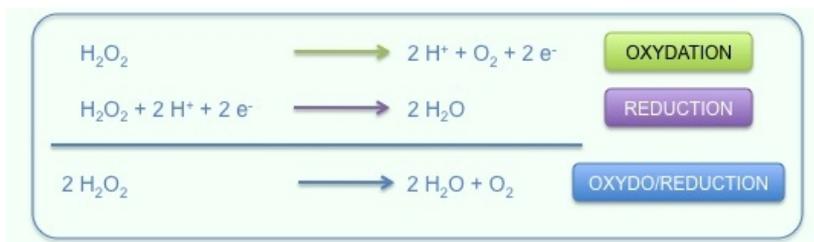


Figure 33 : Dismutation du peroxyde d'hydrogène.

En présence d'ions métalliques tel que le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), le peroxyde d'hydrogène formé peut aboutir par réduction, à la formation du radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) hautement toxique pour les cellules (réaction de Fenton/Haber-Weiss, **Figure 34**).

<sup>226</sup> Oberley LW. J Theor. Biol. 1984. PMID : 6717035.

<sup>227</sup> Church SL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993. PMID ; 8464931.

<sup>228</sup> Osumi T. Biochem Biophys Res Commun. 1978. PMID : 697834.

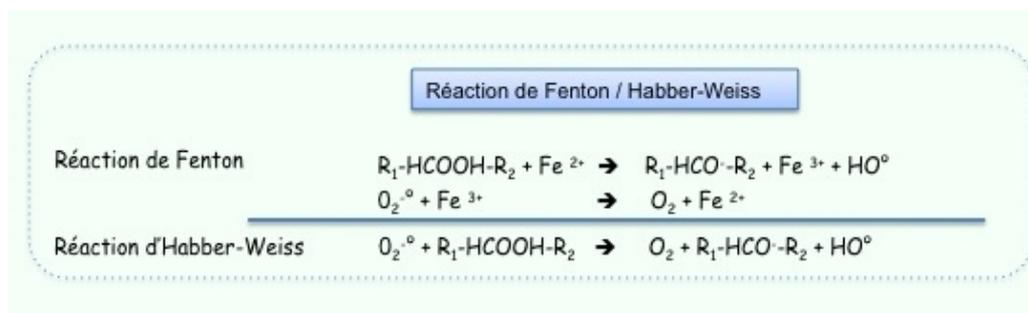


Figure 34 : Réaction de Fenton/Habber-Weiss.

Lors de cette réaction l'anion superoxyde est détecté. Une autre origine du radical hydroxyle est la réaction entre les métaux et des peroxydes organiques, lipidiques, ou protéiques. De nouvelles chaînes radicalaires, quelquefois très actives, peuvent alors être initiées par ce biais.

Le radical hydroxyle attaque avec beaucoup d'efficacité les lipides et les protéines et induit des effets néfastes prononcés.

Le peroxyde d'hydrogène peut être catabolisé par les catalases, ou par des enzymes qui détectent les peroxydes en général et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en particulier : les glutathion peroxydases et les thiorédoxines.

Des ERO tels que **le monoxyde d'azote** peuvent être aussi à l'origine de la formation du radical hydroxyle. Le monoxyde d'azote est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthases (Figure 35).

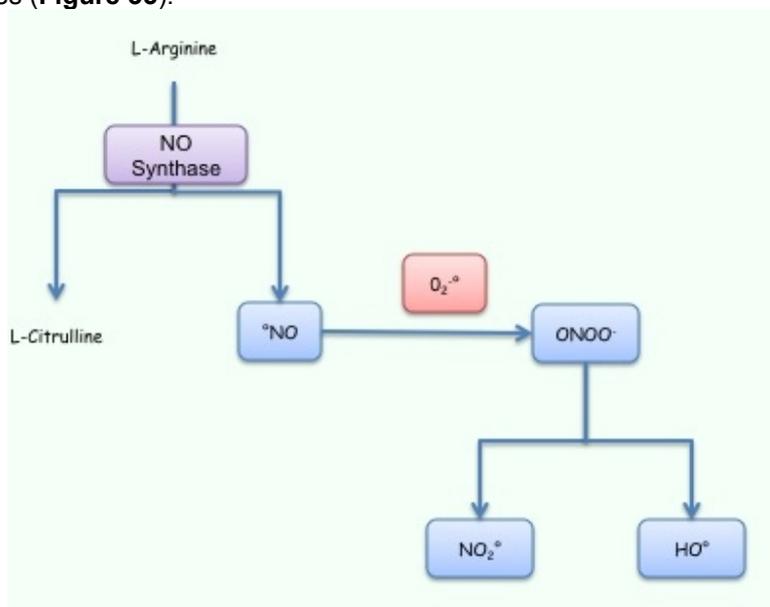


Figure 35 : Synthèse du monoxyde d'azote (°NO), du peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), et du dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>).

Le °NO est responsable de la vasodilatation des vaisseaux. Le monoxyde d'azote est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes, telle que la formation du peroxyde d'azote ONOO<sup>-</sup>, oxydant puissant vis-à-vis de nombreuses molécules. Ceci réduit la disponibilité du °NO et donc la vasorelaxation. En outre, le peroxyde d'azote peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>, °OH).

Une autre source de radical hydroxyle est la réaction de **l'acide perchloreux** formé lors de la phagocytose (par action de la myéloperoxydase) avec l'anion superoxyde (**Figure 36**).

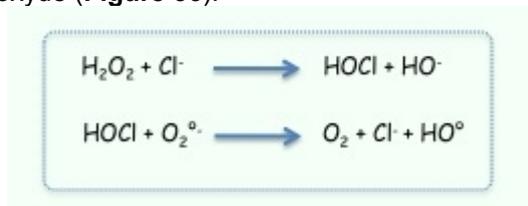


Figure 36 : Formation de l'acide hypochloreux et du radical hydroxyle.

**La catalase** est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les hématies. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figure 37**). L'enzyme comporte 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec  $\text{Fe}^{3+}$  lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase.

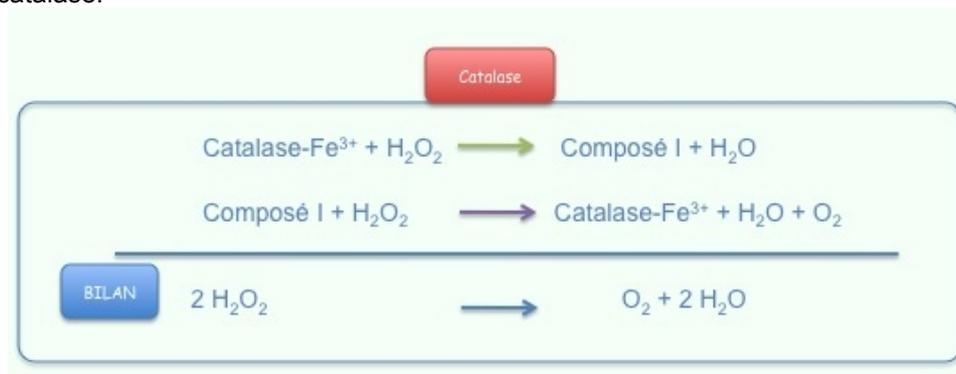


Figure 37 : Détoxification du peroxyde d'hydrogène par la catalase.

**Les peroxydases** sont des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (en particulier d'origine lipidique) en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. La dénomination des peroxydases dépend de ce substrat réducteur, dont chaque enzyme est spécifique. Ainsi il est possible de distinguer les glutathion peroxydases, les cytochrome c peroxydases, les NADPH peroxydases. Nous nous limiterons ici aux caractéristiques de la glutathion peroxydase (GPx).

**Les glutathion peroxydases**, du point de vue de la réactivité, catalysent la réduction des hydroperoxydes en alcools, moins réactifs tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG) :



ROOH pouvant être un hydroperoxyde d'acide gras, de cholestérol (estérifié ou non), ou un hydroperoxyde synthétique. Il existe 4 types de GPx (**Tableau VI**)<sup>229</sup> :

<sup>229</sup> Jefferies H. ANZ J Surg. 2003. PMID : 12864828.

## Introduction

|       | Protéine                            | Localisation tissulaire | Site d'action         | Substrats <sup>*</sup>                                                                           |
|-------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GPx-1 | Tétramère (sous unité de 22-23 kDa) | Ubiquitaire             | cytosol               | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , peroxydes d'acides gras, autres peroxydes organiques, peroxydite |
| GPx-2 | Tétramère (sous unité de 24 kDa)    | Foie, gros intestin     | cytosol               | idem à GPx-1                                                                                     |
| GPx-3 | Tétramère (sous unité de 25 kDa)    | Reins, autres...        | extracellulaire       | idem à GPx-1; hydroperoxydes des phospholipides                                                  |
| GPx-4 | Monomère, 19 kDa                    | Testicule, autres...    | cytosol, mitochondrie | hydroperoxydes des phospholipides                                                                |



Les hydroperoxydes de phospholipides ne peuvent être réduits par la GPx -1 qu'en présence de la phospholipase A2.

**Tableau VI : Les glutathion peroxydases (GPx) chez les mammifères.**

(Tiré de Lackner KJ. Ital Heart J. 2004)

- la GPx-1 ou c-GPx, cytosolique, ubiquitaire ; la GPx cytosolique ou GPx 1 (présente à 90% dans le cytosol et 10% dans les mitochondries) <sup>230</sup>.
- la GPx-2 ou GI-GPx gastrointestinale est nécessaire pour détoxifier le tractus intestinal des peroxydes d'hydrogène produits par le métabolisme des xénobiotiques ingérés. Une étude a montré que la GPx-2 est également exprimée dans les cellules épithéliales et notamment dans les cellules épithéliales mammaires humaines <sup>231</sup>. Cette étude a montré que le gène de la GPx-2 possède l'élément de réponse au RAR.
- la GPx-3 plasmatique
- la GPx-4 qui détoxifie préférentiellement les hydroperoxydes lipidiques. Contrairement à la GPx-1, la GPx-4 est capable de réduire les hydroperoxydes de phospholipides et de cholestérol intégrés dans les membranes <sup>232</sup>. La GPx-1 ne peut métaboliser les peroxydes organiques qu'une fois ceux-ci libérés des phospholipides membranaires par les phospholipases <sup>233</sup> ou ceux présents dans le cytoplasme.

Le GSH est le seul co-substrat utilisé par la GPx-1 alors que la GPx-4 est susceptible d'accepter d'autres thiols : le mercapthoéthanol, le dithioérythritol, et la cystéine comme donneurs de SH <sup>234</sup>. Les dithiols tels que l'acide lipoïque et le dithiothréitol activent la GPx-4 alors qu'ils ne sont pas substrats de la GPx-1 <sup>235</sup>. De plus la glutathion peroxydase est une sélénoenzyme, et le sélénium est incorporé en tant que sélénocystéine dans la chaîne peptidique en élévation lors de la traduction des ARN messagers en protéine <sup>236</sup>. La sélénocystéine est localisée au centre d'une poche composée de deux résidus hydrophobes glutamine et tryptophane distants l'un de l'autre dans la structure primaire et formant des liaisons hydrogènes avec le sélénium. Ces trois résidus constituent la triade catalytique essentielle et caractéristique des GPx <sup>237</sup>.

<sup>230</sup> Meyer SA. J Nutr. 1983. PMID : 6822910.

<sup>231</sup> Chu FF. J Nutr. 1999. PMID : 10498757.

<sup>232</sup> Thomas JP. J Biol Chem. 1990. PMID : 2294113.

<sup>233</sup> Grossmann A. Eur J Biochem. 1983. PMID: 6413205.

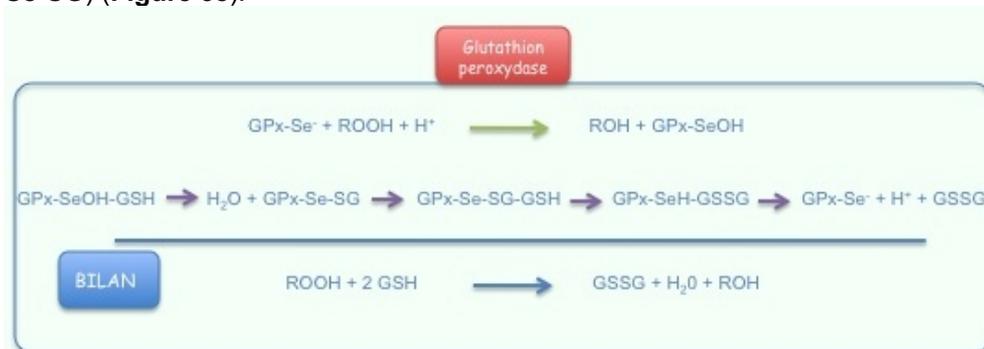
<sup>234</sup> Takebe G. J Biol Chem. 2002. PMID : 12185074.

<sup>235</sup> Ursini F. Methods Enzymol. 1995. PMID : 7476373.

<sup>236</sup> Brigélius-Flohé R. Free Radic Biol Med. 1999. PMID : 10569628.

<sup>237</sup> Maiorino M. Biol Chem Hoppe Seyler. 1995. PMID : 8962674.

Les cinétiques enzymatiques de la GPx-1 et de la GPx-4 ne répondent pas à un mécanisme michaélien mais à un mécanisme ter uni ping-pong. Ce mécanisme correspond à un cycle catalytique comportant trois étapes irréversibles et trois formes de site actif cinétiquement distinctes : (GPx-Se<sup>-</sup> / GPx-SeOH / GPx-Se-SG) (**Figure 38**).



**Figure 38 : Détoxification des peroxydes par la glutathion peroxydase.**  
GPx-SeOH : acide sélénique.

La sélénocystéine du site actif est le siège des réactions redox du cycle catalytique<sup>238</sup>. A l'état basal, la sélénocystéine est sous forme d'anion sélénotate. Lors de la première étape, l'anion sélénotate est oxydé en acide sélénotique ou en sélénamide cyclique par l'hydroperoxyde du substrat. L'alcool correspondant est libéré. Au cours de la deuxième étape, le GSH se lie de façon covalente par l'intermédiaire de son groupement sulfure au sélénium oxydé pour former un sélénylsulfure. La dernière étape est la régénération de l'enzyme réduite par une seconde molécule de GSH qui coupe le pont sélénydisulfide et produit du glutathion disulfide GSSG. Le glutathion est régénéré par la glutathion réductase, par oxydation du NADPH en NADP<sup>+</sup> provenant de la voie des pentoses phosphates, lui-même restauré par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (**Figure 31**)<sup>239</sup>.

En cas de déplétion en sélénium dans le milieu, la cellule privilégie la transcription des sélénotéines dont le rôle est crucial pour le bon fonctionnement cellulaire au détriment d'autres. Cependant, lorsque les niveaux de sélénium reviennent à la normale, les sélénotéines dont l'expression était inhibée voient leur transcription augmenter de manière rapide. La GPx-4 fait partie des enzymes toujours transcrites même en cas de privation en sélénium<sup>240</sup>.

L'activité des GPx peut être inhibée par les acides mercaptocarboxyliques et mercaptans tertiaires. Ainsi les acides thiomalique et mercaptosuccinique<sup>241</sup> exercent une forte inhibition réversible alors que la cystéine et le mercaptoéthanol inhibent de façon modérée l'activité des GPx. Les oxydants tels que le monoxyde d'azote et le peroxyde d'azote inactivent l'enzyme de manière irréversible en oxydant la sélénocystéine par formation d'un sélénylsulfure<sup>242</sup>. De même, l'iodoacétate inhibe l'enzyme en acétylant la sélénocystéine<sup>243</sup>.

**La thioredoxine** est aussi impliquée dans la dégradation des peroxydes. C'est une protéine à groupement thiol (-SH). Elle est régénérée par la thioredoxine réductase en présence de NADPH.

<sup>238</sup> Epp O. Eur J Biochem. 1983. PMID : 6852035.

<sup>239</sup> Bryant RW. J Biol Chem. 1982. PMID : 6816802.

<sup>240</sup> Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Biochim Biophys Acta. 1990. PMID : 2223835.

<sup>241</sup> Chaudière J. J Biol Chem. 1984. PMID : 6693375.

<sup>242</sup> Asahi M. J Biol Chem. 1997. PMID : 9235904.

<sup>243</sup> Ursini F. Biochim Biophys Acta. 1985. PMID : 3978121.

Parmi les **anti-oxydants non enzymatiques hydrosolubles**, **l'acide ascorbique** est un composé réducteur qui agit en synergie avec l'alpha tocophérol en permettant sa régénération, lui-même étant ensuite régénéré par une NADPH réductase. Toutefois, ses propriétés réductrices ne sont pas toujours bénéfiques puisqu'en présence de métaux de transition, l'acide ascorbique se comporte en pro-oxydant.

Certains dipeptides, les protéines riches en groupes thiols SH, les polyamines, l'ubiquinol, les flavonoïdes, la bilirubine, l'acide urique, l'acide lipéique sont des anti-oxydants non enzymatiques.<sup>244</sup> (**Figure 39**).

Parmi eux, **le glutathion** (glutamyl - cystéinyl-glycine) est le thiol majoritaire au niveau cellulaire (sa concentration est comprise entre 0,5 et 10 mM<sup>245</sup>), où il est essentiellement présent sous forme réduite. Le glutathion sous sa forme réduite est un tripeptide éminemment important du système de détoxification non enzymatique des cellules. La synthèse de ce composé nécessite une enzyme, la gamma glutamyl cystéine synthétase (gGCS). Le glutathion réduit joue un rôle majeur dans la détoxification des hydroperoxydes par les glutathion peroxydases. En outre, les glutathion transférases constituent une famille d'enzymes catalysant la conjugaison du glutathion à de nombreux substrats. Les conjugués du glutathion formés sont ensuite métabolisés par coupure du glutamate et du glycolle et acétylation du groupe thiol libre de la cystéine. Les dérivés acides mercapturiques résultants sont excrétés. Les glutathion transférases possèdent une activité peroxydase vis-à-vis des peroxydes organiques mais pas vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène<sup>246</sup>. Le glutathion interagit aussi avec la vitamine C, la vitamine E et les SOD.

L'acide urique présente également, aux concentrations physiologiques, une activité anti-oxydante puisqu'il piège les radicaux HO°.

Enfin les **polyphénols**, parmi lesquels les flavonoïdes, sont des piègeurs de radicaux libres et des chélateurs d'ions métalliques, ce qui leur confère des propriétés anti-oxydantes plus ou moins importantes selon leur structure. Ils fonctionnent notamment en cédant un atome d'hydrogène à des radicaux formés lors de la peroxydation lipidique, tels que les radicaux peroxyde ROO° ou alcoxyde RO°. Ces polyphénols, présents en particulier dans le thé et le vin, auraient un effet bénéfique contre les maladies cardiovasculaires.

Parmi les **anti-oxydants non enzymatiques liposolubles**, **la vitamine E** dont le composant majeur est l'alpha-tocophérol, (**Figure 40**), piège les radicaux peroxyde ROO° issus de la peroxydation lipidique. L'alpha-tocophérol agit grâce à la fonction hydroxyle du noyau chromanol. Les radicaux peroxyde sont alors réduits en hydroperoxydes, tandis que l'alpha-tocophérol conduit à un radical alpha-tocophéroxyle (Vit E° sur la **Figure 40**). Elle semble agir en synergie avec la GPx-4 dans la protection des membranes contre les ERO. Toutefois à côté de ce rôle protecteur, la vitamine E peut dans certaines conditions (en particulier à de fortes concentrations et en l'absence d'autres anti-oxydants) avoir un effet pro-oxydant vis-à-vis des AGPI.

**La famille des caroténoïdes** dont font partie le bêta-carotène et le lycopène, piègent l'oxygène singulet, grâce à leur structure très riche en doubles liaisons. Le bêta-carotène est aussi capable de piéger les radicaux peroxyde et protège ainsi les LDL, dans lesquelles il est transporté. Ce sont des précurseurs de la vitamine A qui existent dans l'organisme sous forme d'acide rétinoïque, de rétinol ou de rétinol. La vitamine A est plus efficace que la vitamine E pour protéger les AGPI<sup>247</sup>.

<sup>244</sup> Negre-Salvayre A. Oléagineux, Corps Gras, Lipides (ISSN : 1258-8210). Volume 12, Numéro 5, 433-8, Septembre-Décembre 2005.

<sup>245</sup> Gérard-Monnier D. Pathol Biol (Paris). 1996. PMID : 8734304.

<sup>246</sup> Van Bladeren P.J. Chem Biol Interact. 2000. PMID : 11154735.

<sup>247</sup> Palozza P. Free Radic Biol Med. 1995. PMID : 8582664.

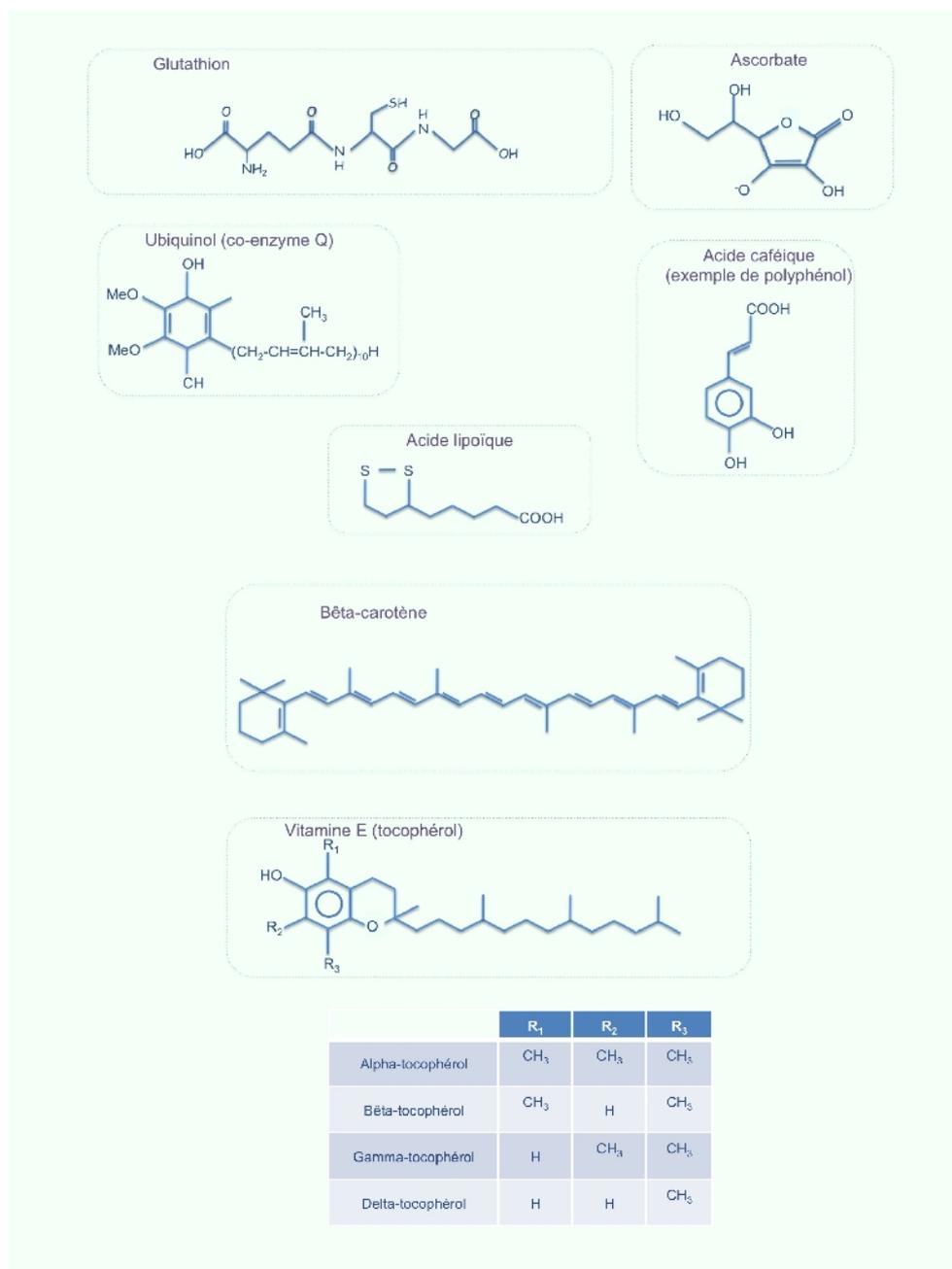
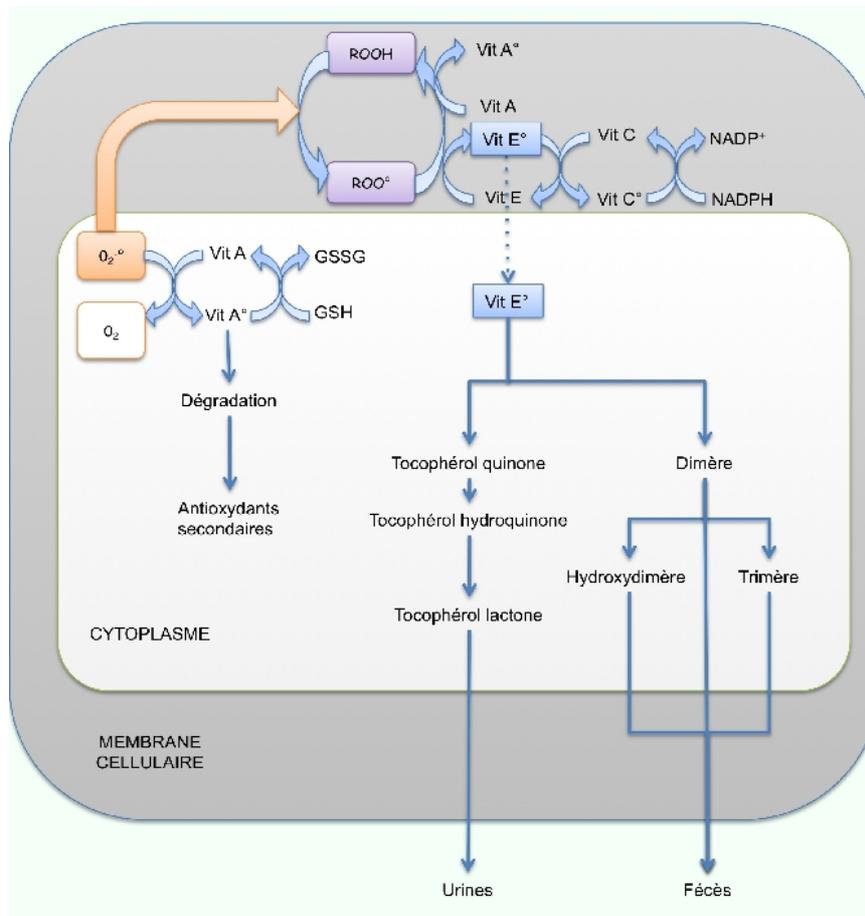


Figure 39 : Structures de quelques anti-oxydants non enzymatiques.

L'élimination des composés altérés se fait grâce aux GST, et à la thioredoxine (qui permettent aux protéines de reprendre leur conformation normale) <sup>248</sup>. La phospholipase A2 qui libère les acides gras peroxydés des phospholipides et permet la régénération des membranes participe aussi au processus d'élimination <sup>249</sup>.

<sup>248</sup> Shan X. Pharmacol Ther. 1990. PMID : 2195557.

<sup>249</sup> Sevanian A. Arch Biochem Biophys. 1983. PMID: 6859870.



**Figure 40 : Exemple de voies d'élimination des radicaux oxydés par les vitamines A, C, E.**  
 Vit A : vitamine A, vit C : vitamine C, vit E : vitamine E, ROOH : hydroperoxyde lipidique; ROO° : radical peroxye, X° : forme radicalaire des différents composés, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé. Tiré de Arousseau B. INRA Prod Anim. 2002. 15(1), 67-82.

## .C Oxydation des molécules biologiques

Si les ERO sont produites en trop grand nombre et que les défenses anti-oxydantes sont défaillantes, les molécules cellulaires (protéine, lipides, ADN) vont être attaquées par ces ERO.

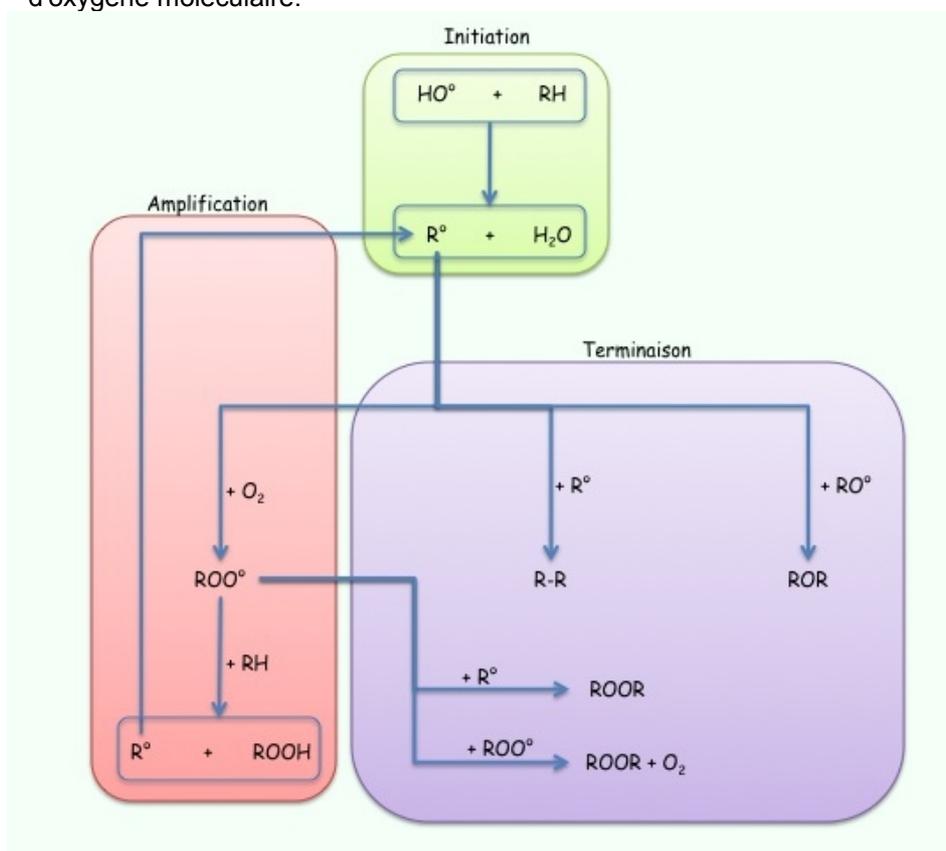
### .1 Oxydation des lipides

Les AGPI sont la cible lipidique majeure des ERO. Les membranes plasmiques et des organites cellulaires sont particulièrement vulnérables. La peroxydation lipidique est la détérioration oxydative des AGPI et se déroule en trois étapes (**Figure 41**):

- l'initiation au cours de laquelle l'acide gras insaturé RH perd un atome d'hydrogène au profit de l'agent initiateur (X) formant ainsi un radical d'acide gras R•.
- la propagation et l'amplification se traduit par la réaction du radical libre R• avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxye ROO•. Ce dernier

est capable d'arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras RH, devenant ainsi un peroxyde ROOH tout en libérant un nouveau radical d'acide gras  $R^\bullet$  capable d'induire à son tour la même cascade réactionnelle. La quantité de radicaux libres  $R^\bullet$  augmente ainsi de façon constante et exponentielle<sup>250</sup>. La propagation des radicaux libres est très rapide dans les tissus et ces ERO peuvent parcourir plusieurs dizaines de cm en une fraction de seconde.

● la terminaison se fait lors d'un apport massif de composés piègeurs et d'un bon équipement des tissus en enzymes spécialisées dans la défense antiradicalaire<sup>251</sup>. Par ailleurs la réaction entre deux radicaux libres  $R^\bullet$  l'un sur l'autre aboutit à la formation de peroxydes (lipidiques, protéiques, ou glucidiques) et à l'interruption momentanée de la chaîne radicalaire. Une autre possibilité est l'interaction de deux radicaux peroxydes qui conduit à la libération d'oxygène moléculaire.



**Figure 41 : Les trois phases de la peroxydation lipidique.**

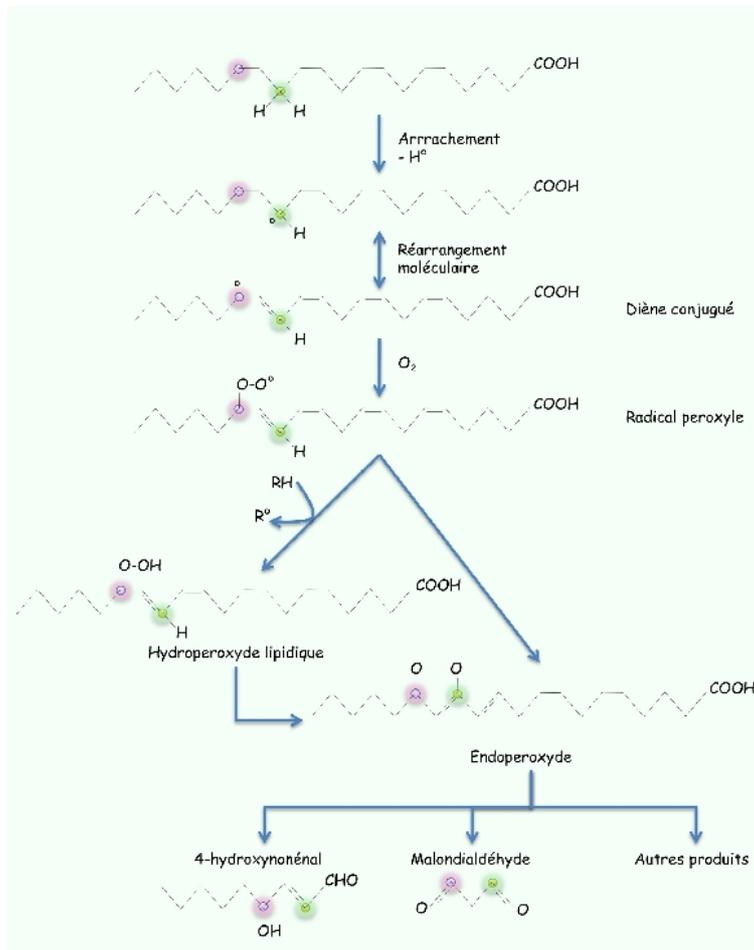
RH : acide gras,  $R^\bullet$  : radical d'acide gras,  $ROO^\bullet$  : radical peroxyde, ROOH : hydroperoxyde lipidique.

Ce phénomène génère des produits de peroxydation lipidique (4-HNE, malondialdéhyde) (**Figure 42**) qui sont hautement délétères pour les cellules. Le 4-HNE peut oxyder les protéines en se liant à leur groupement thiol (SH). Les AGPI n-3 et notamment le DHA, génèrent plus spécifiquement du 4-hydroxyhexenal, du 4-hydroperoxy-hexenal, et du 4,5-dihydroxyheptenal<sup>252</sup>.

<sup>250</sup> Deby C. Presse Med. 1986. PMID: 3024143.

<sup>251</sup> Aurousseau B. Reprod Nutr Dev. 2006. PMID: 17169308.

<sup>252</sup> Esterbauer H. Free Radic Biol Med. 1991. PMID: 1937131.



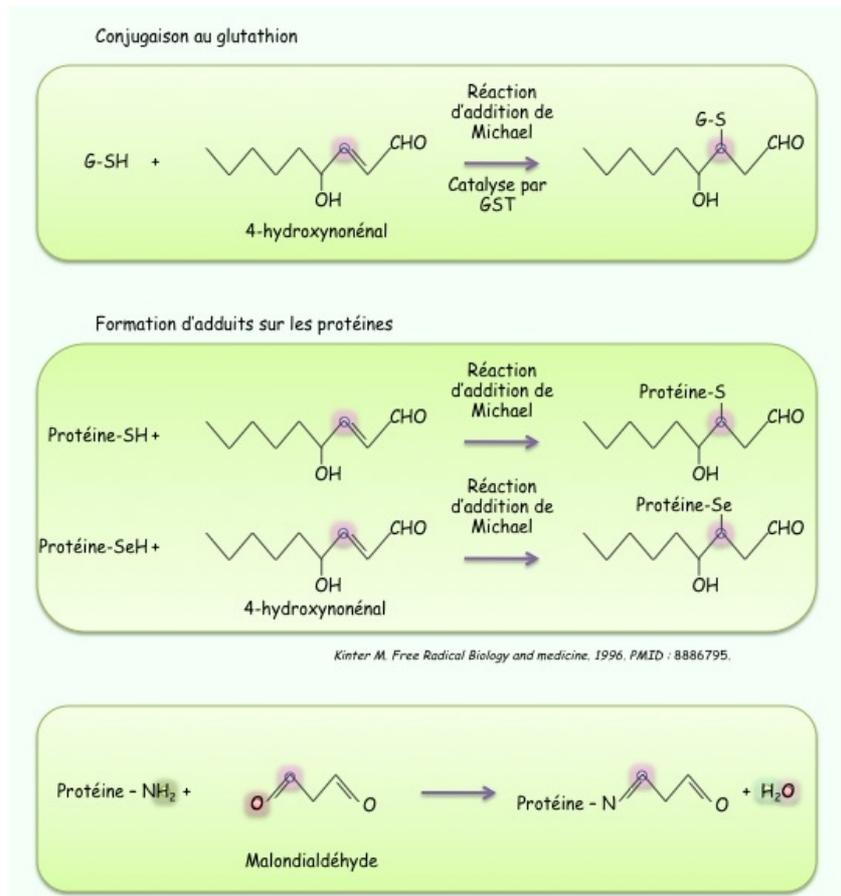
**Figure 42 : Peroxydation lipidique non enzymatique de l'acide arachidonique.**  
 RH acide gras, R° : radical d'acide gras, ROO° : radical peroxy, ROOH : hydroperoxyde lipidique.

## .2 Oxydation des protéines

Les protéines intracellulaires et extracellulaires sont aussi une cible des ERO. Dans les conditions physiologiques, l'oxydation catalysée par les métaux de transition est la source majeure d'oxydation des protéines. Elle met en jeu dans un premier temps, une liaison spécifique entre  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$  et la chaîne latérale d'un acide aminé de la protéine. En présence de peroxyde d'hydrogène ou d'hydroperoxydes, une décomposition de ces derniers se produit en générant différents types de radicaux libres ( $HO^\circ$  ;  $ROO^\circ$ ). Ceux-ci réagissent préférentiellement avec l'acide aminé qui avait fixé le métal de transition. Il s'agit donc d'un processus de type spécifique. L'arginine, l'histidine, la cystéine et la méthionine sont les principaux sites de liaison. On comprend que, dans le cas des enzymes qui requièrent un ion métallique pour leur activité, cette cascade de réactions puisse conduire à une perte partielle ou totale de leur activité. Les dommages créés sur les protéines sont de plusieurs types :

- oxydation des chaînes latérales des acides aminés
- oxydation au niveau de la chaîne peptidique suivie d'une fragmentation et/ou de la formation de liaisons croisées intra- ou intermoléculaires.

En plus de cette attaque directe des ERO, les protéines peuvent subir d'autres modifications d'une façon indirecte comme l'oxydation par des produits de peroxydation lipidique (**Figure 43**). Le 4-HNE forme des produits d'addition par l'intermédiaire de sa double liaison avec les chaînes latérales de la lysine ou de l'histidine ou de la cystéine des protéines conduisant ainsi à la formation de protéines carbonylées. Le malondialdéhyde réagit avec le groupement amine de la chaîne latérale des résidus lysine, avec formation d'une base de Schiff. La protéine modifiée est également carbonylée.



**Figure 43 :** Attaque par les produits de peroxydation lipidique des molécules biologiques telles que les protéines.

### .3 Oxydation des acides nucléiques <sup>253</sup>

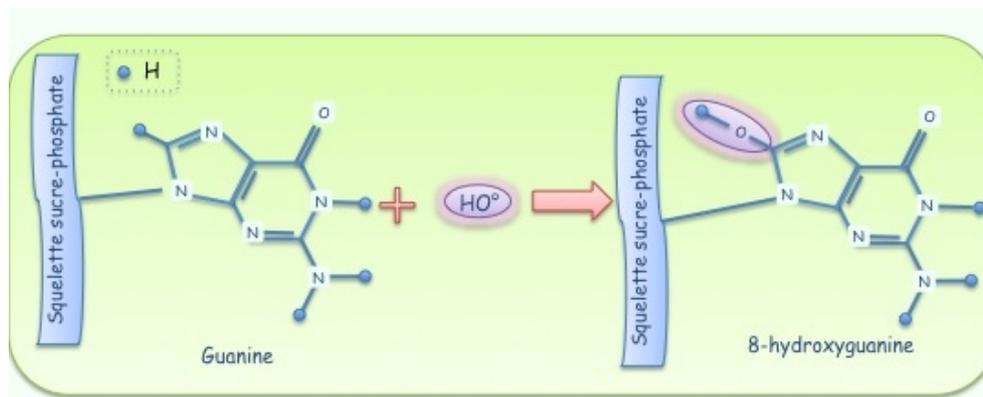
Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) sont aussi des cibles privilégiées pour les radicaux libres. L'ADN mitochondrial est plus vulnérable que l'ADN nucléaire et ceci est dû à plusieurs facteurs :

- la mitochondrie est le siège d'un métabolisme important de l'oxygène, source de fuite de radicaux libres oxygénés. Ceux-ci sont générés au niveau de la membrane mitochondriale interne, près de laquelle est localisé l'ADN mitochondrial.

<sup>253</sup> Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Delattre J. Radicaux libres et anti-oxydants. Tiré de « Biochimie Pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires ». 2003. Ed.Flammarion Médecine-Sciences pages : 59 :81. ISBN : 2-257-10946-5.

## Introduction

- L'ADN mitochondrial est dépourvu d'histones protectrices.
- Le système de réparation enzymatique de l'ADN mitochondrial semble limité.



**Figure 44 : Effet de l'attaque du radical hydroxyle (HO°) sur la guanine, base constitutive de l'ADN.**

Au cours de la réplication de celui-ci, la guanine s'associe normalement avec la cytosine. En revanche, la 8-hydroxyguanine se fixe avec une autre base purique, en l'occurrence l'adénine, ce qui provoque une mutation G(uanine)-T(hymine) dans le brin fils de l'ADN.

Parmi les ERO capables d'attaquer les acides nucléiques, l'anion superoxyde, le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène aux taux physiologiques, ne semblent pas réagir avec les bases et les sucres des ARN et ADN. En revanche, la haute réactivité du radical hydroxyle est à la base d'un grand nombre de produits d'oxydation puisqu'il réagit facilement avec les bases puriques et pyrimidiques et avec les sucres ribose et désoxyribose. A titre d'exemple, l'addition du radical hydroxyle sur le carbone 8 de la guanine génère un radical. Celui-ci peut être oxydé (en 8-hydroxy-guanine) ou réduit, conduisant à l'ouverture du noyau imidazole pour donner naissance à la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pyrimidine. Au cours de la réplication de l'ADN, la guanine s'associe normalement avec la cytosine. Par contre, la guanine oxydée (8-hydroxy-guanine) se fixe avec une autre base purique, en l'occurrence l'adénine ce qui provoque une mutation G(uanine)-T(hymine) dans le brin fils de l'ADN (**Figure 44**). L'attaque de HO° sur les atomes de carbone 4 et 5 de la guanine est également possible. De la même manière, il peut y avoir addition de radical hydroxyle sur les carbones 4, 5 et 8 de l'adénine. Les pyrimidines subissent également l'attaque de HO° pour donner de nombreux produits : la thymine peut subir le départ d'un atome d'hydrogène localisé sur le noyau ou sur le groupement méthyle. Il y a formation ultérieure de peroxydes de thymine pouvant conduire au thymidine glycol.

Les protéines nucléaires peuvent également subir les attaques des ERO, entraînant la formation de liaisons croisées ADN-protéines nucléaires par l'intermédiaire de ponts thymidine-tyrosine. Ces liaisons interfèrent avec la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN.

## .D Détoxification des molécules biologiques <sup>254</sup>

La détoxification des hydroperoxydes lipidiques se fait grâce aux glutathion peroxydases.

<sup>254</sup> Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Delattre J. Radicaux libres et anti-oxydants. Tiré de « Biochimie Pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires ». 2003. Ed.Flammarion Médecine-Sciences pages : 59 :81. ISBN : 2-257-10946-5.

Dans la majorité des cas, les protéines oxydées ne sont pas réparées et subissent une dégradation protéolytique (par le protéasome). Il semble en effet, que la réparation soit limitée à la régénération des dérivés d'oxydation des acides aminés soufrés en particulier de la méthionine. Celle-ci est régénérée par la méthionine sulfoxyde réductase qui utilise comme co-facteur la thioredoxine réduite.

Deux processus existent pour réparer les acides nucléiques oxydés :

- l'un direct mettant en jeu des glutathion transférases et des oxydases
- l'autre indirect faisant appel à des enzymes qui réalisent l'excision des bases oxydées ou celles des nucléotides oxydés (ADN glycosylases).

## .E Les ERO en tant que seconds messagers <sup>255</sup>

La plupart des facteurs de transcription comportent dans leur séquence protéique des cystéines (sensibles aux variations redox par leur groupe thiol) fonctionnellement très importantes. Premièrement, elles peuvent se situer dans le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription et assurer la reconnaissance d'un site donné par des interactions électrostatiques (en particulier des liaisons hydrogènes) avec les bases de l'ADN. Deuxièmement, elles peuvent donner naissance à des ponts disulfures inter- ou intramoléculaires essentiels pour la conformation tridimensionnelle de la protéine. Enfin, des cystéines participent à la coordination de cations métalliques (principalement  $Zn^{2+}$ ). C'est le cas des protéines dites "à doigt de zinc" dont la conformation assurée par la coordination du cation peut permettre une interaction avec le grand sillon de l'ADN.

L'oxydation d'une cystéine peut donc modifier le comportement d'un facteur de transcription. Les modifications par les ERO sont la plupart du temps réversibles. Ainsi une production limitée et transitoire induisant un stress oxydant non létal, peut influencer le comportement des protéines possédant des cystéines critiques et ainsi affecter la signalisation cellulaire et la régulation des gènes.

Ainsi plusieurs facteurs de transcription peuvent être régulés par les ERO :

- NFκB (Nuclear Factor κB) : facteur ubiquitaire qui peut être activé *in vivo* par  $H_2O_2$  et HClO. La présence d'anti-oxydants tels que la N-acétyl cystéine, les vitamines C et E, la thioredoxine inhibe cette activation. Les ERO activeraient des kinases chargées de phosphoryler les facteurs κB entraînant leur dissociation de NFκB ce qui lève leur inhibition. Cette action serait inhibée par la GPx-1.
- AP-1 : facteur dimérique composé des sous-unités Jun et Fos (association Jun-Jun ou Jun-Fos). Il est activé *in vivo* par  $H_2O_2$ . En effet, les Jun kinases (JNK) sont activées par le peroxyde d'hydrogène.
- P53 : facteur de transcription qui contient 12 cystéines dans sa séquence protéique. La liaison à l'ADN ainsi que la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de P53 diminuent lors d'un traitement oxydant (peroxyde hydrogène) <sup>256</sup>.

---

<sup>255</sup> Barouki R. J Soc Biol. 2001. PMID : 11938553.

<sup>256</sup> Parks D. Nucleic Acids Res. 1997. PMID : 9092641.

### **.F Le stress oxydant dans les cellules tumorales**

Les cellules tumorales présentent de faibles taux de peroxydation lipidiques. Or les taux de peroxydation lipidique sont inversement corrélés à la prolifération cellulaire. De plus les cellules tumorales ont de faibles taux d'AGPI du fait de la perte de l'activité delta-6 et delta-5 désaturase, de fort taux de vitamine E et en règle générale de faible taux de défenses anti-oxydantes (SOD, GPx, CAT) par rapport aux cellules normales <sup>257 258</sup>. Enfin les suppléments en AGPI augmentent la peroxydation lipidique de manière plus importante dans les cellules tumorales que dans les cellules normales. Ceci a lieu alors que les taux d'enrichissement en AGPI n-3 des cellules tumorales sont plus faibles que ceux des cellules normales.

---

<sup>257</sup> McEligot AJ. Annu Rev Nutr. 2005. PMID : 16011468.

<sup>258</sup> Das UN. Med Sci Monit. 2002. PMID : 11951081.

## La vascularisation tumorale

Le processus d'angiogenèse correspond à la formation de néovaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire existant <sup>259</sup>. Ce processus est différent de la vasculogenèse qui est la formation d'un plexus vasculaire *de novo* <sup>260</sup>. Après l'embryogenèse, durant laquelle tout le réseau sanguin doit être généré, l'angiogenèse est très fortement inhibée. A l'âge adulte, les cellules endothéliales, qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins, sont normalement maintenues dans une phase de repos grâce à un équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Leur activation dans un processus d'angiogenèse physiologique n'est sollicitée que dans des situations bien précises : la réparation tissulaire <sup>261 262</sup> le développement du corps jaune, le développement de l'endomètre lors de la grossesse et des menstruations <sup>263</sup>. Cependant, l'activation de l'angiogenèse est à l'origine de certaines situations pathologiques telles que les rétinopathies, les maladies inflammatoires, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le développement tumoral et l'invasion métastatique <sup>264</sup>.

*Nous rappellerons dans cette partie ce qui distingue la vascularisation tumorale d'une vascularisation normale en terme d'architecture ou de marqueurs moléculaires.*

### .A L'architecture tumorale

#### .1 L'architecture des vaisseaux en conditions physiologiques <sup>265</sup>

Les vaisseaux sont constitués d'une couche de cellules endothéliales qui tapissent la face interne des vaisseaux. Elles constituent un véritable pavage pour l'écoulement sanguin. Les capillaires sont entourés par une membrane basale et quelques péricytes (**Figure 45**). Les artérioles et les veinules présentent un recouvrement plus important que les capillaires en cellules de soutien. Les artérioles sont complètement recouvertes de cellules musculaires lisses qui forment leur propre membrane basale.

Quant aux vaisseaux de gros calibre, ils sont entourés par l'intima constituée de cellules endothéliales.

La média des artères (qui entoure l'intima) est constituée de cellules musculaires lisses et de fibres de collagène et d'élastine. Les cellules musculaires lisses des vaisseaux (CMLV) ont un rôle considérable dans la régulation de la section des vaisseaux. Elles jouent le rôle avec les péricytes, de cellules de soutien. Les péricytes diffèrent des CMLV de part les interdigitations qu'ils émettent vers les cellules endothéliales. Le collagène assure une raideur au vaisseau pour résister à la pression du sang et l'élastine est responsable des propriétés élastiques de la

<sup>259</sup> Carmeliet P. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999. PMID: 9893349.

<sup>260</sup> Risau W. *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*. 1997. PMID: 9109485.

<sup>261</sup> Li J. *Microsc Res Tech*. 2003. PMID: 12500267.

<sup>262</sup> Zcharia E. *FASEB J*. 2005. PMID: 15677344.

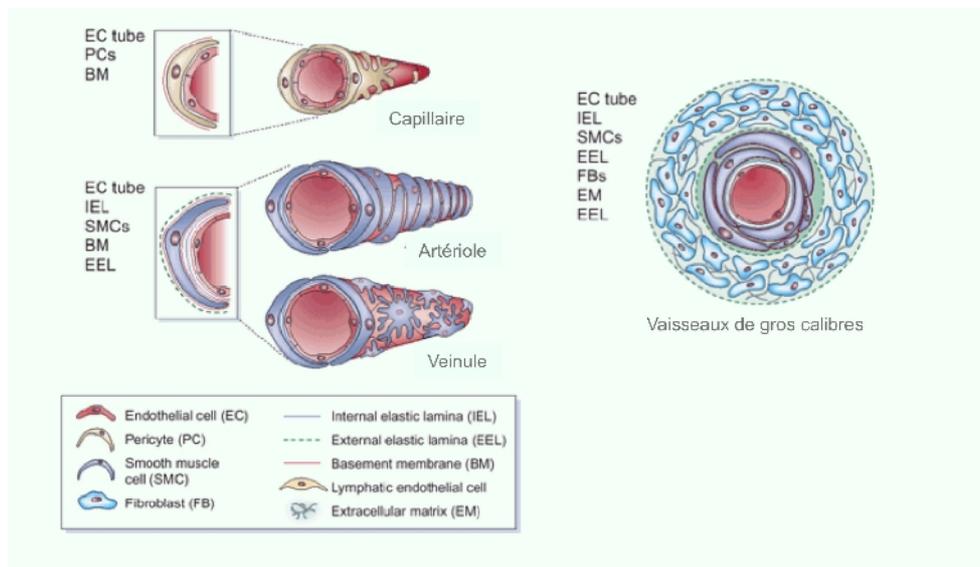
<sup>263</sup> Fujimoto J. *J Biomed Sci*. 2003. PMID: 12711859.

<sup>264</sup> Dvorak HF. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999. PMID: 9893348.

<sup>265</sup> Jain RK. *Nat Med*. 2003. PMID: 12778167.

paroi.

Enfin l'adventice est composée de tissu conjonctif et d'un réseau vasculaire, le *vasa vasorum* (les vaisseaux du vaisseau).



**Figure 45 : Composition de la paroi des vaisseaux.**  
Tiré de Jain RK. Nat Med. 2003. PMID: 12778167.

## .2 Désorganisation de l'architecture vasculaire dans les tumeurs

Les tissus tumoraux deviennent progressivement hypoxiques et nécrotiques du fait d'une rapide prolifération et d'une insuffisance en nutriments et oxygène<sup>266</sup>. Les cellules immunitaires de l'hôte peuvent infiltrer la lésion tumorale bien que la réponse immunitaire en général échoue à éradiquer la tumeur<sup>267 268</sup>. Dans cet environnement pro-inflammatoire, les néovaisseaux de la tumeur présentent une maturation anormale. L'architecture habituelle des artérioles, capillaires et veinules est abolie. Sont visibles à la place des embranchements, des bourgeonnements vasculaires irréguliers, avec de nombreux culs de sac<sup>269</sup>. Cette composition des vaisseaux est souvent désorganisée dans le cas des tumeurs, avec un recouvrement partiel par les péricytes<sup>270 271</sup>. La perte ou le dysfonctionnement de ces péricytes aboutit à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux et à une diminution du gradient de pression existant de part et d'autre de la paroi des capillaires. Or le gradient de pression existant entre le liquide interstitiel et la circulation capillaire joue un rôle non négligeable dans les échanges entre la circulation sanguine et le tissu irrigué.

<sup>266</sup> Pugh CW. Nat Med. 2003. PMID: 12778166.

<sup>267</sup> O'Hayre M. Biochem J. 2008. PMID: 18177271.

<sup>268</sup> El Hage F. Bull Cancer. 2008. PMID: 18230571.

<sup>269</sup> McDonald DM. Nat Med. 2003. PMID: 12778170.

<sup>270</sup> Gerhardt H. Cell Tissue Res, 2003. PMID: 12883993.

<sup>271</sup> Allt G. Cells Tissues Organs, 2001. PMID: 11340256.

### .3 Formation de nouveaux vaisseaux

En situation physiologique, le réseau sanguin est stable. Cette stabilité résulte d'un équilibre dynamique, soumis à une régulation très fine, entre trois acteurs différents : les facteurs pro-angiogéniques, les facteurs anti-angiogéniques et la matrice extracellulaire. A l'état adulte, la cellule endothéliale est quiescente et ne se renouvelle que tous les 2 ou 3 ans. Les vaisseaux se divisent et s'accroissent dans des circonstances bien précises : en cas d'ischémie provoquée par une oblitération progressive des vaisseaux ou une thrombose vasculaire responsable d'infarctus et en cas de tumeur. On considère qu'une tumeur ne peut progresser au-delà de quelques millimètres cubes sans qu'il n'y ait formation de nouveaux vaisseaux : tumeurs et vaisseaux dans une tumeur progressent de concert, dépendant l'un de l'autre. L'oxygène ne diffusant pas au-delà de 100  $\mu\text{m}$  des capillaires, l'hypoxie engendrée dans les cellules de ce tissu en carence va entraîner la stabilisation et la translocation vers le noyau de la sous-unité alpha du facteur de transcription inducible par l'hypoxie -HIF (hypoxia inducible factor). Une fois transloqué, la sous-unité alpha se lie à la sous-unité bêta. Cet hétérodimère entraîne alors la transcription de gènes portant la séquence HRE (hypoxia response element) pour promouvoir l'angiogenèse et ainsi pallier aux besoins du tissu en carence (**Figure 46**).

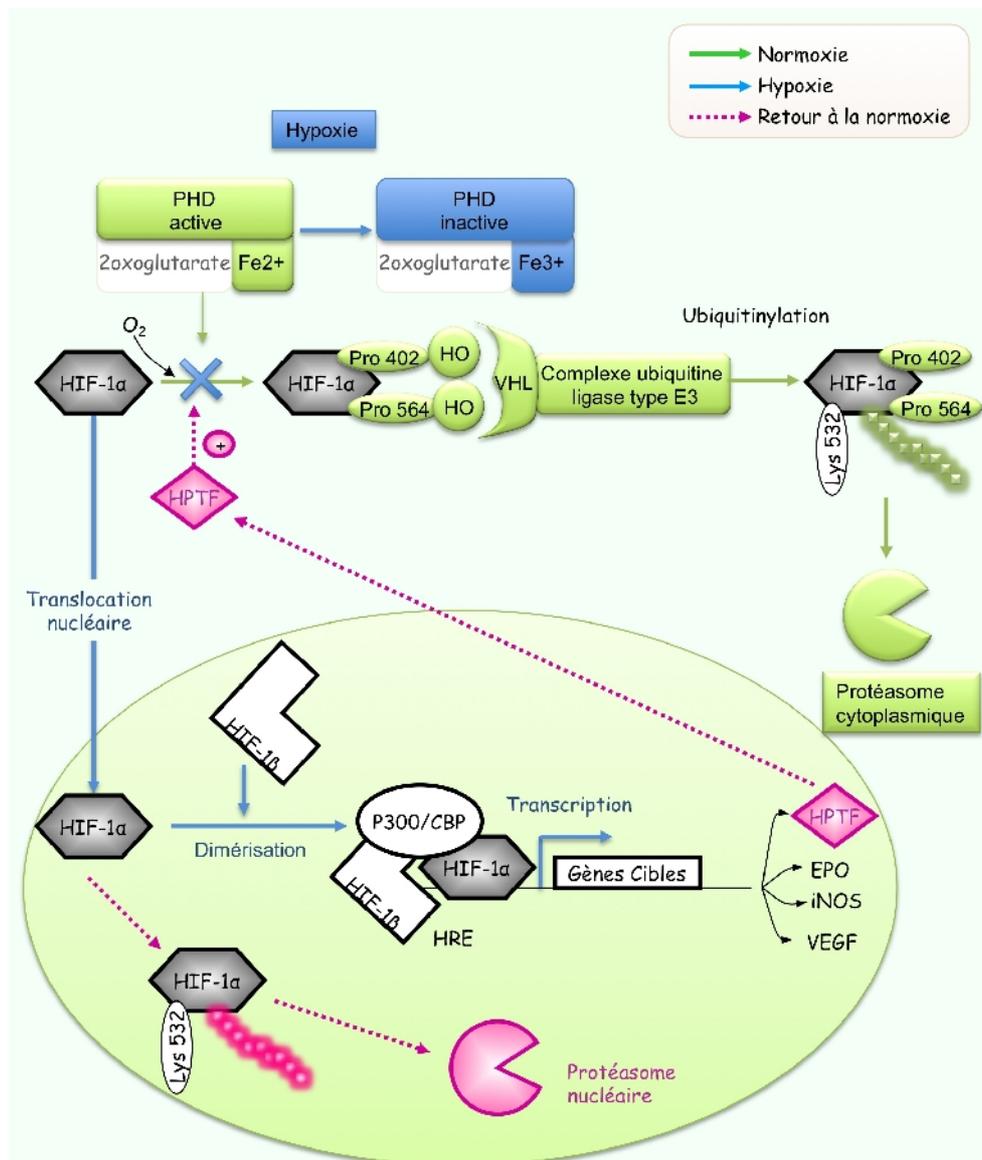


Figure 46 : Régulation du facteur de transcription inducible par l'hypoxie : HIF.

En conditions normoxiques, la sous-unité alpha de HIF est dégradée suite à l'hydroxylation des prolines 402 et 564 par la prolyl hydroxylase (PHD). Cette réaction est dépendante du fer, de l'oxygène et du 2-oxoglutarate. Les prolines hydroxylées sont reconnues par la protéine von Hippel Lindau (VHL) qui fait partie d'un complexe qui possède une activité E3 ubiquitine ligase. La sous-unité alpha de HIF est alors ubiquitinylée avant d'être dégradée par le protéasome cytoplasmique.

En conditions hypoxiques, la PHD est inactivée (son activité dépendant de l'oxygène)<sup>272</sup>. La sous-unité alpha d'HIF n'étant plus dégradée, peut être transloquée vers le noyau, où en se dimérisant avec la sous-unité bêta va former un facteur de transcription actif capable de transcrire les gènes en réponse à l'hypoxie (VEGF, EPO, iNOS,...). D'autres facteurs peuvent venir se fixer sur HIF dimérisé<sup>273</sup>.

<sup>272</sup> Gerald D. Médecine Sciences. 2005. Vol 21, 233 : 235.

<sup>273</sup> Gothié E. Médecine Sciences. 2002. Vol 18, 70 : 78.

Le retour à des conditions normoxiques va vite rétablir la dégradation de la sous-unité alpha, tout d'abord au niveau du noyau par le protéasome nucléaire. En réponse à l'hypoxie, HIF va aussi induire la transcription du facteur HIF-1 alpha protéasome targeting (HPTF). Ce facteur s'accumule en hypoxie et participe avec VHL à la dégradation rapide du HIF-1 alpha lors du retour en normoxie. HPTF accumulé sous forme non-activée en situation d'hypoxie serait une forme inductible de HIF-proline hydroxylase.

VEGF, qui est un facteur de croissance des cellules endothéliales, fait partie des gènes transcrits par HIF (**Etape 1 Figure 47**). Sa sécrétion par les cellules tumorales constitue un « switch » majeur dans les premiers stades de l'angiogenèse physiologique et pathologique. D'autres facteurs de croissance sont sécrétés, tels que le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), le bFGF (facteur de croissance des fibroblastes de type 2 ou basique). Ces facteurs de croissance vont se fixer à des récepteurs de type tyrosine kinase, qu'expriment les cellules endothéliales à leur surface. Les cellules endothéliales du capillaire passent alors d'un état dormant à un état actif dit « angiogénique », transition encore appelée « switch angiogénique » (**Etape 2 Figure 47**)<sup>274</sup>. Elles acquièrent des propriétés qu'elles avaient mises en sommeil : elles sont capables de se diviser de migrer et d'établir des connections avec les cellules avoisinantes. Elles expriment des facteurs de croissance, des récepteurs de surface, des molécules d'adhésion, des molécules de survie (molécules anti-apoptotiques). L'angiopoïétine (Angpt) de type 2 est sécrétée par les cellules tumorales ou par les cellules endothéliales activées par les facteurs de croissance, et vient inhiber la fixation de l'angiopoïétine 1 de manière compétitive sur les récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Angpt-1 est sécrétée par les péricytes et maintient l'intégrité des cellules endothéliales en venant se fixer à leur surface sur son récepteur Tie 2 (ou TEK). Angpt-2 en se fixant de manière compétitive sur ce récepteur, augmente la dégradation de la lame basale vasculaire, la migration des cellules endothéliales, et la formation de bourgeons vasculaires.

La cellule endothéliale stimulée, notamment par le VEGF, synthétise et active des métalloprotéases, des élastases, des cathépsines qui permettent au vaisseau en formation de progresser dans le tissu grâce à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire qui l'entourent (**Etapas 3-4 Figure 47**)<sup>275</sup>. Les métalloprotéases sont aussi sécrétées par les cellules tumorales. Les péricytes et les CMLV se détachent des vaisseaux préexistants<sup>276</sup>

<sup>277</sup>.

Les cellules endothéliales vont alors migrer dans un premier temps puis proliférer pour former de nouvelles structures tubulaires (**Etapas 5 et 6 Figure 47**). Enfin dans le cas d'une angiogenèse physiologique, les néovaisseaux formés sont stabilisés par les péricytes et les cellules musculaires lisses des vaisseaux (**Etape 7 Figure 47**). Cette dernière étape n'est pas réalisée correctement dans le cas de la mise en place de la vascularisation tumorale.

Enfin des pseudo-vaisseaux peuvent se former dans la tumeur<sup>278</sup> : il s'agit de conduites créées dans le tissu tumoral, bordées de cellules tumorales, et non pas de cellules endothéliales, phénomène appelé pour cette raison « mimétisme vasculaire ». Cela se produit dans plusieurs types de tumeurs comme les mélanomes agressifs, les tumeurs mammaires, ovariennes, prostatiques. Ces cellules tumorales miment certaines caractéristiques des cellules endothéliales avec l'expression de quelques marqueurs endothéliaux comme CD31, VEGFR2, la

<sup>274</sup> Bergers G, Benjamin LE. Nat Rev Cancer. 2003. PMID: 12778130.

<sup>275</sup> Kalluri R. Nat Rev Cancer. 2003. PMID: 12778132.

<sup>276</sup> Carmeliet P, Collen D. Curr Top Microbiol Immunol. 1999. PMID: 9893349.

<sup>277</sup> Dvorak HF, Nagy JA, Feng D. Curr Top Microbiol Immunol. 1999. PMID: 9893348.

<sup>278</sup> Furuya M. Vasc Health Risk Manag. 2005. PMID: 17315600.

VE-cadhérine, CD34, CD105. Ce processus de mimétisme vasculaire n'a pas lieu que dans les tumeurs, mais est rencontré aussi dans la formation du placenta où les cytotrophoblastes établissent des pseudo-vaisseaux, en modifiant leur phénotype épithélial en phénotype endothélial. Dans le cas des tumeurs, cette vascularisation particulière présente des réponses différentes aux inhibiteurs de l'angiogenèse comme l'endostatine ou le TNP-470 *in vitro* en comparaison aux cellules endothéliales originelles .

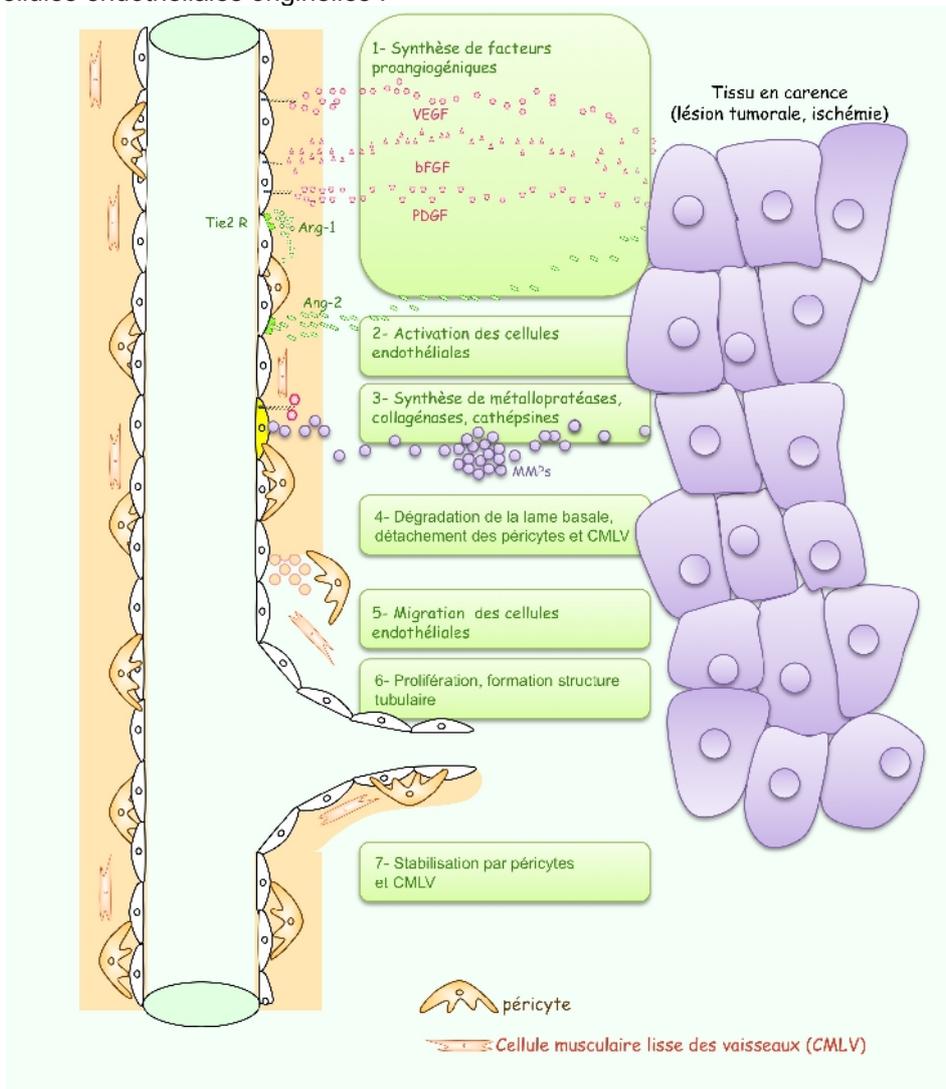


Figure 47 : Angiogenèse - formation d'un nouveau réseau vasculaire à partir de vaisseaux existants afin d'irriguer un tissu en carence.

## .4 Les facteurs proangiogéniques

Parmi, les **Facteurs de Croissance des Fibroblastes** (FGF pour Fibroblast Growth Factor) seuls trois membres sur les vingt connus sont présents dans les tissus adultes : FGF-1 encore appelé a-FGF (pour acide), FGF-2 également appelé b-FGF (pour basique) et FGF-7. La surexpression de FGF-2 augmente l'activité angiogénique par chimiotactisme et migration des cellules

endothéliales<sup>279</sup>. FGF-2 est aussi connu pour collaborer avec d'autres molécules angiogéniques telles que le VEGF, l'activateur du plasminogène et le facteur de croissance des hépatocytes<sup>280 281</sup>.

Les **Facteurs de Croissance des cellules endothéliales Dérivés des Plaquettes** (PDGF pour Platelet-Derived endothelial cell Growth Factor) sont fortement exprimés chez les patients atteints de cancers<sup>282</sup>. Ils sont sécrétés essentiellement par les plaquettes, et accessoirement par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les monocytes. Ils sont formés de deux chaînes polypeptidiques A et B reliées entre elles par des ponts disulfures formant soit des homodimères, soit des hétérodimères. On distingue des PDGF-AA, des PDGF-BB, et des PDGF-AB. La sécrétion de PDGF est activée par TNF- $\alpha$ , la thrombine, le facteur Xa, l'interleukine 1, l'angiotensine.

**Les Facteurs de Croissance Transformants** (TGF pour Transforming Growth Factor) présentent deux membres, TGF-alpha et TGF-bêta qui sont présents dans de nombreux tissus dont l'endothélium.

**L'angiogénine** est une enzyme possédant une activité ribonucléolytique nécessaire à la prolifération des cellules endothéliales.

**Le Facteur de Nécrose Tumorale alpha** (TNF-alpha pour Tumor Necrosis Factor-alpha) est une cytokine dont l'activité pro-angiogénique est indirecte puisqu'elle recrute les macrophages qui sécrètent ensuite du b-FGF.

Les **angiopoïétines** régulent l'agencement des cellules non-endothéliales de la paroi des vaisseaux (muscles lisses, péricytes).

**Le Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire** (VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor) est très représenté dans les tissus fortement vascularisés et lors du développement embryonnaire ou du développement tumoral, c'est le seul facteur de croissance véritablement spécifique des cellules endothéliales. L'expression de VEGF constitue un changement majeur dans les premiers stades de l'angiogenèse physiologique ou pathologique<sup>283</sup>. Les membres de la famille VEGF sont au nombre de six (**Figure 48**): VEGF-A, -B, -C, -D, -E et le facteur de croissance du placenta (PlGF pour Placenta Growth Factor). Il existe 4 récepteurs au VEGF : VEGF-R1 (ou Flt-1 pour fms like Tyrosine kinase), VEGF-R2 (ou Flk-1 pour foetal liver kinase-1, ou KDR pour kinase insert domain protein R), Neuropilin  $\frac{1}{2}$  (NRP  $\frac{1}{2}$ ), VEGF-R3 (ou Flt-4) fortement exprimé dans les cellules lymphatiques<sup>284 285</sup>.

L'affinité de VEGF-A pour le récepteur VEGF-R1 est 10 fois supérieure que pour R2, cependant l'activité catalytique qui en découle est 10 fois inférieure à R2. La médiation de l'angiogenèse est donc surtout due à la voie VEGF-A / VEGF-R2.

Le VEGF lié au récepteur VEGF-R2 déclenche une série d'événements intracellulaires conduisant notamment à la production de monoxyde d'azote, l'expression de molécules d'adhésion à la surface cellulaire (intégrines) et l'activation de métalloprotéases<sup>286</sup>. Le rôle de VEGF-R1 est complexe et dépend de l'environnement et du stade angiogénique. Il présente aussi une forme soluble qui peut contrôler les taux de VEGF circulants et inhiber la prolifération des cellules endothéliales<sup>287</sup>.

---

<sup>279</sup> Tanghetti E. Oncogene. 2002. PMID: 12032827.

<sup>280</sup> Bikfalvi A. Endocr Rev. 1997. PMID: 9034785.

<sup>281</sup> Onimaru M. Circ Res. 2002. PMID: 12433837.

<sup>282</sup> Alvarez RH. Mayo Clin Proc. 2006. PMID: 16970222.

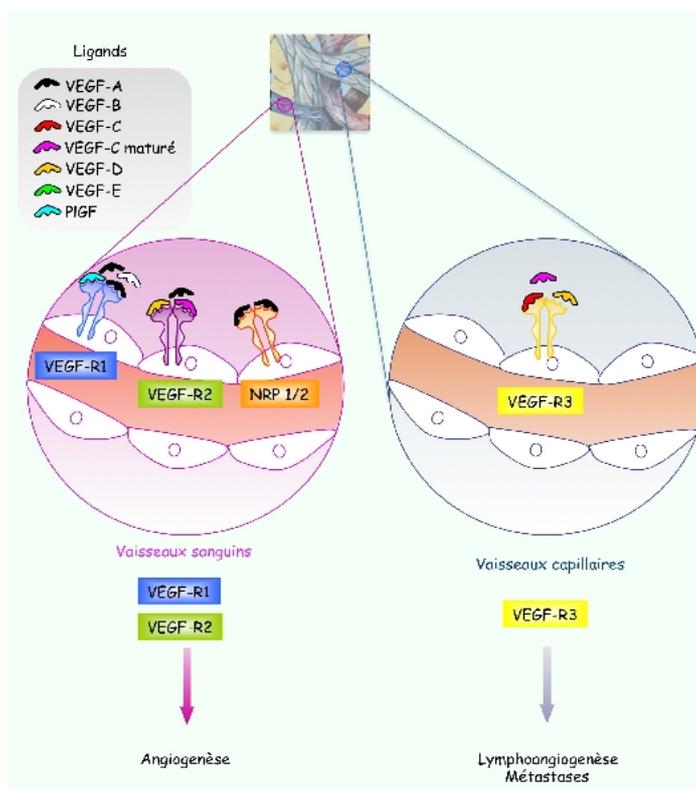
<sup>283</sup> Dvorak HF. J Clin Oncol. 2002. PMID: 12409337.

<sup>284</sup> Alitalo K. Nature. 2005. PMID: 16355212.

<sup>285</sup> Furuya M. Vasc Health Risk Manag. 2005. PMID: 17315600.

<sup>286</sup> Furuya M. Vasc Health Risk Manag. 2005. PMID: 17315600.

<sup>287</sup> Kendall RL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993. PMID: 8248162.



**Figure 48 : La famille des facteurs de croissance endothéliaux et leurs récepteurs.**

Le VEGF-C apparenté au VEGF-A, est synthétisé sous la forme d'un précurseur non mûré qui se lie à un récepteur spécifique, le VEGF-R3 présent dans les cellules endothéliales lymphatiques. Après maturation intracellulaire au niveau N et C terminal, le VEGF-C se lie avec une plus grande affinité que son précurseur au récepteur VEGF-R3 et au récepteur VEGF-R2.

Le **facteur de croissance épithélial** (EGF) joue un rôle important dans la régulation de la croissance, de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Il agit non seulement sur les cellules épithéliales mais aussi sur d'autres types cellulaires telles que les cellules endothéliales. La famille des EGF inclut aussi d'autres membres présentant une structure et des fonctions similaires tels que l'HB-EGF (pour Heparin-binding EGF-like growth factor), le TGF alpha (pour transforming growth factor- $\alpha$ ), l'Amphiréguline (AR), l'épiréguline, l'epigen, la bêtacelluline, NRG -1, -2, -3, -4 (pour neuréguline-1, -2, -3, -4).

L'EGF possède 4 récepteurs de type Tyrosine kinase, ErbB-1 (ou EGFR), ErbB-2 (ou HER2 chez l'homme, neu chez les rongeurs), ErbB-3 (ou HER3), ErbB-4 (ou HER4). Le récepteur HER2 est exprimé dans 20% à 30% des cancers du sein mais également dans les cancers de l'ovaire, du côlon, ou du pancréas. L'EGF peut également augmenter la transcription de HIF alpha en condition de normoxie

<sup>288</sup>

Enfin, **les éphrines** A et B stimulent l'angiogenèse et la migration des cellules (notamment dans le guidage axonal). L'éphrine B est transmembranaire, alors que l'éphrine A est liée à la membrane par un ancrage glycosylphosphatidylinositol. Les récepteurs aux éphrines de type tyrosine kinases et les éphrines elles mêmes peuvent être à la fois ligand et récepteurs : certaines éphrines peuvent non seulement activer leur récepteur mais aussi être activées par cette liaison pour transmettre le signal à l'intérieur des cellules exprimant les éphrines. C'est un signal bidirectionnel (**Figure 49**).

<sup>288</sup> Han ZB. Carcinogenesis. 2008. PMID: 18339685.

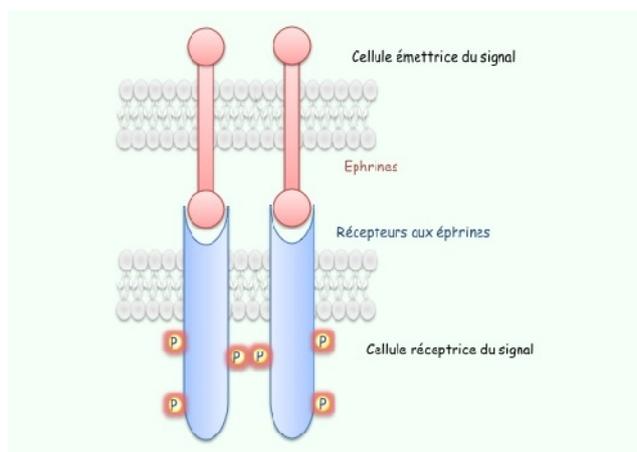


Figure 49 : Les récepteurs aux éphrines.

## .5 Les facteurs antiangiogéniques

Parallèlement, il existe actuellement huit familles de protéines et glycoprotéines antiangiogéniques connues. Ces facteurs ont été découverts notamment grâce à l'étude des tissus non vascularisés tels que le cartilage.

**Les thrombospondines**, THBS1 à THBS5, sont sécrétées par les plaquettes, les fibroblastes et d'autres cellules stromales<sup>289</sup>. Elles sont impliquées dans la migration et la prolifération cellulaire et diminuent l'adhésion des cellules endothéliales. La diminution de l'expression de THBS est un pré-requis pour l'induction de la néovascularisation<sup>290 291</sup>. Watnick a montré que certaines tumeurs produisent un inhibiteur de THBS1, ce qui rend la tumeur capable de métastaser<sup>292</sup>.

Le **Facteur Plaquettaire 4** (PF-4 pour Platelet Factor 4) est une chimiokine de type CXC, sécrété par les mégacaryocytes pendant l'agrégation plaquettaire (coagulation). Il est stocké dans les plaquettes, comme d'autres facteurs angiogéniques (pro- ou anti-). Il possède une activité anti-angiogénique en se liant à des molécules telles que l'interleukine-8<sup>293 294</sup> ou le VEGF-A<sup>165 295</sup> et bloquant ainsi leur activité proangiogénique. C'est aussi un précurseur par coupure protéolytique d'un fragment anti-prolifératif des cellules endothéliales qui possède une activité antiangiogénique 50 fois plus forte que son précurseur<sup>296</sup>.

Les **Inhibiteurs Tissulaires des Métalloprotéases** (TIMP1 à 3 pour Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) sont présents dans les cartilages, et inhibent les métalloprotéases et la prolifération des cellules endothéliales.

**L'angiostatine** a été découverte par l'équipe de Judah Folkman, elle est issue de la protéolyse de la plasmine, elle-même étant un fragment du plasminogène circulant. Elle peut être produite par les métalloprotéases. L'angiostatine est connue pour se lier à plusieurs protéines, et spécifiquement à l'angiomotine (qui promeut la prolifération et la migration des cellules endothéliales). Elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales et leur

<sup>289</sup> Volpert OV. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. PMID: 9600967.

<sup>290</sup> Rastinejad F. Cell. 1989. PMID: 2464438.

<sup>291</sup> Dameron KM. Science. 1994 PMID: 7521539.

<sup>292</sup> Naumov GN. J Natl Cancer Inst. 2006. PMID: 16507828.

<sup>293</sup> Dudek AZ. Blood. 2003. PMID: 12586630.

<sup>294</sup> Nesmelova IV. J Biol Chem. 2005 . PMID: 15531763.

<sup>295</sup> Gengrinovitch S. J Biol Chem. 1995. PMID: 7797488.

<sup>296</sup> Gupta SK. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995. PMID: 7644496.

migration.

**L'endostatine** a été découverte elle aussi par l'équipe de Judah Folkman<sup>297</sup>, c'est un fragment du collagène de type XVIII possédant des propriétés antiangiogéniques. Elle diminue l'expression du VEGF, bFGF, du récepteur au bFGF, de HIF1 alpha, du récepteur à l'EGF, de IDA, de la neuropiline et augmente celle de THBS1, maspase, TIMP2<sup>298 299</sup>.

**L'interleukine 12** (IL-12) est capable de faire régresser une tumeur et d'empêcher le processus de métastases de part son activité antiangiogénique.

**Le fragment 16kDa de la prolactine** (16K PRL) inhibe spécifiquement les effets du b-FGF et du VEGF.

Les **Interférons** (INF alpha à gamma) sont des cytokines déjà utilisées en thérapeutique antitumorale pour leur activité anti-prolifératrice, différenciatrice et stimulatrice du système immunitaire. Elles sont également capables d'inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales.

Certaines protéines régulatrices de l'angiogenèse (pro et anti) sont capturées par les **plaquettes**<sup>300</sup> et stockées dans des granules alpha pour être relarguées à l'intérieur des vaisseaux<sup>301</sup>. Les facteurs pro-angiogéniques sont stockés dans des granules différents des facteurs anti-angiogéniques.

## .6 La matrice extra cellulaire

Le troisième acteur de cet équilibre dynamique est la matrice extracellulaire. Essentiellement constituée de collagène, de protéoglycane et de glycoprotéines (laminine, fibronectine, vitronectine), elle contient également de nombreuses autres protéines en plus faible quantité. Les protéines qui la constituent sont autant de signaux latents, d'action opposée, permettant la survie cellulaire ou l'apoptose, l'adhésion ou à l'inverse la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et / ou la prolifération cellulaire. A titre d'exemple, les protéoglycans présentent une activité pro-angiogénique indirecte puisqu'ils potentialisent l'action du b-FGF. Lorsque cet équilibre est rompu et penche en faveur des facteurs pro-angiogéniques, les cellules endothéliales basculent d'un état quiescent vers un phénotype angiogénique.

## .7 Les molécules d'adhésion cellulaire<sup>302</sup>.

L'organisation des cellules endothéliales en arbre vasculaire est le résultat final d'une série d'interactions entre cellules et matrice extracellulaire et entre cellules elles-mêmes. Ces interactions sont médiées en partie par des molécules d'adhésion cellulaire spécifiques. Les intégrines ont été les plus étudiées au cours du développement vasculaire.

Il s'agit d'hétérodimères formés par deux sous-unités alpha et bêta. La spécificité de liaison dépend du domaine extracellulaire des sous unités alpha. Ainsi alpha 5-bêta 1 est un récepteur exclusif de la fibronectine, alors que alpha 6-bêta 1 lie spécifiquement la laminine. Les domaines de liaison extracellulaires identifient le motif GRD (Arg Gly Asp) et d'autres parties de glycoprotéines. Les parties intracellulaires des intégrines possèdent des domaines de liaison pour des

<sup>297</sup> O'Reilly MS. Cell. 1997. PMID: 9008168

<sup>298</sup> Folkman J. Exp Cell Res. 2006. PMID: 16376330

<sup>299</sup> Folkman J. Nat Rev Drug Discov. 2007. PMID: 17396134

<sup>300</sup> Folkman J. Thromb Haemost. 2001. PMID: 11487011.

<sup>301</sup> Italiano JE Jr. Blood. 2008. PMID: 17962514.

<sup>302</sup> Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE. Cell Tissue Res. 2003. PMID : 13680353.

molécules du cytosquelette. C'est le cas dans les jonctions d'adhérence qui relient un composant de la matrice à une intégrine liée par la vinculine à l'actine.

Certains membres des intégrines sont spécifiquement exprimés dans l'architecture vasculaire. La liaison des intégrines à leurs ligands favorise la prolifération, la migration, l'activation et la différenciation cellulaire et module l'expression de certains gènes agissant ainsi comme d'importants médiateurs de la morphogenèse vasculaire. Les intégrines alpha v-bêta 5 et alpha v-bêta 3 sont souvent fortement exprimées dans les vaisseaux angiogéniques, et ont un rôle proangiogénique.

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule – 1) et PECAM-1 ou CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule – 1) sont deux autres molécules d'adhésion cellulaire.

## **.8 Conclusion**

*Ainsi constitué, le réseau vasculaire tumoral s'oppose point par point au réseau vasculaire normal. L'arbre vasculaire normal est un réseau organisé, stable. La perméabilité des capillaires est contrôlée et dépend de la structure de l'endothélium propre au tissu. Le flux sanguin du réseau vasculaire normal est régulé. En revanche, le réseau vasculaire tumoral est désorganisé, anarchique, instable. Il existe des lacs vasculaires, des hémorragies et un passage de liquide plasmatique dans le secteur interstitiel du fait d'une perméabilité capillaire accrue. Des shunts artério-veineux s'établissent concourant à un flux sanguin irrégulier, non contrôlé par les agents vaso-actifs. Enfin, la couverture des capillaires par les péricytes est insuffisante. Ces anomalies de structure des vaisseaux tumoraux s'accompagnent d'anomalies fonctionnelles : hétérogénéité des flux sanguin et lymphatique, élévation de la pression interstitielle dans la tumeur du fait de l'accroissement de la perméabilité vasculaire, baisse de la pression partielle d'oxygène et acidose dans la tumeur. L'hypoxie et l'acidose favorisent la production de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, le développement de néo-vaisseaux et l'accroissement de la tumeur. Ainsi s'établit un cercle vicieux favorisant la progression tumorale.*

## **.B Les thérapies antiangiogéniques**

### **.1 Les stratégies antiangiogéniques**

Les cancers ne peuvent se développer que grâce à des vaisseaux apportant l'oxygène et les nutriments dont les cellules cancéreuses, grandes consommatrices de substrats énergétiques, ont besoin pour leur croissance. De là est née l'hypothèse qu'en détruisant les vaisseaux irriguant la tumeur, on pourrait stopper la croissance des cellules cancéreuses, ou du moins, stabiliser la tumeur. Cette hypothèse énoncée par Folkman<sup>303</sup> dès 1971 a permis le développement clinique d'inhibiteurs de l'angiogenèse en cancérologie en associant à des traitements conventionnels cytotoxiques (chimiothérapie, radiothérapie) des médicaments anti-angiogéniques cytostatiques. Il n'est pas démontré qu'administré isolément, par lui-même, un traitement anti-angiogénique soit efficace chez l'homme. Selon Folkman, dans une revue datant de 2007, l'intérêt d'une telle thérapie est qu'elle pourrait s'appliquer à l'ensemble des vaisseaux tumoraux quelque soit le type de cancer alors que la chimiothérapie doit être individualisée,

<sup>303</sup> Folkman J. New Eng J Med. 1971. PMID: 5556579.

en fonction du type de tumeur. Au contraire, Jung dans une revue antérieure (2000)<sup>304</sup>, soutient la thèse opposée à savoir que le phénotype de l'architecture vasculaire diffère selon les organes considérés<sup>305</sup>. Le microenvironnement peut influencer l'expression de gènes au sein de sites dans les tumeurs, et peut aussi influencer le phénotype des cellules endothéliales<sup>306</sup>. De ce fait, Jung pense que la réponse antiangiogénique doit s'adapter au phénotype des cellules endothéliales.

Folkman a énuméré dans une récente revue les nombreux essais cliniques en cours sur la plupart des thérapies antiangiogéniques<sup>307</sup>. Sur les 43 molécules en cours d'essai, 22 concernent la voie du VEGF, 4 la voie de l'EGFR, 4 ciblent les métalloprotéases, 4 les intégrines, 3 le cytosquelette.

Pour exemple, le traitement anti-VEGF s'attaque aux cellules endothéliales activées par le VEGF et ne concerne pas a priori l'endothélium normal qui est quiescent. Les vaisseaux tumoraux sont facilement accessibles par un traitement administré par voie systémique. Un anticorps monoclonal anti-VEGF, le bevacizumab, bloque les différentes isoformes du VEGF avec une haute affinité. Il a été approuvé par le FDA (Food and Drug Administration aux Etats-Unis) dans le traitement du cancer colorectal en 2004<sup>308 309</sup>. Du fait de la propriété des plaquettes de stocker des facteurs pro ou anti-angiogéniques, le bevacizumab est capté par les plaquettes où il se lie au VEGF<sup>310</sup>.

## **.2 Le concept de « normalisation » de la vascularisation tumorale par anti-angiogénèse**

L'hypothèse initiale de l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique dans le cancer était qu'en supprimant les vaisseaux irriguant une tumeur, on entraînerait un arrêt de la croissance voire une nécrose de la tumeur. En fait, plusieurs éléments remettent en cause cette hypothèse. Tout d'abord, il n'a pas été prouvé chez l'homme qu'un traitement anti-angiogénique prescrit isolément soit efficace. En fait, il est même possible que la destruction des vaisseaux tumoraux ait un effet aggravant sur la progression des tumeurs en stimulant vigoureusement la production de facteurs de croissance, notamment vasculaire, en réponse à l'hypoxie induite par le traitement anti-angiogénique.

Le concept d'un autre mécanisme d'action des agents anti-angiogéniques a été proposé notamment par Jain et collaborateurs<sup>311</sup>. Selon cette théorie, les traitements anti-angiogéniques pourraient rétablir les caractéristiques d'une vascularisation tissulaire « normale » dans la tumeur. Le traitement antiangiogénique supprimerait les capillaires immatures et régulariserait l'architecture des autres vaisseaux. L'organisation anarchique des vaisseaux tumoraux, leur morphologie anormale, leur perméabilité accrue favorise l'élévation de la pression interstitielle, l'hypoxie, une pénétration faible et hétérogène des produits anti-cancéreux. Teicher et collaborateurs<sup>312</sup> ont montré qu'une thérapie antiangiogénique assurerait une fourniture optimale d'oxygène, de nutriments et de molécules anti-cancéreuses, ce qui permettrait une efficacité accrue de la chimiothérapie et de la radiothérapie dont la performance dépend d'une bonne

<sup>304</sup> Jung YD. Cancer Metastasis Rev. 2000. PMID: 11191054.

<sup>305</sup> Auerbach R. Int J Radiat Biol. 1991. PMID: 1677953.

<sup>306</sup> Liu W. Int J Cancer. 2001. PMID: 11279602.

<sup>307</sup> Folkman J. Nat Rev Drug Discov. 2007. PMID: 17396134.

<sup>308</sup> Hurwitz H. N Engl J Med. 2004. PMID: 15175435.

<sup>309</sup> Raniere G. Curr Med Chem. 2006. PMID: 16842197.

<sup>310</sup> Henk M. AACR Meeting Abstracts, Apr 2006; 2006: 1342 - 1343. Abstract #5708.

<sup>311</sup> Jain RK. Science. 2005. PMID: 15637262.

<sup>312</sup> Teicher BA. Int J Cancer. 1994. PMID: 7515861.

oxygénation tissulaire.

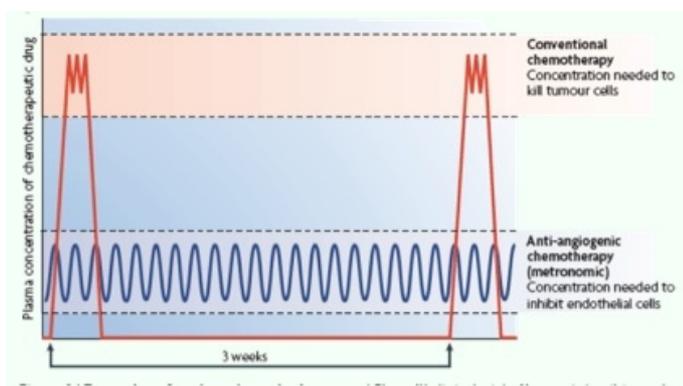
Il existe un équilibre entre le concept de normalisation où les tumeurs présenteraient une pression interstitielle des fluides diminuée et une meilleure perfusion vasculaire tumorale, et le concept de thérapie anti-angiogénique qui diminue la densité vasculaire tumorale et donc la distribution d'agent anticancéreux mais aussi de nutriments, d'oxygène <sup>313</sup>.

### **.3 Chimiothérapies antiangiogénique et cytotoxique**

Enfin les chimiothérapies classiques peuvent exercer elles aussi une activité antiangiogénique qui dépend de leur mode d'administration.

La chimiothérapie est donnée à des doses maximales tolérées, avec des intervalles entre les cycles de 1 à 3 semaines qui dépendent de l'état du patient. La thérapie antiangiogénique, elle, doit être administrée de manière à conserver un état stable des inhibiteurs dans le sang <sup>314</sup>.

Browder et collaborateurs ont montré que des tumeurs dans un modèle murin, pouvaient devenir résistantes au cyclophosphamide, quand celui-ci était administré à la dose maximale tolérée selon un protocole conventionnel de chimiothérapie <sup>315</sup>. Cependant si le cyclophosphamide était administré plus fréquemment et à des doses plus faibles (**métronomie**), la croissance tumorale étaient diminuée de manière plus importante du fait de l'apoptose des cellules endothéliales (**Figure 50**). Cela a permis de montrer qu'un agent anticancéreux cytotoxique peut avoir pour cible l'endothélium quand le protocole d'administration est modifié. Cette découverte a été confirmée par Klement et collaborateurs avec un agent anticancéreux différent <sup>316</sup>.



**Figure 50 : Principe d'une thérapie métronomique.**

Comparaison entre la chronologie d'une chimiothérapie conventionnelle (rouge) et celle d'une chimiothérapie métronomique (bleu).

tirée de Folkman J. Nat Rev Drug Discov. 2007. PMID : 17396134.

Enfin, nous avons évoqué précédemment la synthèse de facteurs de croissance angiogénique par les cellules tumorales elles-mêmes. Ainsi, une chimiothérapie cytotoxique ayant pour cible principale les cellules tumorales, peut avoir pour conséquence une diminution de la synthèse par les cellules tumorales des facteurs de croissance des cellules endothéliales aboutissant à une diminution de la vascularisation tumorale. Cette diminution n'est alors plus la cause mais la conséquence de la diminution de la tumeur.

<sup>313</sup> Feron O. Trends. Pharmacol Sci. 2004. PMID : 15380938.

<sup>314</sup> Kisker O. Cancer Res. 2001. PMID: 11606410.

<sup>315</sup> Browder T. Cancer Res. 2000. PMID: 10766175.

<sup>316</sup> Klement G. J Clin Invest. 2000. PMID: 10772661.

Objectif des travaux de thèse.

**Objectif** des travaux de thèse.

---

L'objectif de ces travaux de thèse est de comprendre comment les AGPI n-3 augmentent la sensibilité des cellules tumorales mammaires *in vitro* et *in vivo* aux agents anticancéreux. Au vu de la bibliographie, des zones d'ombres subsistent concernant :

- l'effet des AGPI sur la métabolisation intracellulaire des agents anticancéreux
- l'effet des AGPI sur le statut oxydant des cellules tumorales associé à la réponse aux agents anticancéreux
- l'effet des AGPI sur l'architecture vasculaire (associé à la réponse aux agents anticancéreux).

Pour répondre à ces questions, plusieurs pistes ont été explorées (**Figure 51**) :

## **.A Etude de l'effet des AGPI n-3 sur la modification de la perméabilité membranaire, le captage cellulaire et la métabolisation intracellulaire d'agents anticancéreux**

L'incorporation d'acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires en augmentant la fluidité membranaire, peut modifier le captage et la compartimentalisation intracellulaire de l'agent anticancéreux, et expliquer ainsi une chimiosensibilité accrue des cellules tumorales mammaires. Afin de comprendre comment le DHA augmente l'efficacité de ces agents anticancéreux à l'échelle cellulaire, nous avons étudié la distribution sub-cellulaire et les interactions moléculaires de la mitoxantrone au sein des compartiments cellulaires à l'aide d'une méthode d'imagerie moléculaire, l'imagerie confocale multispectrale (ICMS), dans la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 sensibilisable par le DHA à la mitoxantrone, en comparaison avec la lignée MCF-7 qui ne l'est pas (en collaboration avec le Pr. I. Chourpa).

## **.B Etude de l'effet des AGPI n-3 sur le statut oxydant cellulaire**

Comme nous l'avons exposé précédemment, le métabolisme des anthracyclines génère une production accrue des espèces réactives de l'oxygène capables d'attaquer les composants cellulaires, et notamment les lipides hautement peroxydables que sont les AGPI. Les produits de peroxydation lipidique qui en découlent ont des effets délétères sur les cellules et pourrait ainsi augmenter la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux.

Pour mener à bien cet objectif, la cytotoxicité de la doxorubicine, chef de file des anthracyclines, a été évaluée en présence de DHA dans les deux lignées tumorales mammaires MDA-MB-231 et MCF-7 (citées ci-dessus). Dans un premier temps, l'accumulation de la doxorubicine a été évaluée. Les principaux acteurs du statut oxydant cellulaire ont été mesurés dans un second temps : les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène - les niveaux de malondialdéhyde, produit de peroxydation lipidique – les niveaux de défenses anti-oxydantes non enzymatiques telles que le glutathion (GSH), la vitamine E – les niveaux d'enzymes anti-oxydantes que sont la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la superoxyde dismutase (SOD), les enzymes de synthèse du glutathion. Parmi les

défenses anti-oxydantes, il est apparu que la glutathion peroxydase voyait son activité et son expression diminuer en présence de DHA dans les cellules chimiosensibilisables. Nous avons dans un troisième temps étudié si l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux anthracyclines par un enrichissement en DHA est associée à une diminution de l'activité de la GPx *in vivo*. Pour cela l'activité de cette enzyme a été mesurée sur des prélèvements de tumeurs mammaires chimio-induites issus d'une expérimentation animale menée précédemment au laboratoire sur des rates nourries avec un régime alimentaire enrichi ou pas en DHA, avec ou sans vitamine E, et traitées à l'épirubicine <sup>317</sup>.

## **.C Etude de l'effet des AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale**

Une étude au laboratoire a montré que les AGPI n-3 sont capables de modifier la vascularisation tumorale mesurée par échographie Doppler puissance <sup>318</sup>. Les données de vascularisation mesurées par échographie Doppler puissance reflètent plutôt la macrovascularisation (diamètre > 100 µm). Nous avons donc dans un premier temps étudié les effets des AGPI n-3 seuls sur l'ensemble de la vascularisation tumorale (micro-, medium- et macro-vascularisation) avec une autre technique d'échographie, l'échographie de contraste (en collaboration avec le Pr. F. Tranquart). L'échographie de contraste permet de déterminer des paramètres dynamiques de l'ensemble de la vascularisation grâce à l'injection d'un produit de contraste, le Sonovue<sup>®</sup>, dans le réseau vasculaire. Nous avons élaboré une nouvelle méthode d'analyse des images d'échographie de contraste afin d'accéder aux différents compartiments vasculaires dans les tumeurs (micro-medium- et macro-vascularisation). Pour évaluer la qualité de la vascularisation tumorale, la pression partielle en oxygène a été mesurée grâce à une sonde polarographique. Enfin, nous avons exploré l'expression tumorale d'une centaine de gènes impliqués dans l'angiogenèse pouvant permettre d'expliquer l'effet des AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale.

De plus, les taxanes possédant aussi une action antiangiogénique <sup>319</sup>, l'hypothèse d'un effet potentialisant d'un régime enrichi en AGPI n-3 sur les effets antitumoral et antiangiogéniques d'un traitement au docetaxel a été exploré dans le cadre d'une expérimentation animale.

---

<sup>317</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID : 17020996.

<sup>318</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID : 17020996.

<sup>319</sup> Grant DS. Int J Cancer. 2003. PMID : 12532428.

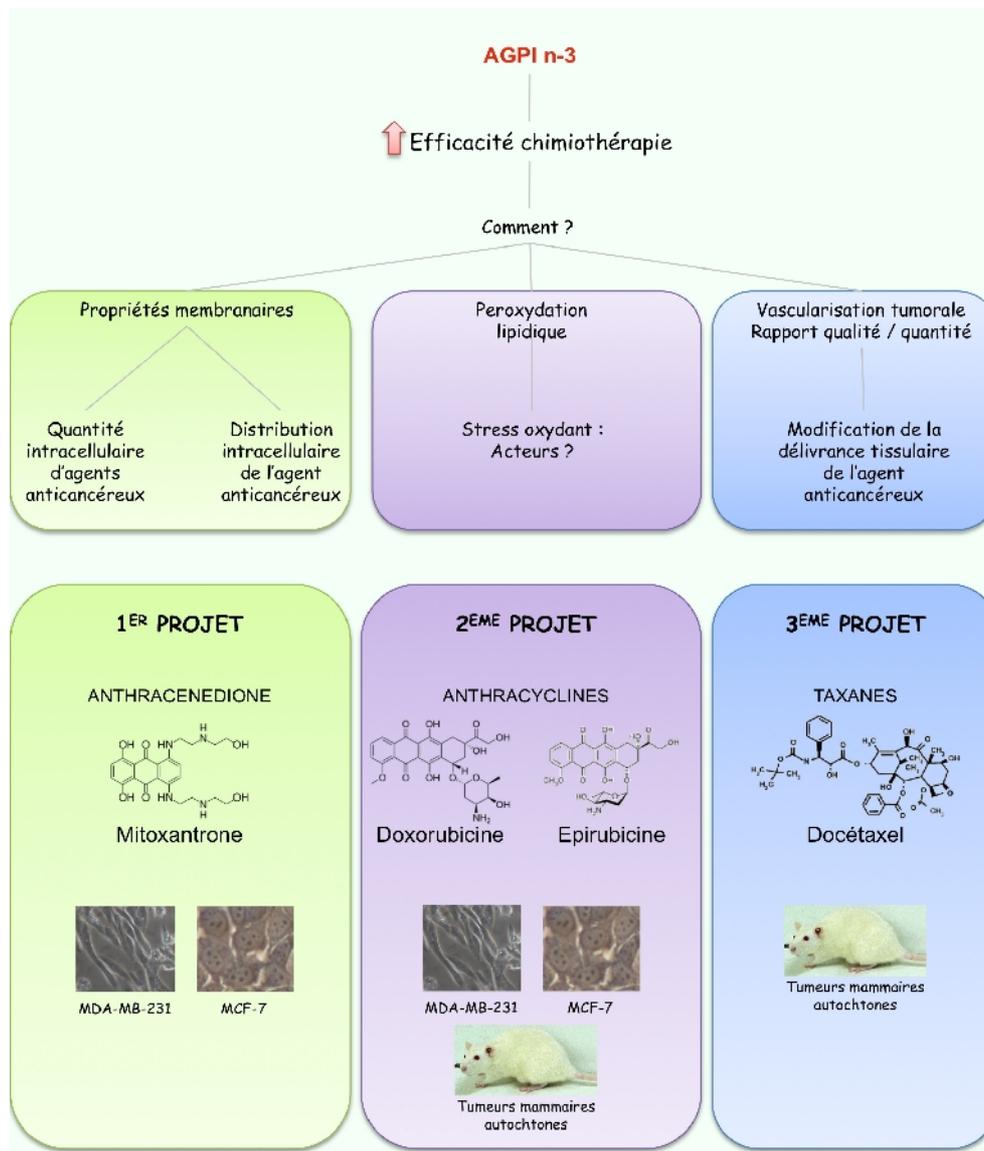


Figure 51 : Les 3 projets de thèse.



# 1<sup>er</sup> Projet



# Modifications du captage, de la distribution et de la métabolisation intracellulaire de l'agent anticancéreux par les AGPI n-3 dans les cellules tumorales mammaires humaines.

## .A Introduction

L'augmentation de la chimiosensibilité par les acides gras pourrait être la conséquence de divers facteurs au nombre desquels le captage et la distribution subcellulaire de l'agent anticancéreux pourraient jouer un rôle essentiel. En effet, les acides gras à longue chaîne en s'incorporant dans les membranes cellulaires sont capables de modifier leurs propriétés et en premier lieu leur fluidité, avec comme conséquence possible une modification de la compartimentalisation cellulaire des drogues.

Afin de comprendre comment le DHA augmente l'efficacité de ces agents anticancéreux à l'échelle cellulaire, nous avons étudié leur distribution subcellulaire et leurs interactions moléculaires au sein des compartiments cellulaires à l'aide d'une méthode d'imagerie moléculaire, l'imagerie confocale multispectrale (ICMS), développée au laboratoire de Chimie Analytique de l'UFR de Pharmacie de Tours (en collaboration avec Pr. Igor Chourpa, Université de Tours).

## .B Matériel et méthodes

*Les méthodologies sont exposées dans les articles. Il s'agit donc de compléter cette partie avec des éléments qui n'ont pas été évoqué dans la publication correspondante.*

*Toutes les expérimentations ont été réalisées au laboratoire sauf pour l'ICMS qui a été réalisée par le Pr I. Chourpa, (Laboratoire de Chimie Analytique et Hydrologie, Tours).*

### .1 Culture cellulaire

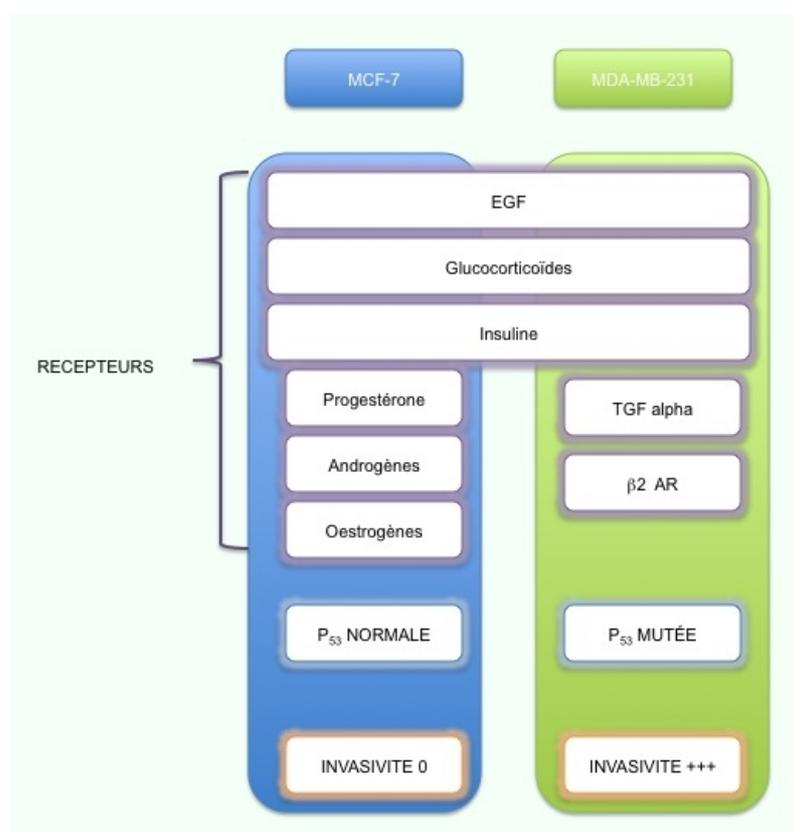
Les lignées cellulaires MBA-MB-231 et MCF-7, issues de l'American Type Culture Collection (ATCC) proviennent de chez Biovalley. Ces deux lignées sont des cellules adhérentes provenant d'un adénocarcinome mammaire humain. La lignée MDA-MB-231<sup>320</sup>, contrairement aux MCF-7<sup>321 322</sup>, est insensible aux oestrogènes et présente une protéine P53 (suppresseur de tumeur) non fonctionnelle. La **Figure 52** représente les principales caractéristiques de ces cellules.

---

<sup>320</sup> Cailleau R. J Natl Cancer Inst. 1974. PMID : 4412247.

<sup>321</sup> Soule HD. J Natl Cancer Inst. 1973. PMID: 4357757.

<sup>322</sup> Fairchild CR. Cancer Res. 1987. PMID: 2441861.



**Figure 52: Principales caractéristiques des lignées tumorales mammaires humaines MCF-7 et MDA-MB-231.**

(d'après les données sur le site <http://www.mdanderson.org/departments/cancerbiology/dIndex.cfm?pn=31062032-B0EB-11D4-80FB00508B603A14>)

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cambrex, USA), qui apporte les éléments nécessaires à la survie et la prolifération des cellules : vitamines, acides aminés, D-Glucose 4,5 g/L, L-Glutamine 584 mg/L et 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>. À ce milieu de culture sont ajoutés du sérum de veau fœtal (5 %) qui apporte les facteurs de croissance et cytokines nécessaires à la prolifération des cellules, de la pénicilline (50 UI), et de la streptomycine (50 g/mL). Les milieux de culture supplémentés en acide gras sont préparés chaque jour de traitement, de façon extemporanée, à partir des solutions stock d'acides gras (concentration finale de 30 μM, Sigma-Aldrich, France). Le milieu de culture contrôle contient de l'éthanol (EtOH) à la concentration finale de 0,02%. Cette concentration correspond à la quantité d'éthanol apportée lors des supplémentations en acide gras.

Les cellules sontensemencées à raison de 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les cellules MDA-MB-231 et 40 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les MCF-7. Les cellules sont traitées pendant 7 jours avec les milieux de culture supplémentés ou non en acide gras, le milieu étant renouvelé toutes les 24 heures. L'acide gras étant repris dans l'éthanol, la condition témoin est constituée par le milieu de culture additionné d'éthanol à la concentration finale de 0,02 % identique à la concentration d'éthanol dans le milieu DHA.

## .2 L'imagerie confocale multispectrale (ICMS)

Cette méthode réunit les avantages de la microscopie confocale et des spectrométries optiques (émission de fluorescence). La fluorescence intrinsèque des principes actifs des agents anticancéreux permet de détecter ces derniers à l'intérieur d'une cellule cancéreuse. L'interprétation spectrale de cette fluorescence procure l'information sur l'état moléculaire du principe actif (libre, lié à une cible, métabolisé, hydrolysé...) et sur son environnement (hydrophile, hydrophobe, pH). Étendue à toute la cellule, cette information spectrale permet d'obtenir les cartes spécifiques du principe actif, de ses complexes et/ou de ses métabolites au sein de la cellule.

La conjugaison optique entre un microscope confocal (LabRam, Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) et un spectromètre permet l'acquisition de spectres à partir de volumes aux dimensions micrométriques et sub-micrométriques. Grâce au dispositif de balayage (dans les trois dimensions x, y, z), l'échantillon est parcouru avec un pas défini (entre 0,2  $\mu\text{m}$  et plusieurs microns) en enregistrant les spectres à chaque pas. Ainsi, on enregistre une carte multispectrale, pouvant contenir des milliers de spectres (soit 900 spectres environ pour le scan d'une cellule).

Cette analyse s'appuie sur la caractérisation spectrale des échantillons modèles (molécules dans des conditions définies), réalisée au préalable. Pour ce projet trois environnements ont été reconstitués *in vitro* : environnement apolaire (hydrophobe), environnement riche en acides nucléiques, environnement polaire (hydrophile). Après excitation à 632,8 nm de la mitoxantrone placée dans chacun de ces milieux, le spectre d'émission a été enregistré comme modèle. Ces modèles permettent d'attribuer pour chaque spectre de mitoxantrone intracellulaire enregistré, un environnement (voir **Figure 53**) :

- mitoxantrone proche d'un environnement membranaire (apolaire)
- mitoxantrone liée à l'ADN
- mitoxantrone cytosolique (environnement polaire).

Si seul l'environnement change, sans que la forme moléculaire de la mitoxantrone soit modifiée, les spectres d'émission présentent une forme identique, mais sont décalés au niveau de la longueur d'onde d'émission. Si la forme moléculaire de la mitoxantrone est modifiée, la forme du spectre varie aussi.

Suite au recueil des données sur les cellules, l'analyse spectrale permet d'attribuer à chaque point de la carte les spectres enregistrés aux spectres modèles.

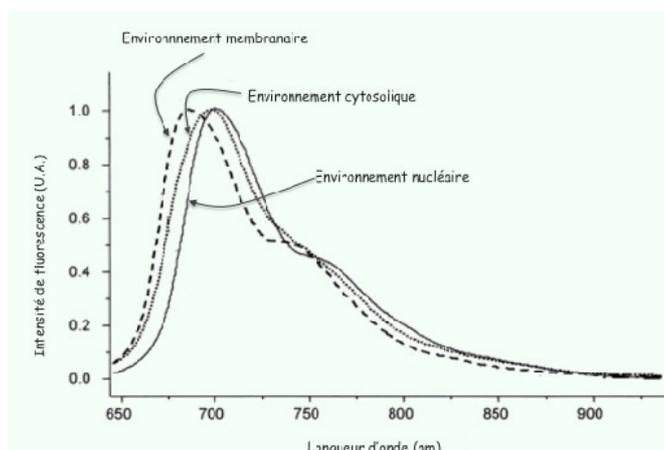


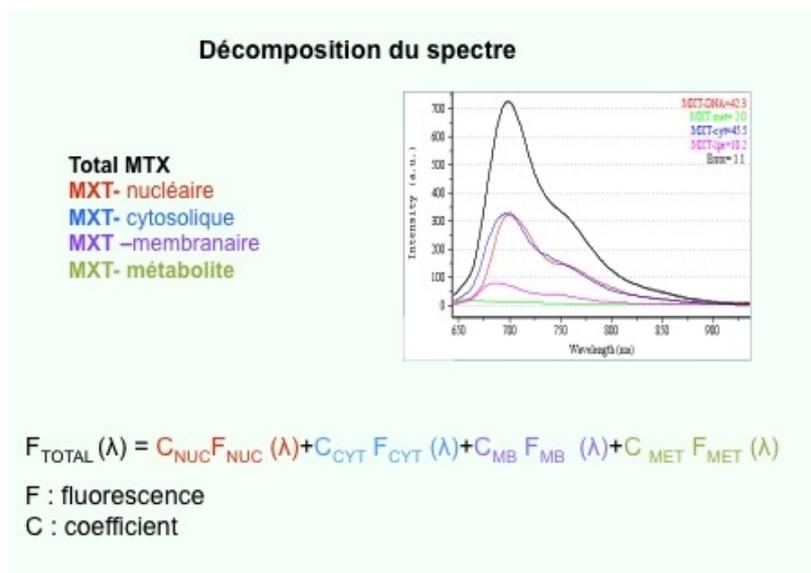
Figure 53 : Spectres d'émission de la mitoxantrone dans les 3 environnements cellulaires : cytosolique, membranaire, nucléaire.

### .3 Mesure de la fluorescence de la mitoxantrone dans les cellules en suspension

Les cellules cultivées une semaine en présence de DHA ont été incubées pendant une heure avec la mitoxantrone ( $0,5 \mu\text{M}$ ) à  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ . Après lavage, les cellules sont resuspendues dans du DMEM sans mitoxantrone, et une goutte de cette préparation est placée sur une lame. L'acquisition (2 à 3 min) après excitation des cellules commence, et la résolution spectrale permet l'enregistrement de 900 spectres.

En plus des spectres modélisés, une autre forme de spectre qui ne dépend pas de l'environnement mais de l'état moléculaire a été observée et dénommée « forme métabolique » de la mitoxantrone. Du fait que la forme de ce spectre était proche du spectre de la mitoxantrone dans une solution de peroxyde d'hydrogène, nous avons suspecté une forme oxydée de la mitoxantrone. Afin de tester cette hypothèse, les cellules ont été traitées avec des anti-oxydants tels que la N-acétylcystéine ( $10 \text{mM}$ ).

Chaque spectre enregistré peut être ainsi décomposé comme une somme des fluorescences des 4 spectres observés pondérées par les coefficients appropriés en fonction de la contribution de chaque fluorescence au spectre global. Par exemple, si la fluorescence est mesurée dans le cytosol, proche du noyau et dans un endroit peu riche en membranes cellulaires (**Figure 54**) la contribution des spectres de la mitoxantrone cytosolique et membranaire sera majoritaire.



**Figure 54 : Décomposition du spectre de la mitoxantrone selon la contribution relative des spectres de chaque forme de la mitoxantrone (nucléaire, cytosolique, membranaire ou métabolite).**

La contribution relative de chaque spectre est déterminée par les coefficients C dans l'équation de fluorescence globale.

#### **.4 Localisation du métabolite de la mitoxantrone dans les organites cellulaires**

Pour localiser le métabolite de la mitoxantrone au sein de la cellule, les organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (ER) ou les mitochondries ont été marqués avec des sondes fluorescentes : ER-Tracker et Rhodamine 123 respectivement (Invitrogen). Après traitement des cellules MDA-MB-231 avec la mitoxantrone (0,5  $\mu\text{M}$ ) pendant 1 h, les cellules sont lavées et remises en suspension dans un milieu contenant l'ER-Tracker (0,5  $\mu\text{M}$ ) ou avec la rhodamine 123 (1  $\mu\text{M}$ ). Après une incubation de 20 min au noir, les cellules sont lavées et une goutte de solution cellulaire est placée sur lame pour observation des fluorescences mitoxantrone + ER-Tracker ou mitoxantrone + Rhodamine 123 par ICMS. Après excitation à 488 nm, la colocalisation des fluorescences du métabolite avec celle des sondes a été déterminée par cartographie cellulaire.

### **.C Principaux résultats et discussion**

Les études de cytotoxicité de la mitoxantrone indiquent que la sensibilité des cellules MDA-MB-231 à cet agent anticancéreux est augmentée par une supplémentation en DHA du milieu de culture de la lignée tumorale mammaire humaine MDA-MB-231 ( $\text{IC}_{50}^{\text{MTX}} = 0,018 \mu\text{M}$  versus  $0,004 \mu\text{M}$  en présence de DHA) sur 7 jours. Dans les conditions contrôles, les cellules MCF-7 sont 10 fois plus résistantes que les MDA-MB-231 ( $\text{IC}_{50}^{\text{MTX}} = 0,196 \mu\text{M}$  versus  $0,018 \mu\text{M}$  respectivement). De plus les MCF-7 ne sont pas sensibilisées par le DHA à la mitoxantrone.

Une supplémentation en DHA entraîne une augmentation du captage de l'agent anticancéreux uniquement dans les MDA-MB-231 et pas dans les MCF-7. À elle seule, la différence de charge en mitoxantrone par les cellules pourrait

expliquer la différence de toxicité de l'agent anticancéreux.

L'étude de la distribution de la mitoxantrone au sein de la cellule montre tout d'abord que l'agent s'accumule majoritairement dans le noyau et le nucléole particulièrement, ce qui paraît en accord avec le mode d'action de l'agent anticancéreux qui inhibe la topoisomérase et donc la réplication de l'ADN. En revanche, la supplémentation en DHA ne modifie pas les concentrations nucléaires en mitoxantrone, mais les concentrations cytosoliques, et ceci uniquement dans les MDA-MB-231. L'augmentation de l'efficacité de la mitoxantrone par le DHA dans ces cellules pourrait donc être liée à l'augmentation de la quantité de mitoxantrone cytoplasmique.

Dans le cytosol, deux formes de mitoxantrone ont été observées grâce à l'analyse spectrale : la forme native et une forme métabolisée proche des membranes. L'augmentation des concentrations cytosoliques de mitoxantrone en condition DHA dans les MDA-MB-231 est due à l'augmentation des quantités de métabolite de la mitoxantrone, et non de la forme native.

La colocalisation de la mitoxantrone avec des sondes fluorescentes du réticulum endoplasmique ou des mitochondries a permis de mettre en évidence que ce métabolite oxydé de la mitoxantrone est situé dans le réticulum endoplasmique, riche en enzyme de phase I.

La forme métabolisée présente un spectre proche de celui observée lorsque la mitoxantrone est oxydée *in vitro* par du peroxyde d'hydrogène. Ce métabolite pourrait donc être un métabolite oxydé de la mitoxantrone. Pour tester l'hypothèse de l'implication du stress oxydant dans cette différence de métabolisation en présence de DHA, les cellules ont été traitées avec la N-acétyl cystéine, un anti-oxydant en présence de mitoxantrone. La N-acétyl cystéine abolit l'augmentation du métabolite de la mitoxantrone par le DHA. La métabolisation de la mitoxantrone semble donc mettre en jeu une voie oxydative. De plus la N-acétyl cystéine abolit aussi l'effet du DHA sur l'augmentation de l'efficacité de la mitoxantrone dans les MDA-MB-231. Tout ceci suggère que ce métabolite de la mitoxantrone est toxique et est responsable d'une plus grande sensibilité des cellules. Enfin, les espèces réactives de l'oxygène sont augmentées uniquement en condition DHA + mitoxantrone dans les MDA-MB-231.

En conclusion, l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à la mitoxantrone par le DHA est associée à l'augmentation d'un métabolite oxydé de l'agent anticancéreux. Il serait donc intéressant d'identifier ce métabolite oxydé et de mesurer l'impact de ce métabolite sur la viabilité des cellules tumorales mammaires.

(Figure 53).

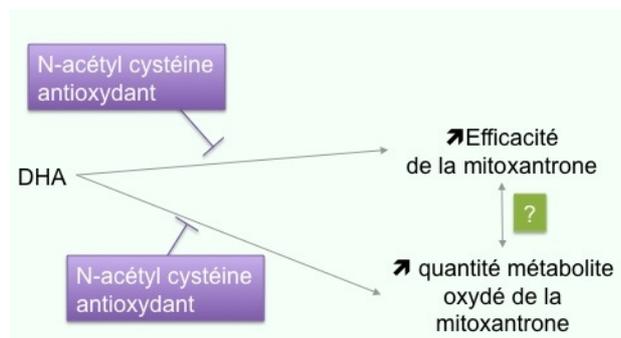


Figure 55 : Effet du DHA sur l'efficacité de la mitoxantrone dans les cellules MDA-MB-231 et sur la métabolisation de l'agent anticancéreux.

## 2<sup>e</sup> Projet

# Differential Subcellular Distribution of Mitoxantrone in Relation to Chemosensitization in Two Human Breast Cancer Cell Lines

Sophie Vibet, Karine Mahéo, Jacques Goré, Pierre Dubois, Philippe Bougnoux, and Igor Chourpa

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, E 0211, "Nutrition, Croissance et Cancer," Tours, F-37000 France; Université François-Rabelais, Tours, F-37000 France; l'Institut Fédératif de Recherches 135 "Imagerie Fonctionnelle," Tours, F-37000 France (S.V., K.M., J.G., P.B.); and Université François-Rabelais, Faculté de Pharmacie, "Focalisation magnétique d'agents anticancéreux," Tours, F-37200 France; l'Institut Fédératif de Recherches 135 "Imagerie Fonctionnelle," Tours, F-37200 France (P.D., I.C.)*

Received October 24, 2006; accepted February 9, 2007

## ABSTRACT:

The present work investigates the relationship between cancer cell chemosensitivity and subcellular distribution, molecular interaction, and metabolism of an anticancer drug. To get insights into this relationship, we took advantage of the differential sensitivity of two breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7, to anthracyclines, along with the property of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), to differentially enhance their cytotoxic activity. The fluorescent drug mitoxantrone (MTX) was used because of the possibility to study its subcellular accumulation by confocal spectral imaging (CSI). The use of CSI allowed us to obtain semiquantitative maps of four intracellular species: nuclear MTX bound to DNA, MTX oxidative metabolite in endoplasmic reticulum, cytosolic MTX, and finally, MTX in a low polarity environment characteristic of membranes. MDA-MB-231 cells were found to be more sensitive

to MTX ( $IC_{50} = 18$  nM) than MCF-7 cells ( $IC_{50} = 196$  nM). According to fluorescence levels, the nuclear and cytosolic MTX content was higher in MCF-7 than in MDA-MB-231 cells, indicating that mechanisms other than nuclear MTX accumulation account for chemosensitivity. In the cytosol, the relative proportion of oxidized MTX was higher in MDA-MB-231 (60%) than in MCF-7 (7%) cells. DHA sensitized MDA-MB-231 (~4-fold) but not MCF-7 cells to MTX and increased MTX accumulation by 1.5-fold in MDA-MB-231 cells only. The DHA-stimulated accumulation of MTX was attributed mainly to the oxidative metabolite. Antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine inhibited the DHA effect on both metabolite accumulation and cell sensitization to MTX. We conclude that drug metabolism and compartmentalization are associated with cell chemosensitization, and the related cytotoxicity mechanisms may involve oxidative stress.

Experimental studies have shown that exogenous *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may sensitize tumor cells to anticancer drugs, in cell culture or in animal tumors (Shao et al., 1995; Germain et al., 1999; Colas et al., 2004; Menendez et al., 2004, 2005). These effects of *n*-3 PUFAs have been found to be inhibited by the presence of antioxidants (Germain et al., 1998; Colas et al., 2004, 2005; Menendez et al., 2005). Several mechanisms have been proposed to account for the effect of PUFAs in increasing anticancer drug efficacy. These include an increase in drug transport across the cell membrane (Burns and North, 1986; Spector and Burns, 1987), generation of free oxygen radicals, and lipid peroxidation (Das, 1999;

Rose and Connolly, 1999; Stoll, 2002). Among the PUFAs, docosahexaenoic acid (DHA, a long-chain  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid) was the most potent in enhancing the cytotoxic effect of doxorubicin in the MDA-MB-231 breast cancer cell line (Germain et al., 1999). Recently, we found that the DHA-induced increase in doxorubicin cytotoxicity was cell line-dependent and was linked to oxidative stress (Mahéo et al., 2005).

Mitoxantrone (MTX), an anthracenedione, has a spectrum of clinical activity similar to that of anthracyclines. The antineoplastic activity of anthracyclines and anthracenediones has been attributed mainly to topoisomerase II inhibition and to reactive oxygen species (ROS) production (Gewirtz, 1999). However, MTX has been shown to generate free radicals to a much lesser degree than doxorubicin (Novak and Kharasch, 1985). Little is known about the effect of DHA on the chemosensitivity of breast cancer cell lines to MTX. Supplementation of leukemia cells by DHA led to an increase in MTX uptake (Burns et al., 1988a), but no change in the intracellular distribution of the drug was detected in subcellular fractions obtained by differential centrifugation and sucrose gradient separation after cellular disruption (Burns et al., 1988b).

This work was supported in part by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (Comités d'Indre et Loire, Loir et Cher, Indre), by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Action Thématique Concertée "Nutrition"), by Conseil Régional (Région Centre), and by Cancéropôle Grand-Ouest. S.V. was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://dmd.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/dmd.106.013474.

**ABBREVIATIONS:** PUFA, polyunsaturated fatty acid; DHA, docosahexaenoic acid; MTX, mitoxantrone; ROS, reactive oxygen species; CSI, confocal spectral imaging; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; CM-H<sub>2</sub>DCFDA, 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; a.u., arbitrary units.

A direct way to study the intracellular accumulation of fluorescent MTX (Bell, 1988) is use of flow cytometry and fluorescence microscopy. High-resolution images of the intracellular distribution of MTX in various cell lines have been obtained with confocal fluorescence microscopy (Smith et al., 1992, 1997; Fox and Smith, 1995; Consoli et al., 1997; Kellner et al., 1997; Hazlehurst et al., 1999; Litman et al., 2000). Nevertheless, band-pass analysis of the fluorescence intensity in confocal fluorescence microscopy limited the analysis to the overall drug detection and did not account for the fluorescence changes, depending on the drug environment/interaction.

An alternative to confocal fluorescence microscopy, the confocal spectral imaging (CSI) technique is based on measurement, at different points of a cell, of the fluorescence spectra, providing the ability to distinguish different molecular states of intracellular drugs (Sharonov et al., 1994). CSI has been recognized as a potent tool for direct qualitative and quantitative study of MTX within compartments of living K562 cells (Feofanov et al., 1997a,b, 1999). The main limitation of these CSI studies was a low sensitivity related to the use of the green light (514.5 nm) for excitation of red-absorbing MTX. As a consequence, the MTX concentrations used by Feofanov et al. during cell treatment had to be very high (5 to 10  $\mu\text{M}$ ).

We have performed CSI scanning of MTX-treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells by using resonance excitation with a red laser line (632.8 nm). Compared with the CSI method published previously (Feofanov et al., 1997a,b, 1999), increased selectivity and sensitivity of intracellular MTX detection were achieved. The present CSI study better respects cellular physiology, through a reduction of cell exposure to both drug concentration (0.5  $\mu\text{M}$ ) and laser radiation (30  $\mu\text{W}$  and 0.02 s/spectrum). Four intracellular species of MTX were thus identified and particular attention was paid to characterize the fluorescence of an oxidative metabolite of the drug.

We compared the intracellular distribution of the molecular species of MTX within two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231, and examined the influence of DHA supplementation on this distribution. Our aim was to take advantage of the differential sensitivity of these two breast cancer cell lines to MTX and DHA to get insights into the mechanisms responsible for chemosensitization.

### Materials and Methods

**Drugs and Chemicals.** Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Saint Quentin-Fallavier, France). Dilutions of mitoxantrone (Novantrone, 10 mg/5 ml; Sigma-Aldrich Chimie) were freshly prepared in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% heat-inactivated fetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Cambrex, Gennevilliers, France). *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) was used at 10 mM in DMEM medium. DHA (22:6n-3) methyl ester was used for this study. The fatty acid was dissolved in 99% ethanol and stored as stock solution (150 mM) under nitrogen at  $-80^\circ\text{C}$ . For all experiments, fatty acid was prepared freshly from stock solution and diluted with growth culture medium (final ethanol concentration: 0.02%). ER-Tracker Green, rhodamine 123, and 5 (and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

**Cell Culture.** The human breast carcinoma cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France). Cell lines were cultured in DMEM containing 5% heat-inactivated fetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. Cells were cultured at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed each 24 h.

**Drug Cytotoxicity.** Cells were seeded in standard 96-well plates ( $7 \times 10^3$  cells/well). One day after seeding, the culture medium was changed and replaced by medium containing different concentration of MTX ( $10^{-5}$  to 5  $\mu\text{M}$ ) with or without DHA (30  $\mu\text{M}$ ) during 7 days. Viability of cells were measured as a whole by the tetrazolium salt assay (Mosmann, 1983). Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h with the tetrazolium salt (3-[4,5-dimethylthia-

zol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and metabolically active cells reduced the dye to purple formazan. Formazan crystals were dissolved with dimethyl sulfoxide. Absorbance was measured at 570 nm using a multiwell plate reader (SpectraMax 190 model; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Dose-response curves were plotted as percentages of the control cell absorbance, which was obtained from control wells (without MTX treatment). These values were fitted to a sigmoidal dose-response model (GraphPad Prism; GraphPad Software Inc, San Diego, CA):  $Y = \min + (\max - \min)/(1 + 10^{\log \text{IC}_{50} - X})$ , where  $Y$  is viability (as a percentage),  $X$  is  $\log(\text{MTX concentration, micromolar})$ ,  $\min$  is minimum viability,  $\max$  is maximum viability, and  $\text{IC}_{50}$  is the concentration of MTX producing a 50% decrease of viability.

**Instrumental Setup for CSI.** Fluorescence measurements were carried out using a LabRam confocal microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) equipped with a low dispersion grating (300 grooves/mm) and with an automated X-Y-Z scanning stage. A color camera (Panasonic WV-CP454E) together with a VITEC video card provided a digitalized TV image of a sample illuminated with a white light source (phase-contrast optical view).

MTX fluorescence was excited with a 632.8 nm line of an internal, air-cooled, helium-neon laser. The power on the samples was  $\sim 30 \mu\text{W}$ , the acquisition time was 0.02 or 0.05 s/spectrum. Particular attention was paid to normalizing the measured signal on acquisition time as well as on instrumental response, using a Si plate and a fluorescein solution as the intensity standard. Sample irradiation and collection of fluorescence were performed through a 100 $\times$  microscope objective (numerical aperture 0.90; Olympus, Tokyo, Japan). The confocal hole aperture was adjusted to 100  $\mu\text{m}$  to obtain  $\sim 0.8 \mu\text{m}$  lateral and  $\sim 3.5 \mu\text{m}$  axial resolution. The spectral resolution was 1 nm.

**Performing CSI Mapping on Living Cells.** The breast cancer cells (treated with or without DHA during 7 days) were incubated with MTX (0.5  $\mu\text{M}$ ) for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5% CO<sub>2</sub>. When NAC (10 mM) was used, a preincubation (15 min) of the cells with NAC was performed before the incubation with MTX. Before CSI analysis, the medium containing drug was removed, and the cells were resuspended in fresh medium after two rinses with fresh medium (pH 7.4). A drop of this preparation was put on a microscope glass slide and covered with a thin coverslide. Isolated cells, selected for their apparently intact morphology, were analyzed individually.

To study the subcellular repartition of MTX, we used the two-dimensional mapping of an optical section at half-thickness of the cell. Cells were scanned within the  $x$ - $y$  plane with a fixed step of 0.8  $\mu\text{m}$  that provided maps containing typically  $\sim 900$  spectra ( $30 \times 30$  points). The acquisition time was less than 2 to 3 min per entire cell map. Both acquisition and treatment of multispectral maps were performed with LabSpec software.

**Generating Chemical Maps from Spectral Sets.** Subcellular drug repartition was studied via analysis of both intensity and shape of fluorescence spectra within CSI maps, as described previously (Sharonov et al., 1994; Feofanov et al., 1997b). Briefly, each experimental spectrum recorded in a confocal mode from a cell was fitted to a sum of four reference spectra of MTX taken with appropriate coefficients:  $F_{\text{Total}}(\lambda) = C_{\text{DNA}}F_{\text{DNA}}(\lambda) + C_{\text{cyt}}F_{\text{cyt}}(\lambda) + C_{\text{met}}F_{\text{met}}(\lambda) + C_{\text{Ip}}F_{\text{Ip}}(\lambda)$ , where  $F_{\text{DNA}}$ ,  $F_{\text{cyt}}$ ,  $F_{\text{met}}$ , and  $F_{\text{Ip}}$  are the fluorescence spectra of, respectively, the MTX-DNA complex, the cytosolic complex of native MTX, the cytosolic complex of metabolized MTX, and MTX in a low polarity environment, referred to a unitary intensity (Fig. 1). Each of these MTX species has a characteristic fluorescence spectral shape established by in vitro modeling. The values of  $C_{\text{DNA}}$ ,  $C_{\text{cyt}}$ ,  $C_{\text{Ip}}$ , and  $C_{\text{met}}$  are spectral contribution factors of the respective drug species. These factors could be converted into concentrations, once the fluorescence yield of each of the above fluorophores will be known.

The fitting results were optimized with the least-squares method. The fitting error was  $<5\%$  (typically 2–3%). The cellular autofluorescence was completely neglected, because of the absence of any significant fluorescence of the untreated cells under the conditions used.

The spectral contribution factors of each MTX species were used to generate the respective two-dimensional distribution map (thereafter referred to as a chemical map) over the cell. In this manner, four model-specific chemical maps were generated for each cell.

In view of significant cell-to-cell variations of the fluorescence intensity, each chemical map was brought to a relative intensity scale by normalizing all the spectra on the intensity of the most intense spectrum (typically that from

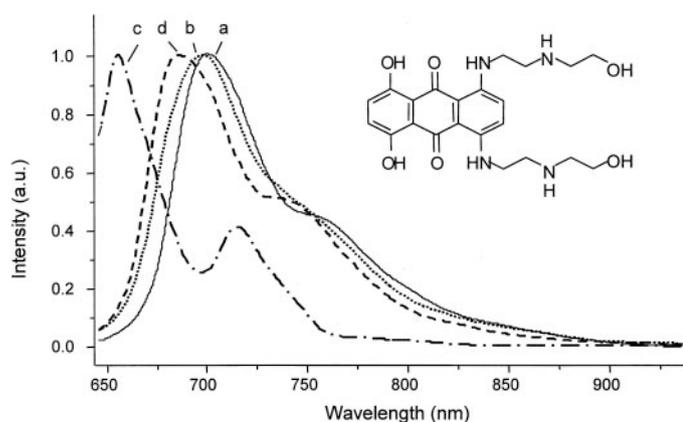


FIG. 1. Reference fluorescence spectra of intracellular MTX (chemical formula in the inset): a, MTX-DNA complex; b, cytosolic complex of native MTX; c, cytosolic complex of metabolized MTX; and d, MTX in a low polarity environment.

nucleoli). Thus, the chemical maps reflected qualitatively the repartition of the drug within subcellular compartments.

**Quantification of MTX Cellular Accumulation and Distribution.** Two kinds of quantitative information were extracted from analysis of each map-average spectrum: First, fluorescence intensity (expressed in arbitrary units, thereafter called fluorescence level) in the spectral region between 645 and 935 nm was considered to be representative of overall intracellular MTX accumulation, and second, the average spectrum was fitted to a sum of four reference MTX spectra described above. The contribution factors obtained were interpreted as cell-average relative contents (fluorescence levels) of the specific drug species. The results were averaged over 16 to 23 cells for each kind of treatment.

**Colocalization of MTX Oxidative Metabolite with Cellular Organelles.** We labeled endoplasmic reticulum and mitochondria using two organelle-specific fluorophores, ER-Tracker Green and rhodamine 123, respectively. MDA-MB-231 cells, treated for 1 h with 0.5  $\mu\text{M}$  MTX and washed in phosphate-buffered saline, were incubated for 20 min with 0.5  $\mu\text{M}$  ER-Tracker Green or 1  $\mu\text{M}$  rhodamine 123. Colocalization studies were performed using a 488 nm line of an  $\text{Ar}^+$  laser. The estimated laser power at the sample was  $\sim 20 \mu\text{W}$ . The fluorescence spectra were recorded with an acquisition time of 1 s/spectrum. The CSI spectral maps were generated as described above.

**Measurement of ROS.** Cells were cultured in 9  $\text{cm}^2$  multiwell plates and treated with MTX at  $\text{IC}_{50}$  during 7 days. Cells were washed twice with Hanks-Hepes solution (pH 7.3, 37°C) and then incubated during 30 min with 10  $\mu\text{M}$  CM-H<sub>2</sub>DCFDA in the dark at 37°C. CM-H<sub>2</sub>DCFDA is an indicator for reactive oxygen species (hydrogen peroxide and hydroxy and peroxy radicals). Then, cells were washed twice with cold Hanks-Hepes (pH 7.3, 4°C) solution and sonicated in 1 ml of distilled water (4°C). Whole cells lysates were centrifuged (10,000g for 5 min at 4°C) and fluorescence intensities were measured on supernatants at 522 nm (excitation wavelength: 480 nm) with a Hitachi F-2500 spectrofluorimeter. For each supernatant, protein concentration was measured with BCA kit (Uptima; Interchim, Montluçon, France), and the normalized fluorescence (arbitrary units of fluorescence per milligram of protein) was calculated.

**Statistics.** Statistical analysis was carried out using Student's unpaired *t* test, one-way analysis of variance, and Newman-Keuls multiple comparison tests (GraphPad Prism);  $p < 0.05$  was regarded as significant.

## Results

**MTX Cytotoxicity.** Breast cancer cells were cultured for 7 days in a medium supplemented with MTX at concentrations ranging from  $10^{-5}$  to 5  $\mu\text{M}$ , without (control) or with 30  $\mu\text{M}$  DHA. DHA at 30  $\mu\text{M}$  was not toxic (trypan blue exclusion, data not shown).

In control conditions (absence of DHA),  $\text{IC}_{50}$  concentrations of MTX were different in the two cell lines ( $18 \pm 6$  nM for MDA-MB-231 and  $196 \pm 70$  nM for MCF-7). Figure 2 shows the corresponding dose-response curves. Supplementation of MCF-7 cells with DHA did

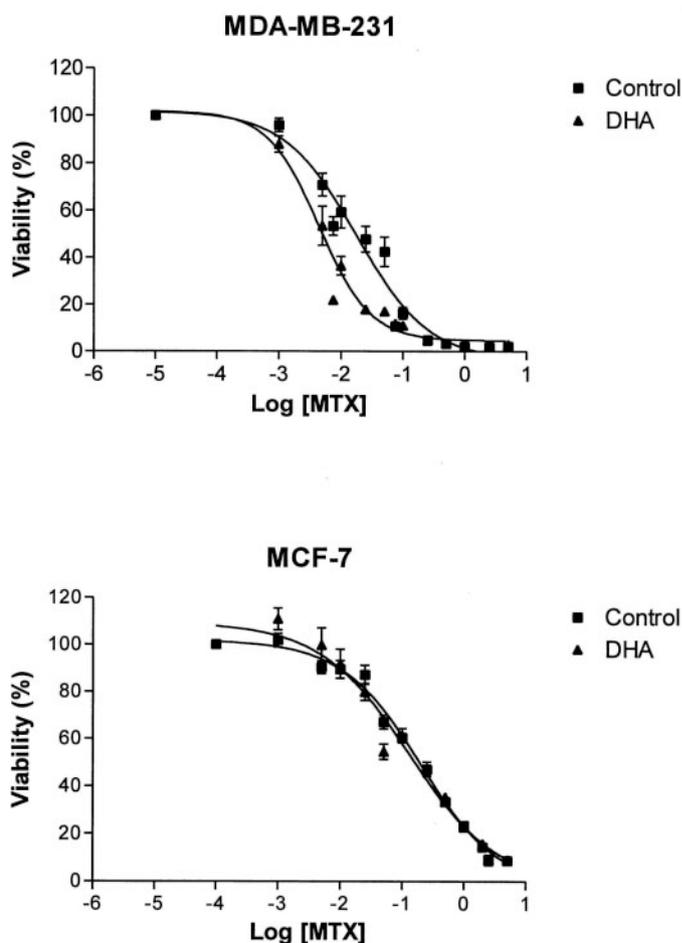


FIG. 2. Dose-response curve of MTX in the absence (■) or in the presence (▲) of 30  $\mu\text{M}$  DHA. Breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) were grown for 7 days with a specified concentration of MTX (in a micromolar concentration) without or with 30  $\mu\text{M}$  DHA. Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium method (see *Materials and Methods*). Shown are fitted curves and means  $\pm$  S.E. from six separate experiments in which triplicate measurements were made. Absent error bars indicate that errors fell within symbol.

not modify MTX cytotoxicity significantly:  $\text{IC}_{50} = 128 \pm 74$  nM versus  $196 \pm 70$  nM in supplemented versus no supplemented cells, respectively ( $p > 0.05$ ). In contrast, in MDA-MB-231 cells, DHA supplementation led to an increase in MTX toxicity at concentrations between  $10^{-1}$  and  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ :  $\text{IC}_{50}$  shifted from  $18 \pm 6$  to  $4 \pm 1$  nM. This 4.5-fold enhancement of MTX cytotoxicity by DHA was statistically significant ( $p < 0.001$ ). Cell viability experiments were also performed in the presence of the antioxidant NAC. Control or DHA-supplemented MDA-MB-231 cells were treated with MTX at several concentrations ranging from 10 to 40 nM in the presence of NAC. Addition of NAC (10  $\mu\text{M}$  for 7 days) suppressed the enhancing effect of DHA on cell sensitivity to MTX, as cell viability remained unchanged between control and DHA-supplemented cells upon treatment with MTX.

**Overall Accumulation and Chemicals Maps of MTX Subcellular Distribution.** The results on overall drug accumulation in the two cell lines are presented in Table 1. In control conditions, the overall drug fluorescence level in MDA-MB-231 cells was 2.5-fold lower than that in MCF-7 cells. DHA supplementation led to a 1.5-fold increase in overall MTX accumulation ( $p < 0.001$ ) in MDA-MB-231 cells, whereas no significant change was observed in MCF-7 cells.

At a single-cell level, the most intense fluorescence was found in nucleoli (intensity of 100%) and in nucleus (intensity of 50–70%).

TABLE 1

*Fluorescence levels of intracellular MTX in the two breast cancer cell lines*

Cells were treated or not with 30  $\mu\text{M}$  DHA during 7 days, then incubated during 1 h with MTX (0.5  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  S.D. of 16 to 23 values.

|         | MCF-7              | MDA-MB-231          |
|---------|--------------------|---------------------|
|         | <i>a.u.</i>        |                     |
| Control | 38,974 $\pm$ 6276  | 15,827 $\pm$ 1746   |
| DHA     | 38,833 $\pm$ 4418* | 23,567 $\pm$ 3627** |

Unpaired *t* test (not significant: \**P* > 0.05; significant: \*\**P* < 0.001).

The intensity observed in cytosol was between 20 and 40%. It was about 10% in the cell periphery (membrane).

Because of the possibility of spectral analysis of intracellular fluorescence inherent in the CSI approach, four specific maps characteristic of molecular environment/species of MTX were generated in each cell (Fig. 3A). The maps of MTX-DNA fluorescence had nuclear localization. DHA treatment did not induce any change in these maps. Fluorescence of the MTX metabolite typically had a strong perinuclear spot and a weaker diffusion within the cytosol. The metabolite maps were larger and more intense in MDA-MB-231 than in MCF-7 cells. DHA supplementation resulted in a strong increase of the metabolite fluorescence in both cell lines. In contrast, this increase was inhibited in the cells treated with NAC antioxidant. The cytosolic complex of native MTX was distributed all over the cytosol. This

staining was different in the two cell lines: homogeneous in MCF-7 cells and with multiple spot distribution in MDA-MB-231 cells. Supplementation with DHA led to a decrease in the level of the native MTX cytosolic complex, particularly in MDA-MB-231 cells. Maps of MTX in a low polarity environment fitted cellular contours (plasmic membranes) as well as several perinuclear spots (intracellular membranes). After DHA supplementation, this staining was reduced, mainly in intracellular membranes.

**Colocalization of Specific Species of MTX.** Deconvolutions of spectra from nuclear region corresponded to a 100% contribution of characteristic fluorescence assigned to MTX-DNA complexes. In contrast to the nuclear fluorescence, the spectra from other cellular regions were decomposed into variable contributions of two or three reference spectra, thus indicating colocalization of corresponding molecular species of MTX (Fig. 3B). Spectra from the intense perinuclear regions were particularly mixed, as they corresponded to the spectrum of the cytosolic complex of native MTX enriched with the fluorescence of the complex of the metabolized MTX and complemented the spectrum characteristic of MTX in a low polarity environment (intracellular membranes). This finding is illustrated by the certain similarity of the respective maps seen in Fig. 3A, with all having bright spots in the perinuclear regions. The colocalization was confirmed after superposition of the respective maps encoded in pseudo-colors (Fig. 3B): the

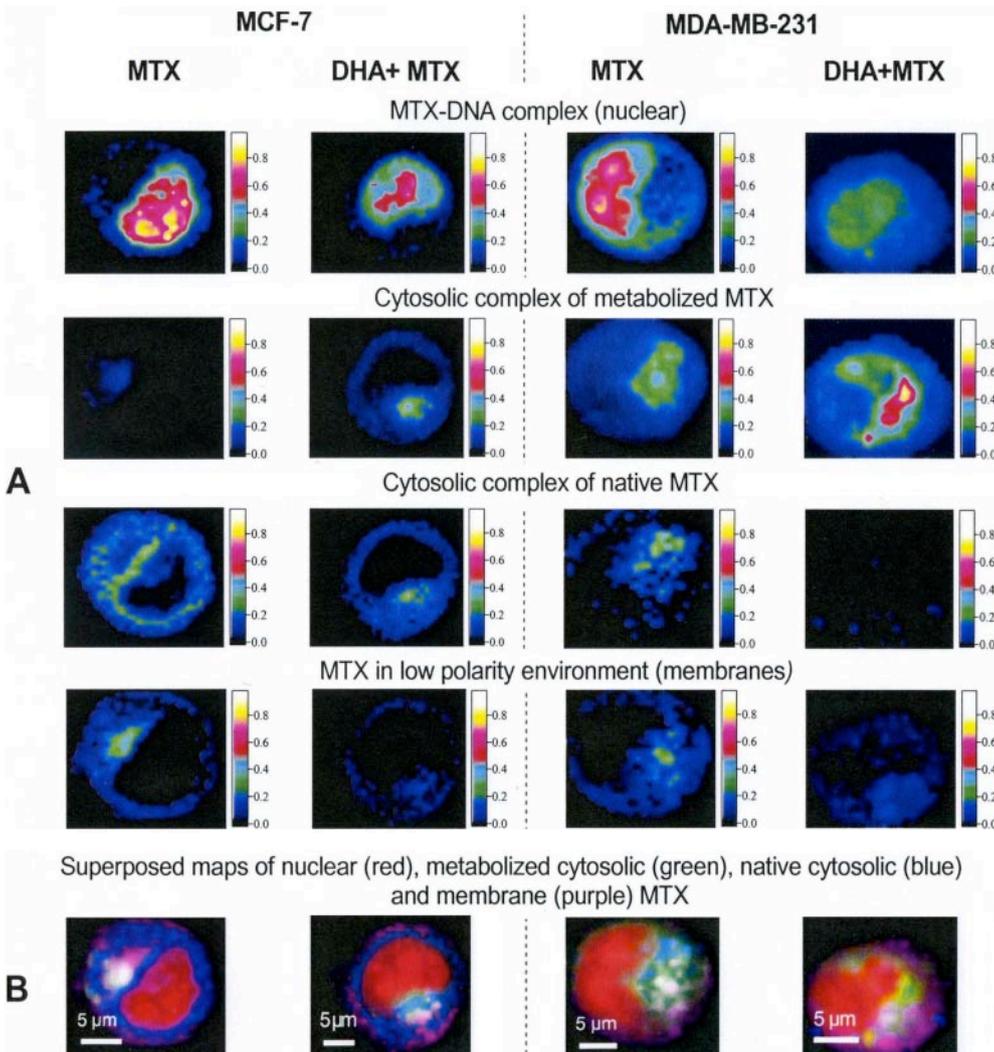


FIG. 3. Typical maps of relative subcellular distribution of MTX in MCF-7 (left panel) or MDA-MB-231 (right panel). Cells were supplemented or not with 30  $\mu\text{M}$  DHA for 7 days and then were incubated with 0.5  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h. A, subcellular distribution of MTX species. The relative intensity scale of the maps (heat intensity color code) was obtained by normalizing on the most intense spectrum in each cell. B, superposition of the maps using an extended intensity scale for colocalization and encoded with pseudo colors.

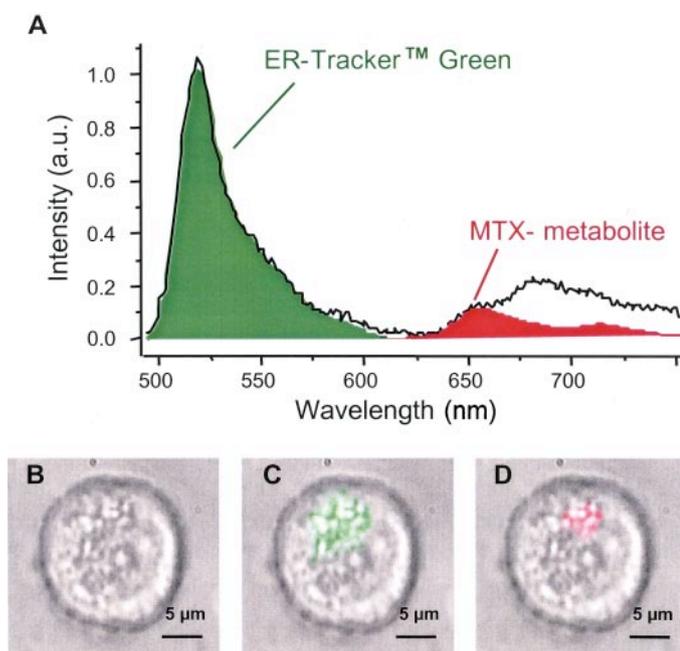


FIG. 4. Colocalization of the oxidative MTX metabolite with endoplasmic reticulum within MDA-MB-231 cells ( $n = 10$ ). A, the fluorescence spectrum from cytosol (black curve) contains the green emission of ER-Tracker Green together with the red emission of the MTX metabolite. B to D, video capture of a cell (B) merged with fluorescence of ER-Tracker Green (C) and of MTX oxidative metabolite (D).

white perinuclear spots correspond to a mixture of three colors, i.e., of three species, indicating that the cytosolic complex of metabolized MTX is located in perinuclear regions enriched with membranes.

To check a possible assignment of these regions to cellular organelles such as mitochondria or endoplasmic reticulum, we stained the MDA-MB-231 cells with rhodamine 123 and ER-Tracker Green, respectively. The excitation wavelength of 488 nm was used, because it was optimal for ER-Tracker Green and rhodamine 123 (emission maxima at 517 and 540 nm, respectively) and was still suitable to detect the MTX metabolite. According to the CSI data, the metabolite fluorescence was colocalized with the fluorescence of ER-Tracker Green (Fig. 4) but not with the fluorescence of rhodamine 123 (data not shown).

**Cell-Average Intracellular Content of the Specific Species of MTX.** Average fluorescence levels corresponding to the four specific species of MTX are shown in Fig. 5. This figure provides quantitative evidence that the subcellular repartition of MTX is cell line-dependent.

The relative fraction of MTX bound to DNA was similar in both cell lines ( $\sim 50\%$  of the overall intracellular drug fluorescence). Quantitatively, the maximum fluorescence level (MTX-DNA) was nearly 2-fold higher in MCF-7 than in MDA-MB-231 cells. In both cell lines, DHA supplementation did not significantly change the relative contribution of the MTX-DNA complex to the intracellular drug fluorescence.

The MTX level in cytosol (native plus metabolized MTX) was higher in MCF-7 cells ( $18,890 \pm 889$  a.u.) than in MDA-MB-231 cells ( $4452 \pm 603$  a.u.). In contrast, the proportion of the MTX-metabolite in cytosol was much higher in MDA-MB-231 cells ( $60.4 \pm 6.2\%$ ) than in MCF-7 cells ( $7.7 \pm 1.9\%$ ). After DHA supplementation, the cytosolic content of MTX increased (to  $10,157 \pm 768$  a.u.) in MDA-MB-231 but not in MCF-7 cells. The proportion of the metabolite increased up to  $94.2 \pm 2.6\%$  in MDA-MB-231 cells and to

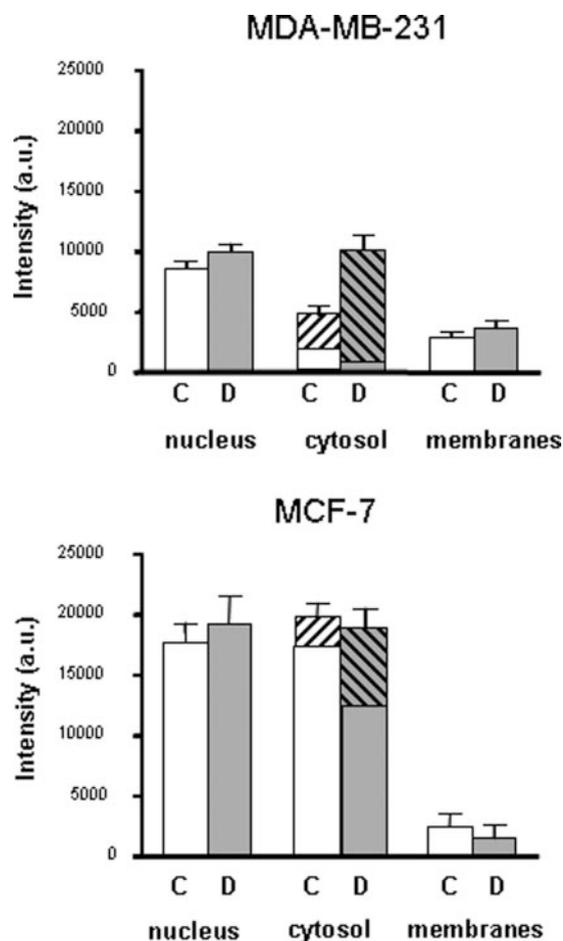


FIG. 5. Average fluorescence levels in arbitrary units of the four species of MTX, in the two breast cancer cell lines supplemented for 7 days without ( $\square$ ) or with  $30 \mu\text{M}$  DHA ( $\blacksquare$ ).  $\square$  and  $\blacksquare$ , MTX metabolite. Data are means  $\pm$  S.D. of 16 to 23 cells.

$31.6 \pm 2.3\%$  in MCF-7 cells. When cells were pretreated for 15 min with the antioxidant NAC, the enhancement of the metabolized MTX fraction by DHA was no longer observed. This indicates that the metabolite may be related to oxidative metabolism of the drug.

The fluorescence level of MTX in a low polarity environment (membranes) was similar in both cell lines ( $\sim 2600$  a.u.). DHA supplementation had no significant effect on the fluorescence levels observed in these compartments.

**ROS Levels.** The ROS levels were similar in both cell lines ( $1689 \pm 117$  a.u./mg of protein in MDA-MB-231 cells and  $1663 \pm 95$  a.u./mg of protein in MCF-7 cells). These levels were not modified either by DHA supplementation or MTX treatment. An 1.3-fold increase ( $p < 0,001$ ) in the ROS level was observed with MTX treatment in DHA-supplemented MDA-MB-231 but not in MCF-7 cells.

## Discussion

The above results demonstrate for the first time an association between the chemosensitization of a breast cancer cell line and the cellular distribution and metabolism of an anticancer agent. To achieve this conclusion, we used an experimental system involving two human breast cancer cell lines with a differential sensitivity to several drugs (Mahéo et al., 2005). Cytotoxicity data indicated that, under control conditions, the  $\text{IC}_{50}$  was about 10-fold higher and the overall drug intracellular concentration was 2.5-fold higher in MCF-7 than in MDA-MB-231 cells, showing that the MCF-7 cell line is less

sensitive to MTX that the MDA-MB-231 cell line. We took advantage of the differential chemosensitivity of the two breast cancer cell lines to examine the contribution of drug subcellular distribution to this phenomenon. Confocal spectral imaging provided the opportunity to address the subcellular distribution of the anticancer drug according to its molecular interaction within cellular compartments.

In agreement with the main mechanism of action of MTX, i.e., inhibition of the nuclear enzyme topoisomerase II, nuclear drug staining (MTX-DNA fraction) was dominant in both cell lines. However, the higher level of MTX-DNA complexes in the less-sensitive MCF-7 cell line suggests that cell sensitivity to MTX is not a direct consequence of the nuclear accumulation of the drug. Indeed, the repartition and metabolism of the drug in the cytosolic compartment were significantly different between the two cell lines. The staining of the cytosolic complex of native MTX was less intense and less homogeneous in MDA-MB-231 than in MCF-7 cells. Special attention should be paid to the metabolite fluorescence, as it was particularly intense in MDA-MB-231 cells. As indicated by the CSI maps, the metabolite was mainly concentrated in perinuclear areas rich in membranes. These areas were not assignable to mitochondria, because they were not colocalized with staining of a mitochondrial fluorescent marker, rhodamine 123. The oxidative pathway of this metabolism was indicated by its inhibition after pretreatment of the cells with NAC antioxidant. In view of this finding, the most likely assignment of the organelles responsible for MTX metabolism is endoplasmic reticulum, rich in oxidation phase I enzymes. This hypothesis was supported by colocalization of this metabolite fluorescence with emission of ER-Tracker Green, an endoplasmic reticulum probe.

The observation that MDA-MB-231 but not MCF-7 cells are chemosensitizable by DHA, a peroxidizable polyunsaturated fatty acid, provided the opportunity to examine the involvement of MTX localization or metabolism in chemosensitivity. DHA enhanced the sensitivity of MDA-MB-231 cells to MTX, whereas it had no effect on MCF-7 cells. CSI data showed that DHA increased MTX accumulation in MDA-MB-231 but not in MCF-7 cells. This accumulation occurred in cytosol and was assigned to metabolized MTX, suggesting a role for this metabolism in DHA-enhanced MTX activity.

Reska et al. (1986) indicated that MTX and related molecules are easily subject to oxidative enzymatic action., (1986). Enzymatic oxidation of MTX by peroxidase in the presence of hydrogen peroxide led to a cyclic metabolite (Kolodziejczyk et al., 1988; Bruck and Harvey, 2003). In our study, the observed metabolite had a fluorescence emission maximum at 654 nm, similarly to the one described by Feofanov et al. (1997a) and supposed by these authors to be a cyclic metabolite. However, the fluorescence spectrum does not provide sufficient structural specificity to assign the emission to an exact chemical formula. Identification of the exact metabolite structure should be a subject of further studies using structurally specific analytical techniques such as vibrational spectroscopy, nuclear magnetic resonance, and mass spectrometry. Therefore, we conclude that the metabolite detected in the present study was a fluorescent molecule originating from MTX oxidation within cancer cells. Isolation of the metabolite and identification of its structure would allow evaluation of its direct cytotoxicity.

Brück and Harvey (2003) have reported that highly oxidized MTX metabolites form covalent complexes with DNA to inhibit DNA replication enzymes and may contribute to the cytotoxic effects of the drug (Panousis et al., 1995, 1997). However, we can note that in our conditions, there was no detectable staining of the metabolite in the nucleus. As an alternative to direct nuclear action of the metabolite, we hypothesize that it could contribute to chemosensitivity by influencing the oxidative status of cells. Indeed, it was shown that the

peroxidative conversion of MTX is accompanied by formation of free radical species (Kolodziejczyk et al., 1988). However, in the present study, MTX treatment of both cell lines did not lead to an increase in ROS as measured with CM-H<sub>2</sub>DCFDA. In contrast, ROS levels were increased by MTX in DHA-supplemented MDA-MB-231 cells.

The polyunsaturated fatty acid DHA, with its six double bonds, is very prone to oxidation and therefore provides abundant targets for ROS. We demonstrated previously that DHA supplementation leads to high lipid peroxidation in MDA-MB-231 cells and to moderate lipid peroxidation in MCF-7 cells (Mahéo et al., 2005). This is in accordance with our current observation of a high concentration of an oxidized MTX metabolite in MDA-MB-231 cells and a low concentration of the metabolite in MCF-7 cells. Products of lipid peroxidation such as hydroperoxides and aldehydes have been implicated in cytotoxic process and increase drug efficacy (Das, 2002; Stoll, 2002; Dianzani, 2003). This might explain why NAC inhibited the DHA-induced enhancement of MTX toxicity in MDA-MB-231 cells. Thus, conditions favoring increased lipid peroxidation in response to MTX would lead to higher activity of the drug. Further studies of enzymes responsible for MTX metabolism should provide complementary knowledge on the different sensitivities of cancer cell lines to antitumor agents, which are necessary for exploration of new therapeutic perspectives.

## References

- Bell DH (1988) Characterization of the fluorescence of the antitumor agent, mitoxantrone. *Biochim Biophys Acta* **949**:132–137.
- Bruck TB and Harvey PJ (2003) Oxidation of mitoxantrone by lactoperoxidase. *Biochim Biophys Acta* **1649**:154–163.
- Burns CP, Haugstad BN, Mossman CJ, North JA, and Ingraham LM (1988a) Membrane lipid alteration: effect on cellular uptake of mitoxantrone. *Lipids* **23**:393–397.
- Burns CP and North JA (1986) Adriamycin transport and sensitivity in fatty acid-modified leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* **888**:10–17.
- Burns CP, North JA, Petersen ES, and Ingraham LM (1988b) Subcellular distribution of doxorubicin: comparison of fatty acid-modified and unmodified cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **188**:455–460.
- Colas S, Germain E, Arab K, Mahéo K, Goupille C, and Bougnoux P (2005)  $\alpha$ -Tocopherol suppresses mammary tumor sensitivity to anthracyclines in fish oil-fed rats. *Nutr Cancer* **51**:178–183.
- Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, Le Floch O, Ogilvie G, and Bougnoux P (2004) Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer* **109**:449–454.
- Consoli U, Van NT, Neamati N, Mahadevia R, Beran M, Zhao S, and Andreeff M (1997) Cellular pharmacology of mitoxantrone in P-glycoprotein-positive and -negative human myeloid leukemic cell lines. *Leukemia* **11**:2066–2074.
- Das U (2002) A radical approach to cancer. *Med Sci Monit* **8**:RA79–92.
- Das UN (1999) Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* **61**:157–163.
- Dianzani MU (2003) 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med* **24**:263–272.
- Feofanov A, Sharonov S, Fleury F, Kudelina I, Jardillier JC, and Nabiev I (1999) Confocal spectral imaging analysis of intracellular interactions of mitoxantrone at different phases of the cell cycle. *Anticancer Res* **19**:5341–5348.
- Feofanov A, Sharonov S, Fleury F, Kudelina I, and Nabiev I (1997a) Quantitative confocal spectral imaging analysis of mitoxantrone within living K562 cells: intracellular accumulation and distribution of monomers, aggregates, naphthoquinoline metabolite, and drug-target complexes. *Biophys J* **73**:3328–3336.
- Feofanov A, Sharonov S, Kudelina I, Fleury F, and Nabiev I (1997b) Localization and molecular interactions of mitoxantrone within living K562 cells as probed by confocal spectral imaging analysis. *Biophys J* **73**:3317–3327.
- Fox ME and Smith PJ (1995) Subcellular localisation of the antitumour drug mitoxantrone and the induction of DNA damage in resistant and sensitive human colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**:403–410.
- Germain E, Chajes V, Cognault S, Lhuillery C, and Bougnoux P (1998) Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer* **75**:578–583.
- Germain E, Lavandier F, Chajes V, Schubnel V, Bonnet P, Lhuillery C, and Bougnoux P (1999) Dietary *n*-3 polyunsaturated fatty acids and oxidants increase rat mammary tumor sensitivity to epirubicin without change in cardiac toxicity. *Lipids* **34** (Suppl):S203.
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **57**:727–741.
- Hazlehurst LA, Foley NE, Gleason-Guzman MC, Hacker MP, Cress AE, Greenberger LW, De Jong MC, and Dalton WS (1999) Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line. *Cancer Res* **59**:1021–1028.
- Kellner U, Hutchinson L, Seidel A, Lage H, Danks MK, Dietel M, and Kaufmann SH (1997) Decreased drug accumulation in a mitoxantrone-resistant gastric carcinoma cell line in the absence of P-glycoprotein. *Int J Cancer* **71**:817–824.

- Kolodziejczyk P, Reszka K, and Lown JW (1988) Enzymatic oxidative activation and transformation of the antitumor agent mitoxantrone. *Free Radic Biol Med* **5**:13–25.
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, and Bates SE (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* **113** (Pt 11):2011–2021.
- Mahéo K, Vibet S, Steghens JP, Dartigeas C, Lehman M, Bougnoux P, and Goré J (2005) Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radic Biol Med* **39**:742–751.
- Menendez JA, Lupu R, and Colomer R (2005) Exogenous supplementation with  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA;22:6N-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev* **14**:263–270.
- Menendez JA, Ropero S, Lupu R, and Colomer R (2004)  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid  $\gamma$ -linolenic acid (18:3n-6) enhances docetaxel (Taxotere) cytotoxicity in human breast carcinoma cells: relationship to lipid peroxidation and HER-2/neu expression. *Oncol Rep* **11**:1241–1252.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55–63.
- Novak RF and Kharasch ED (1985) Mitoxantrone: propensity for free radical formation and lipid peroxidation—implications for cardiotoxicity. *Invest New Drugs* **3**:95–99.
- Panousis C, Kettle AJ, and Phillips DR (1995) Myeloperoxidase oxidizes mitoxantrone to metabolites which bind covalently to DNA and RNA. *Anticancer Drug Des* **10**:593–605.
- Panousis C, Kettle AJ, and Phillips DR (1997) Neutrophil-mediated activation of mitoxantrone to metabolites which form adducts with DNA. *Cancer Lett* **113**:173–178.
- Reszka K, Kolodziejczyk P, and Lown JW (1986) Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of mitoxantrone: spectrophotometric and electron paramagnetic resonance studies. *J Free Radic Biol Med* **2**:25–32.
- Rose DP and Connolly JM (1999)  $\omega$ -3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* **83**:217–244.
- Shao Y, Pardini L, and Pardini RS (1995) Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids* **30**:1035–1045.
- Sharonov S, Chourpa I, Morjani H, Nabiev I, Manfait M, and Feofanov A (1994) Confocal spectral imaging analysis in studies of the spatial distribution of antitumor drugs within living cancer cells. *Anal Chim Acta* **290**:40–47.
- Smith PJ, Desnoyers R, Blunt N, Giles Y, Patterson LH, and Watson JV (1997) Flow cytometric analysis and confocal imaging of anticancer alkylaminoanthraquinones and their N-oxides in intact human cells using 647-nm krypton laser excitation. *Cytometry* **27**:43–53.
- Smith PJ, Sykes HR, Fox ME, and Furlong IJ (1992) Subcellular distribution of the anticancer drug mitoxantrone in human and drug-resistant murine cells analyzed by flow cytometry and confocal microscopy and its relationship to the induction of DNA damage. *Cancer Res* **52**:4000–4008.
- Spector AA and Burns CP (1987) Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res* **47**:4529–4537.
- Stoll BA (2002) N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr* **87**:193–198.

---

**Address correspondence to:** Dr. Igor Chourpa, Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge, 37100 Tours, France. E-mail: chourpa@univ-tours.fr

---



## **Augmentation par le DHA de la sensibilité aux anthracyclines de cellules tumorales mammaires humaines et de tumeurs mammaires de rates via une modification du statut oxydant des cellules tumorales**

### **.A Introduction**

Lors d'études sur l'analyse des acides gras du tissu adipeux de patientes atteintes de cancer du sein (reflétant les apports en acides gras de l'alimentation passée), il a été montré que la présence d'acides gras polyinsaturés n-3, notamment d'acide docosahexaénoïque (22:6n-3, DHA) améliore la réponse des tumeurs à la chimiothérapie <sup>323</sup>. Les acides gras polyinsaturés sont hautement peroxydables, et les produits de peroxydation lipidique ont des effets délétères sur les cellules. Certains traitements anticancéreux comme les chimiothérapies à base d'anthracyclines ou la radiothérapie sont connues pour majorer le stress oxydant. De ce fait, l'hypothèse d'un effet sensibilisant des acides gras n-3 aux anthracyclines ou à la radiothérapie dans la réponse des tumeurs mammaires a été explorée.

Dans une précédente étude menée *in vitro*, il a été montré qu'une supplémentation en AGPI n-3 du milieu de culture de cellules tumorales mammaires humaines MDA-MB-231 est capable d'augmenter la sensibilité aux anthracyclines (chimiosensibilisation) <sup>324</sup>. De plus parmi les AGPI n-3 testés, le DHA est le plus efficace pour augmenter la sensibilité des MDA-MB-231 à la doxorubicine.

De plus cet effet chimiosensibilisant du DHA est aboli en présence de molécules anti-oxydantes et augmenté en présence de molécules pro-oxydantes. Des résultats *in vivo* sur un modèle de carcinogenèse mammaire chimioinduite chez la rate sont venus confirmer les données *in vitro* puisque l'augmentation de la réponse thérapeutique des tumeurs mammaires à une chimiothérapie à base d'anthracycline (l'épirubicine) <sup>325</sup> ou à la radiothérapie <sup>326</sup>, a également été obtenue après enrichissement de l'alimentation en DHA. L'annulation de l'action chimiosensibilisante du DHA par l'addition d'un anti-oxydant, la vitamine E, dans le régime alimentaire suggère là aussi, que le stress oxydant pourrait être impliqué dans l'effet du DHA.

Notre hypothèse est que l'incorporation du DHA au niveau des membranes des cellules tumorales augmente la quantité des AG qui peuvent être attaqués par les ERO. Le DHA peut ainsi rendre les cellules plus sensibles aux agents anticancéreux générant des radicaux libres en augmentant la peroxydation lipidique (hautement délétère pour la cellule). La peroxydation lipidique est redoutable parce qu'elle se propage au niveau de la membrane et parce qu'elle conduit à la formation d'aldéhydes, comme le malondialdéhyde ou le 4-hydroxynonéal. Ces aldéhydes sont stables et présentent une forte réactivité vis-à-vis de biomolécules telles que les protéines, l'ADN et les phospholipides. Si la cellule n'est pas dotée d'un système anti-oxydant efficace pour lutter contre les

<sup>323</sup> Bougnoux P. Lipids. 1999. PMID: 10419111.

<sup>324</sup> Germain E. Int J Cancer. 1998. PMID : 9466659.

<sup>325</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.

<sup>326</sup> Colas S. Int J Cancer. 2004. PMID: 14961586.

ERO ou les peroxydes lipidiques, l'amplification de ce phénomène délétère pour la cellule est hautement cytotoxique.

Nous avons donc mesuré les acteurs du statut oxydant cellulaire lors de suppléments en DHA associé à un traitement aux anthracyclines à savoir : un marqueur de peroxydation lipidique, l'activité des enzymes antioxydantes, et les niveaux d'ERO et ceci dans les deux lignées tumorales mammaires humaines présentées précédemment : MDA-MB-231 et MCF-7.

## **.B Matériel et méthodes**

La notion de stress oxydant peut être la conséquence d'une augmentation des ERO ou d'une diminution des systèmes anti-oxydant, mais pas seulement ... En effet, si seule la SOD voit son activité augmenter sans que la CAT ne soit modifiée, il y a alors accumulation de peroxyde d'hydrogène non détoxifié capable de produire des radicaux hydroxyle. Dans ce système complexe d'équilibres d'oxydo-réduction, il est donc nécessaire de doser plusieurs acteurs pour avoir un reflet du réel statut oxydant cellulaire :

- des marqueurs d'ERO
- des marqueurs des systèmes anti-oxydants
- des marqueurs des dommages créés par l'attaque des ERO sur les cibles moléculaires (marqueurs de peroxydation lipidique par exemple).

*Tous les dosages ont été effectués au laboratoire, exceptés les dosages des enzymes de synthèse du glutathion, du glutathion, et du sélénium dans le milieu de culture qui ont été réalisés par le Pr JP Steghens (Hôpital E. Herriot, Lyon).*

*Les méthodologies sont exposées dans les articles.*

## **.C Résumé des principaux résultats**

La chimiosensibilisation par le DHA diffère selon les lignées tumorales mammaires humaines et dépend du niveau de peroxydation lipidique. En effet la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 est sensibilisée par le DHA à la doxorubicine ( $IC_{50}doxo = 11,8$  nM versus 3,8 nM en présence de DHA) alors que la lignée MCF-7 ne l'est pas ( $IC_{50}doxo = 111$  nM versus 93 nM en présence de DHA). Cette augmentation de la sensibilité des cellules est associée à une augmentation des produits de peroxydation lipidique. La peroxydation est la conséquence de l'attaque des acides gras polyinsaturés, tel que le DHA par les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Le dosage des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène a montré une augmentation des ERO en présence de doxorubicine dans les deux types cellulaires. Cette production d'ERO n'est majorée par une supplémentation en DHA que dans les cellules MDA-MB-231. Cette différence de niveaux d'ERO lors d'une supplémentation en DHA entre les deux lignées suggère des équipements de défense anti-oxydants différents.

L'activité enzymatique des principales enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion réductase, la gamma glutamine synthétase, et la GPx ont été dosées dans les deux lignées cellulaires. Les enzymes anti-oxydantes sont induites par un co-traitement DHA/doxorubicine dans les deux lignées cellulaires sauf la GPx. En effet cette enzyme voit son activité

augmenter dans les MCF-7 de 10 fois et diminuer dans les MDA-MB-231 de 2,5 fois. La diminution de cette enzyme de détoxification majeure peut expliquer la plus grande sensibilité des cellules MDA-MB-231 à la doxorubicine, et indique que l'équipement anti-oxydant performant des MCF-7 leur permet de mieux résister à la doxorubicine en présence de DHA. Des mesures de cinétique enzymatique ont montré une diminution de l'activité maximale de la GPx par le DHA alors que l'affinité de l'enzyme pour son substrat n'est pas modifiée, ce qui suggère une diminution de la quantité d'enzyme. Ce résultat est confirmé par une étude de Western Blot qui a montré une diminution de la GPx en condition DHA/doxorubicine en comparaison à la condition doxorubicine seule. En revanche les taux d'ARNm mesuré en PCR quantitative en temps réel, ne sont pas modifiés. Ceci indique que la régulation des niveaux de GPx par le DHA se ferait au niveau post-transcriptionnel. De plus nous avons vérifié que cette diminution d'activité n'est pas liée à des concentrations insuffisantes en sélénium, puisque la mesure de la concentration en sélénium du milieu de culture est de 155 nM. De plus une supplémentation en sélénium (+ 30 nM) de ce milieu de culture ne modifie pas les résultats d'activité GPx observés.

*In vitro*, la diminution de la GPx par le DHA paraît donc liée à une sensibilité accrue des cellules à un stress oxydant généré par la doxorubicine. *In vivo* l'augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires de rates à l'épirubicine par l'enrichissement du régime alimentaire en DHA est associée à une diminution de l'activité de la GPx. De plus, lorsqu'un anti-oxydant, la vitamine E, est ajouté dans le régime DHA, l'effet de ce régime sur la réponse tumorale est aboli et ceci est associé à une augmentation des niveaux de GPx. Il existe une corrélation ( $r^2 = 0.488$ ) entre le niveau d'activité de la GPx dans les tumeurs et la régression tumorale en réponse à une chimiothérapie. Ainsi l'incorporation membranaire du DHA, lipide hautement peroxydable, et la perte d'une réponse GPx appropriée participerait à augmenter la sensibilité des cellules tumorales sensibilité à des agents anticancéreux générant des ERO.

## **.D Conclusion**

En conclusion, nous avons montré que l'amélioration de la réponse à l'épirubicine *in vivo* et est corrélée à une diminution des taux d'activité GPx. L'activité GPx paraît donc être une enzyme clé dans la réponse des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux. *In vitro*, les mécanismes expliquant la défaillance de la GPx dans les cellules MDA-MB-231 restent à être explorés. Qu'est ce qui différencie la lignée MDA-MB-231 de la lignée MCF-7 et qui pourrait expliquer que cette dérégulation de la GPx soit observée uniquement dans les cellules MDA-MB-231 ? Les différences entre les différentes lignées sont rappelées **Figure 52**.

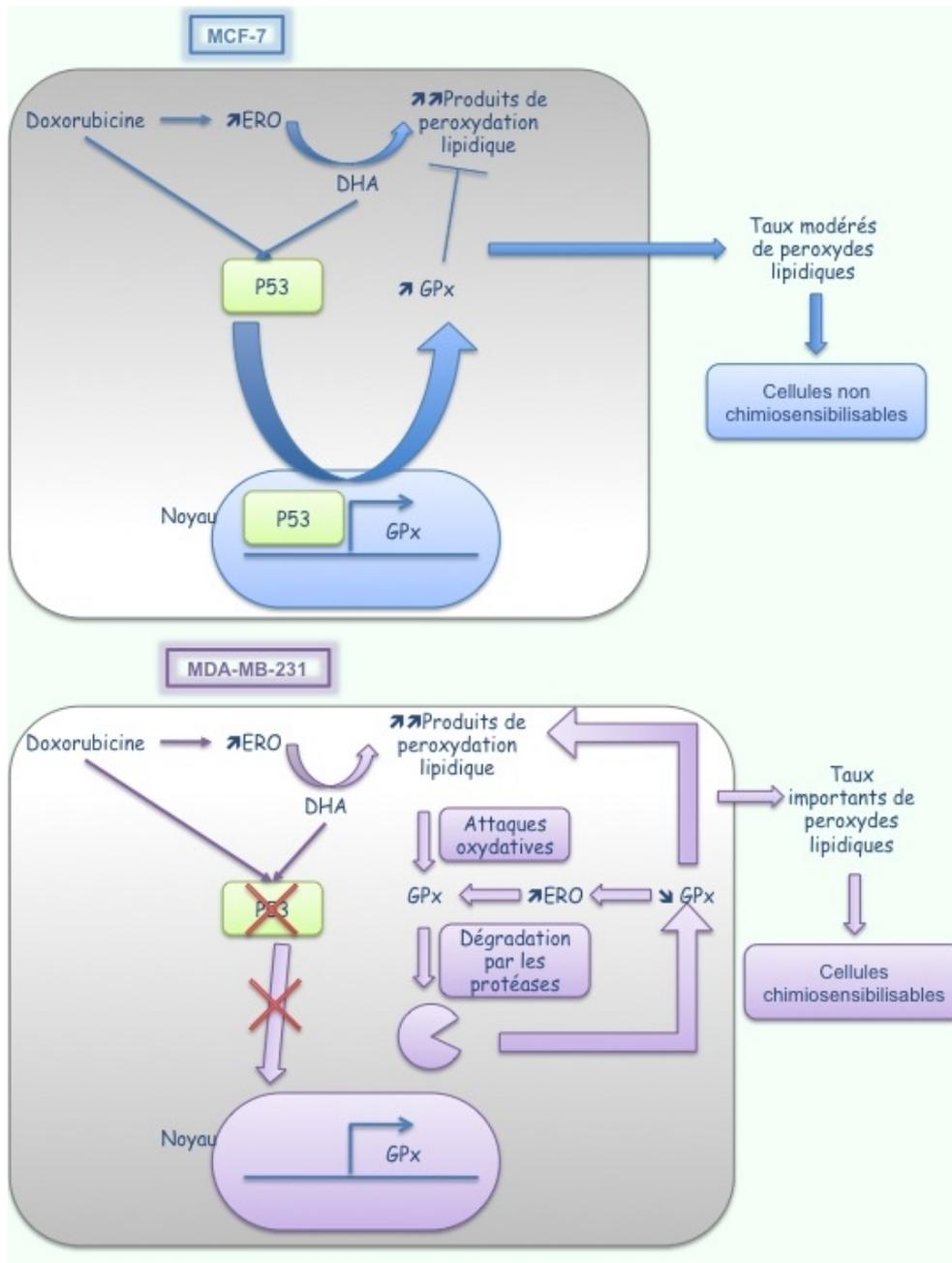


Figure 56 : Hypothèses d'un mode d'action du DHA pour augmenter la sensibilité des cellules tumorales via une diminution de la GPx dans les cellules MDA-MB-231.

La GPx est connue pour être induite au niveau transcriptionnel par un stress oxydant tel qu'un traitement à la doxorubicine et ceci via la protéine P53. En effet, la doxorubicine peut induire l'expression de la protéine P53 de manière dose dépendante <sup>327</sup>. Or le gène de la GPx présente un élément de réponse à la protéine P53 <sup>328</sup>, et l'expression de la GPx peut donc être induite par P53 <sup>329</sup>. De même, le

<sup>327</sup> Lorenzo E. J Biol Chem. 2002. PMID : 11779855.

<sup>328</sup> Tan M. J Biol Chem. 1999. PMID : 10207030.

<sup>329</sup> Hussain SP. Cancer Res. 2004. PMID : 15059885.

DHA est connu pour induire<sup>330</sup> et activer la protéine P53<sup>331</sup>. Ainsi dans une cellule possédant une protéine P53 non mutée, un co-traitement DHA et doxorubicine peut induire l'expression de la GPx. De plus, ce co-traitement augmente à la fois les ERO (par la doxorubicine) et leur cibles d'attaque (le DHA) et donc augmente au moins de manière transitoire les produits de peroxydation lipidique. Cependant l'augmentation est modérée grâce à la GPx qui peut donc être induite par ce co-traitement via la protéine P53 dans les cellules tumorales. C'est une hypothèse qui pourrait expliquer le comportement des MCF-7 face à ce cotraitement (**Figure 56**).

Au contraire, les MDA-MB-231 possèdent une protéine P53 mutée. L'expression de la GPx ne va donc pas pouvoir être induite ni par la doxorubicine, ni par le DHA. La GPx doit de plus faire face à un stress oxydant important du fait de l'augmentation des ERO mais aussi des AGPI et donc de la peroxydation lipidique. Les résultats observés dans les cellules MDA-MB-231 traitées par la doxorubicine, suggèrent une régulation post-transcriptionnelle de la GPx, car les taux d'ARNm restent inchangés alors que les taux de protéine diminuent. Il est connu que l'activité de la GPx est particulièrement sensible aux attaques oxydatives par les peroxydes du fait de la présence d'une cystéine dans son site actif<sup>332</sup>. La GPx oxydée peut ensuite être dégradée par le protéasome, ce qui pourrait expliquer la diminution du taux de protéine lors d'un stress oxydant dans les cellules MDA-MB-231. Pour conclure, lors d'un cotraitement des cellules MDA-MB-231 avec le DHA et la doxorubicine, non seulement la GPx ne peut être induite par la majoration du stress oxydant cellulaire, mais elle peut être la cible d'attaque de peroxydes issus de ce stress oxydant. Les cellules ne peuvent alors faire face à l'augmentation très importante de la peroxydation lipidique (en effet les taux de malondialdéhyde sont beaucoup plus importants que dans les MCF-7).

Un autre récepteur nucléaire peut être impliqué dans le comportement différent des deux lignées face au cotraitement DHA/doxorubicine : le récepteur du rétinoïde X. En effet le DHA est connu pour se lier à ce récepteur et la GPx peut être induite par l'activation de celui-ci. Enfin, tout comme la protéine P53, ce récepteur est inactif dans les MDA-MB-231 et actif dans les MCF-7. Les MCF-7 grâce à la présence d'une protéine P53 fonctionnelle et de RXR actif peut donc induire l'expression de la GPx, contrairement aux MDA-MB-231.

---

<sup>330</sup> Zand H. Mol Cell Biochem. 2007. PMID : 17487454.

<sup>331</sup> Kim HJ. J Cell Physiol. 2005. PMID : 15795939.

<sup>332</sup> Walshe J. Cancer Res. 2007. PMID : 17510403.



# 3<sup>e</sup> Projet



Original Contribution

# Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation

Karine Mahéo<sup>a</sup>, Sophie Vibet<sup>a</sup>, Jean Paul Steghens<sup>b</sup>, Caroline Dartigeas<sup>a</sup>, Magali Lehman<sup>a</sup>,  
Philippe Bougnoux<sup>a</sup>, Jacques Goré<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>INSERM E 0211 Nutrition, Croissance et Cancer, IFR 135 Imagerie Fonctionnelle, Université François-Rabelais, Tours, France

<sup>b</sup>Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

Received 29 November 2004; revised 27 April 2005; accepted 27 April 2005

Available online 16 May 2005

## Abstract

Polyunsaturated fatty acids have been reported to enhance the cytotoxic activity of several anticancer drugs. In the present study, we observed that doxorubicin chemosensitization of breast cancer cell lines by docosahexaenoic acid (DHA, a long-chain  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid) was cell-line selective, affecting MDA-MB-231 and MCF-7dox (a doxorubicin-resistant cell line) but not the parental MCF-7 cell line. DHA supplementation led to an increase in membrane phospholipid DHA level, but did not induce changes in intracellular [<sup>14</sup>C]doxorubicin accumulation. In MDA-MB-231, doxorubicin efficacy enhancement by DHA was linked to an increase in malondialdehyde level, a final product of lipid peroxidation. DHA elicited by itself a 3.7-fold malondialdehyde level increase, additive to that induced by doxorubicin. Addition of doxorubicin to DHA further increased the glutathione level, indicative of the generation of an oxidative stress. In contrast to MDA-MB-231, doxorubicin did not increase the malondialdehyde level in MCF-7, although DHA induced lipid peroxidation. Therefore in MCF-7, lipid peroxidation induced by DHA itself was not sufficient to trigger an oxidative stress and to subsequently increase sensitivity to doxorubicin. These data indicate that the differential effect of DHA among cells on drug toxicity results from a differential oxidative response to doxorubicin. Chemosensitization through fatty acids appears as a new promising adjuvant therapeutic paradigm, since  $\omega$ -3 fatty acids are physiological molecules found in food and are nontoxic in vivo.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Breast cancer; Fatty acids  $\omega$ -3; Anthracycline; Drug accumulation; Oxidative stress

## Introduction

Several epidemiological studies have indicated that populations consuming high amounts of  $\omega$ -3 (n-3) fatty acids display a lower breast cancer risk [1,2]. This effect

seems to be related to specific n-3 polyunsaturated fatty acids and/or to the ratio of n-6 to n-3 fatty acids [3–6]. Long-chain n-3 fatty acids found in fatty cold-water fish, particularly eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), have been shown to inhibit the growth of human breast cells both in culture and in xenografts [7,8] and to increase the efficacy of anticancer drugs [9,10].

Several mechanisms have been proposed to account for the activity of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) against cancer cells, including alteration in gene expression [11,12], modulation of cellular proliferation, apoptosis and differentiation [13], increase in drug transport across the cell membrane [14,15], generation of free oxygen radicals, and lipid peroxidation [16,17]. These biological mechanisms

*Abbreviations:* DHA, docosahexaenoic acid; DMSO, dimethyl sulfide; EPA, eicosapentaenoic acid; GSH, glutathione (reduced); GSSG, glutathione (oxidized); MDR, multidrug resistance; PBS, phosphate-buffered saline; P-gp, P-glycoprotein; PUFA, polyunsaturated fatty acid; ROS, reactive oxygen species.

\* Corresponding author. Université François-Rabelais, INSERM E 0211 Nutrition, Croissance et Cancer, Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 Tours Cedex, France. Fax: +33 0 24736 62 26.

E-mail address: [jacques.gore@univ-tours.fr](mailto:jacques.gore@univ-tours.fr) (J. Goré).

could explain that n-3 fatty acid-mediated inhibition of mammary carcinogenesis is not independent. For example, incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cell membrane phospholipids can alter membrane fluidity (and increase intracellular drug accumulation), modulate cell signaling [18], and enhance the production of free oxygen radicals [19] and lipid peroxidation [20].

Anthracyclines are among the most active anticancer agents, widely used in the treatment of solid tumors and leukemia. The cytotoxic action of doxorubicin has been mainly related to the inhibition of topoisomerase II and to the production of oxygen-reactive species [21,22]. Among polyunsaturated fatty acids, DHA, with its 6 double bonds, is very prone to oxidation. The increased membrane unsaturation index consequently would provide more abundant targets for oxygen-reactive species generated by doxorubicin metabolism. Products of lipid peroxidation such as hydroperoxides and aldehydes have been implicated in the cytotoxic process and the increase in drug efficacy. Thus, conditions favoring an increased lipid peroxidation in response to doxorubicin would lead to a higher activity of the drug. Among PUFAs studied, DHA was the most potent to enhance the cytotoxic effect of doxorubicin [9]. In vivo and in vitro studies on the influence of DHA supplementation have reported higher peroxidation and oxidative stress, as demonstrated by an increase of thiobarbituric acid-reactive substances, conjugated dienes, or malondialdehydes and a decrease of antioxidant vitamins [23–26]. Protection against oxidative damages is normally ensured by non-enzymatic (especially vitamins provided by diet) and enzymatic (catalases, superoxide dismutases, and glutathione peroxidases) defenses. Changes in the activity of these antioxidant enzymes have also been described during PUFA supplementation [27,28].

Chemotherapy has improved during the last decades, largely due to the introduction of effective drug combinations and treatment schemes. However resistance is frequently observed in tumors undergoing primary therapy or, more frequently, is a result of treatment with various antitumor drugs. This multidrug resistance, the so-called phenotype MDR, remains a major obstacle for successful chemotherapeutic cure [29]. Among drug resistance mechanisms, the most common are: (i) an increase in drug efflux, associated with overexpression of the *mdr-1* gene product, a  $M_r$  170,000 plasma membrane glycoprotein (P-gp) that functions as an energy (ATP)-dependent efflux pump for cytotoxic drugs, and (ii) an abnormal redox status developed secondarily after drug exposure, in which glutathione and antioxidant enzyme activities are elevated and protect the cell against free radical aggression [30]. Attention has been focused recently on the study of MDR reversing agents. Although hundreds of compounds have been found in vitro to be able to modulate the MDR phenotype, their clinical application was limited owing to high toxicity in vivo such as cardiotoxicity, nephrotoxicity, or immunosuppression [29].

To determine to what extent an oxidative stress could account for the sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA, we have used three cell lines: a doxorubicin-resistant one (MCF-7dox) and two sensitive lines (MCF-7 and MDA-MB-231), and took advantage of their differing properties. We found that DHA was able to enhance doxorubicin cytotoxicity in MDA-MB-231 or in MCF-7dox cell lines, but not in the parental MCF-7 cell line. In order to understand the differential effects of DHA on these three cell lines, fatty acid composition of membrane phospholipids and intracellular accumulation of doxorubicin were examined. The cellular oxidative status was also evaluated through the measure of two parameters of oxidative stress, malondialdehyde level (a final product of lipid peroxidation) and glutathione levels, cofactors for major antioxidant enzymes which modulate the cell's response to redox changes and vitamin E level.

## Materials and methods

### Drugs and chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Chimie, France). Doxorubicin (chlorhydrate de doxorubicine Teva<sup>®</sup>, 10 mg/5 ml) was purchased from Teva Pharma S.A. (France) and [<sup>14</sup>C] doxorubicin hydrochloride (2 GBq/mmol) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (France). Stock solutions of doxorubicin (1 mM) were stored at -80°C and dilutions of doxorubicin were freshly prepared in Hanks' medium (Hanks' balanced salts without sodium bicarbonate and phenol red) buffered with 10 mM Hepes (pH 7.2 at 37°C) or in appropriate media. [<sup>14</sup>C]Doxorubicin hydrochloride was used at 5 μM (final concentration with isotopic dilution ≈ 1/11). Oleic acid (OA, 18:1n-9) and docosahexaenoic acid (22:6n-3) were used as methyl esters. The fatty acid was dissolved in 99% ethanol and stored as stock solution (150 mM) under nitrogen at -80°C. For all experiments, fatty acid was prepared freshly from stock solution and diluted with growth culture medium (final ethanol concentration: 0.02%).

### Cell culture

The human breast carcinoma cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, France) and the MCF-7dox cell line was a gift of Dr. K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda, MD). MCF-7 is a drug-sensitive, P-gp-negative cell line. The MCF-7dox was originally established by in vitro selection with increasing concentrations of doxorubicin [31]. Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% heat-inactivated fetal calf serum, 50 UI/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin (Cambrex, France). MCF-7dox cells were

grown in the presence of 1  $\mu\text{M}$  doxorubicin to maintain the multidrug-resistant phenotype. Two weeks before experiments were performed, MCF-7dox cells were removed from doxorubicin-containing medium and maintained in doxorubicin-free medium as described previously [31]. Cells were seeded at low density ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and 1 day after seeding the medium was removed and replaced by the same growth medium containing 0.02% ethanol (control) or fatty acid (30  $\mu\text{M}$ ). The cells were cultured 1 week before experiments (37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>). The culture medium was changed each 24 h.

#### Fatty acid analysis

After two rinses with ice-cold PBS, cells cultured in 175-cm<sup>2</sup> flasks were scraped off with a rubber policeman. They were collected in ice-cold PBS and centrifuged at  $1000 \times g$  for 5 min. Total lipids were then immediately extracted from the cell pellet according to the method of Bligh and Dyer [32]. Lipid extract was evaporated under vacuum and lipid classes were separated by silica gel thin-layer chromatography with hexane/diethyl ether/acetic acid (70/30/1, v/v/v). Phospholipids spots were scraped and collected in screw-cap glass tubes. Lipids were dissolved in 2 ml 14 % boron trifluoride in methanol and tubes were closed under nitrogen. Transesterification was obtained by heating at 100°C for 90 min [33]. Fatty acid methyl esters were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography (GC Trace, Thermo-Finnigan, Les Ulis, France). The column was 60 m long, 0.25 mm internal diameter with a 0.25  $\mu\text{m}$  thickness BPX70 phase (SGE, Courta-boeuf, France). Fatty acids were identified by comparing their retention times with those of authenticated fatty acids. Each fatty acid was quantified by comparing its peak area with that of nonadecanoic acid (internal standard). Results were expressed as mole of fatty acid per 100 mol total fatty acids (mol%).

#### Cell cytotoxicity

Cells were seeded in standard 96-well plates ( $7 \times 10^3$  cells/well). One day after seeding, the culture medium was changed and replaced by medium containing different concentrations of doxorubicin ( $10^{-10}$  to  $10^{-4}$  M) with or without DHA (30  $\mu\text{M}$ ) for 7 days. Viability of cells was measured as a whole by the tetrazolium salt assay [34]. Cells were incubated at 37°C for 1 h with the tetrazolium salt (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and metabolically active cells reduced the dye to purple formazan. Formazan crystals were dissolved with DMSO. Absorbance was measured at 570 nm using a multiwell plate reader (Molecular Devices, SpectraMax Model 190). Dose response curves were plotted as percentages of the control cell absorbance which was obtained from control wells (without doxorubicin treatment). These values were fitted to the sigmoidal dose-

response model (GraphPad Prism<sup>®</sup>, GraphPad Software Inc),

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{\log \text{IC}_{50} - X})$$

where min = minimum viability, max = maximum viability,  $X = \log$  (doxorubicin concentration, in M), and IC<sub>50</sub> = concentration of doxorubicin producing a 50% decrease of viability.

#### Cellular [<sup>14</sup>C]doxorubicin accumulation

Cells were seeded in standard 6-well plates at  $18 \times 10^4$  cells/well. One day after seeding, the culture medium was changed and replaced by medium with or without DHA (30  $\mu\text{M}$ ) for 7 days. The cells were washed twice with 5 ml of Hanks' medium and then [<sup>14</sup>C]doxorubicin hydrochloride (1.5 ml of 5  $\mu\text{M}$  doxorubicin solution) was added. After 3 h of incubation the doxorubicin solution was discarded and then the cells were washed 3 times with 5 ml of ice-cold Hanks' medium. Then 1 ml of NaOH 1 N was added to the cells and then transferred in stoppered tubes for 1 h at 60°C. After keeping an aliquot (100  $\mu\text{l}$ ) for the determination of the protein content according to Lowry et al. [35], 700  $\mu\text{l}$  was placed in scintillation vials and 3 ml of scintillation liquid (Ultima Gold XR, Packard) was added. Radioactivity was determined in a liquid scintillation counter Tri-Carb 2100 TR (Packard, France).

#### Measurement of malondialdehyde, GSH, and GSSG

Malondialdehyde was measured by UV-HPLC, according to Steghens et al. [36], as a diaminonaphtalene derivative which displays a highly specific spectrum, very different from that of other short-chain aldehydes such as formaldehyde or acetaldehyde.

Reduced glutathione (GSH) and disulfide glutathione (GSSG) were measured by a fast new HPLC/MS method recently described [37] with only a modification for the sample preparation: as the protein content (and thus the buffering capacity) of cell extracts is very low in comparison with whole blood, cell extracts (50  $\mu\text{l}$ ) were first vortex-mixed with a solution containing *N*-ethylmaleimide, EDTA, and  $\gamma$ -glutamylglutamic acid as an internal standard, incubated 20 min at room temperature, and then deproteinized with sulfosalicylic acid.

#### Vitamin E analysis

Total lipids were extracted from the cell pellet according to the Bligh and Dyer extraction procedure [32].  $\delta$ -Tocopherol was added as an internal standard (at 0.625  $\mu\text{g/ml}$  in hexane) to the lipid extract, which was evaporated to dryness under vacuum, taken up with 2 ml hexane, and then washed with 1 ml PBS. Lipids were redissolved in 300  $\mu\text{l}$  methanol and 80  $\mu\text{l}$  was injected for tocopherol separation and quantification by high pressure liquid chromatography

(HPLC) system [38]. Solvent was methanol, which was isocratically pumped at 1 ml per minute through a 250 × 4.6 mm reverse-phase octadecyl-bonded silica column (Waters Spherisorb ODS2, Thermo-Finnigan, Les Ulis, France). Detection of tocopherols was performed with a fluorimeter with excitation wavelength set at 290 nm and detection at 334 nm, coupled with a SP4270 Integrator (Spectraphysics). Separated compounds were quantified by comparison of their peak areas with that of  $\delta$ -tocopherol used as an internal standard.

### Statistics

Statistical analysis was carried out using Student's unpaired *t* test, one-way ANOVA, and Newman-Keuls multiple comparison tests (GraphPad Prism<sup>®</sup>, GraphPad Software Inc); *P* < 0.05 was regarded as significant.

## Results

### Fatty acid composition of membrane phospholipids

Table 1 shows the composition (in mol%) of the membrane phospholipids fatty acids (pooled in series) of MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-7dox. Under control conditions (ethanol: 0.02%), no statistical difference existed among the fatty acid compositions of these three cell lines (ANOVA, *P* > 0.05). DHA (30  $\mu$ M) supplementation led to an increased level of total n-3 fatty acids for MDA-MB-231 and MCF-7dox cell lines (Student's *t* test, *P* < 0.05). This increase involved both 22:6n-3 and 20:5n-3 fatty acids in MDA-MB-231 whereas only 22:6n-3 was statistically increased in MCF-7 and MCF-7dox. Despite the same basal

level in MDA-MB-231- and MCF-7-sensitive cell line membranes, DHA supplementation induced a higher increase of 22:6n-3 incorporation in MDA-MB-231 (by 2.5-fold, *P* < 0.01) than in MCF-7 (by 1.4-fold, *P* < 0.05). Enrichment ratios of MDA-MB-231 and MCF-7 were statistically different (Newman-Keuls test, *P* < 0.05). In MCF-7dox, DHA led to a higher increase in the level of 22:6n-3 (by 1.7-fold, *P* < 0.05) than the parental MCF-7 cell line. However, no statistical differences (Newman-Keuls test, *P* > 0.05) were observed between the enrichment ratios of MCF-7 and MCF-7dox cell lines.

### Doxorubicin cytotoxicity

Breast cancer cells were cultured for 7 days in a medium supplemented without or with DHA 30  $\mu$ M along with doxorubicin concentrations ranging from 10<sup>-10</sup> to 10<sup>-4</sup> M. By using a cell survival assay (trypan blue exclusion), we confirmed that the concentration of DHA used (30  $\mu$ M) was not toxic for the three cell lines (data not shown).

Under control conditions, the calculated concentration of doxorubicin inducing 50% cell mortality (IC<sub>50</sub>) was dependent on the cell line (11.8 ± 1.0 nM for MDA-MB-231, 111 ± 16 nM for MCF-7, and 7.0 ± 0.8  $\mu$ M for the resistant cell line MCF-7dox). Fig. 1 shows the dose–response curves obtained with the three cell lines. In MDA-MB-231, DHA supplementation led to an increase in doxorubicin toxicity at concentrations between 10<sup>-9</sup> and 10<sup>-7</sup> M (Fig. 1A). The IC<sub>50</sub> shifted from 11.8 ± 1.0 to 3.8 ± 0.3 nM when the cells were enriched with DHA. This enhancement of doxorubicin cytotoxicity ( $\approx$ 3-fold) by DHA was statistically significant (*P* < 0.001). In contrast, supplementation of MCF-7 cells for 7 days with DHA (Fig. 1B) did not modify doxorubicin cytotoxicity: IC<sub>50</sub> = 93 ± 15 nM versus 111 ± 16 nM in

Table 1

Membrane phospholipids fatty acid classes (mol%) for the three cell lines grown for 7 days in media not supplemented (control conditions: 0.02% ethanol) or supplemented with DHA 30  $\mu$ M

| Major fatty acids     | MDA-MB-231 |                | <i>P</i> | MCF-7      |                | <i>P</i> | MCF-7dox   |                | <i>P</i> |
|-----------------------|------------|----------------|----------|------------|----------------|----------|------------|----------------|----------|
|                       | Control    | DHA 30 $\mu$ M |          | Control    | DHA 30 $\mu$ M |          | Control    | DHA 30 $\mu$ M |          |
| 14:0                  | 2.2 ± 0.4  | 2.0 ± 0.4      |          | 3.2 ± 0.9  | 3.9 ± 0.5      |          | 2.3 ± 0.4  | 2.5 ± 0.4      |          |
| 16:0                  | 20.0 ± 2.1 | 20.8 ± 1.9     |          | 22.3 ± 3.9 | 21.8 ± 1.8     |          | 27.5 ± 2.0 | 29.8 ± 2.6     |          |
| 18:0                  | 18.8 ± 2.3 | 21.3 ± 2.6     |          | 11.4 ± 1.9 | 11.6 ± 1.1     |          | 13.2 ± 0.6 | 14.1 ± 0.8     |          |
| Total saturates       | 45.7 ± 1.6 | 49.9 ± 1.3     | *        | 40.2 ± 5.2 | 40.4 ± 3.2     |          | 47.8 ± 2.4 | 51.2 ± 3.4     |          |
| 16:1                  | 1.5 ± 0.3  | 1.4 ± 0.1      |          | 10.2 ± 4.9 | 12.2 ± 0.8     |          | 3.7 ± 0.6  | 3.0 ± 0.4      |          |
| 18:1                  | 32.0 ± 4.6 | 25.1 ± 4.7     |          | 33.7 ± 3.1 | 30.7 ± 2.4     |          | 30.0 ± 0.5 | 25.7 ± 3.3     |          |
| Total monounsaturates | 36.7 ± 5.4 | 28.9 ± 5.2     |          | 46.8 ± 7.6 | 45.7 ± 3.4     |          | 36.4 ± 0.6 | 31.1 ± 3.8     |          |
| 18:2n-6               | 2.4 ± 0.9  | 2.8 ± 0.7      |          | 2.6 ± 0.7  | 2.8 ± 0.3      |          | 3.6 ± 0.1  | 3.5 ± 0.1      |          |
| 20:4n-6               | 4.9 ± 1.4  | 4.4 ± 1.5      |          | 3.8 ± 1.0  | 3.4 ± 0.4      |          | 4.8 ± 0.4  | 4.5 ± 0.2      |          |
| 22:4n-6               | 0.7 ± 0.1  | 0.4 ± 0.1      |          | 0.3 ± 0.2  | 0.2 ± 0.1      |          | 0.6 ± 0.1  | 0.6 ± 0.1      |          |
| Total n-6 PUFA        | 11.9 ± 1.9 | 10.0 ± 2.3     |          | 8.9 ± 1.9  | 8.3 ± 0.6      |          | 11.1 ± 0.6 | 10.4 ± 0.2     |          |
| 20:5n-3               | 0.9 ± 0.3  | 2.4 ± 1.0      | *        | 0.7 ± 0.6  | 1.2 ± 0.2      |          | 0.3 ± 0.1  | 0.4 ± 0.1      |          |
| 22:5n-3               | 1.9 ± 0.8  | 1.9 ± 0.6      |          | 0.6 ± 0.1  | 0.5 ± 0.1      |          | 0.5 ± 0.2  | 0.5 ± 0.2      |          |
| 22:6n-3               | 2.6 ± 0.8  | 6.7 ± 1.5      | **       | 2.6 ± 0.7  | 3.7 ± 0.4      | *        | 3.6 ± 1.1  | 6.1 ± 0.5      | *        |
| Total n-3 PUFA        | 5.7 ± 2.0  | 11.2 ± 3.3     | *        | 4.2 ± 1.1  | 5.6 ± 0.7      |          | 4.7 ± 1.5  | 7.2 ± 0.3      | *        |

In addition to fatty acids presented in this table, total saturates include 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0; total monounsaturates include 14:1, 15:1, 17:1, 20:1, 22:1, 24:1; total n-6 PUFA includes 18:3, 20:2, 20:3, 22:2; total n-3 PUFA includes 18:3 and 20:3. Results are means ± SD of three determinations. Comparison between control and DHA 30  $\mu$ M by unpaired *t* test: significant \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

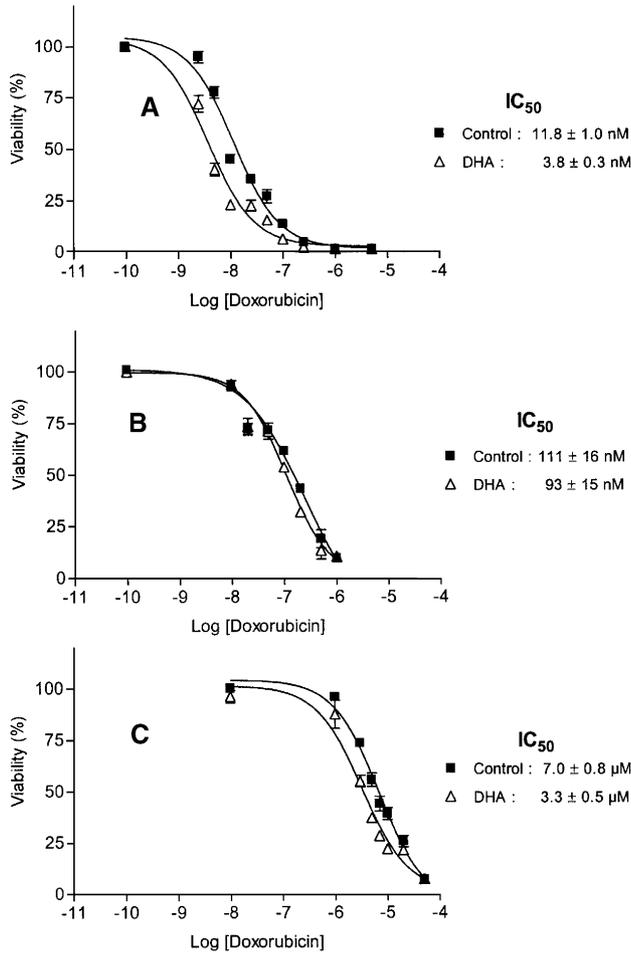


Fig. 1. Dose–response curve of doxorubicin in the absence or in the presence (open symbols) of DHA 30  $\mu$ M. Breast cancer cell lines (A, MDA-MB-231; B, MCF-7; C, MCF-7dox) were grown for 7 days with specified concentrations of doxorubicin (in M) without or with DHA 30  $\mu$ M. Cell viability was measured by MTT method (see Materials and methods). Shown are fitted curves and means  $\pm$  SE from three separate experiments in which triplicate measurements were made. Absent error bars indicate that errors fell within symbol.

supplemented versus nonsupplemented cells, respectively ( $P > 0.05$ ). In the doxorubicin-resistant cell line MCF-7dox (Fig. 1C),  $IC_{50}$  significantly shifted from  $7.0 \pm 0.8$  to  $3.3 \pm 0.5$   $\mu$ M when cells were supplemented with DHA 30  $\mu$ M ( $P < 0.001$ ).

#### Doxorubicin accumulation

Fig. 2B shows the levels of intracellular accumulation of [ $^{14}$ C]doxorubicin (5  $\mu$ M) after a 3-h incubation in MDA-MB-231, MCF-7, or MCF-7dox cells with or without DHA supplementation, in comparison with the DHA enrichment within cell membranes (Fig. 2A). No relation was found in any cell line between DHA enrichment and the accumulation of doxorubicin inside the cells. The basal level of doxorubicin was similar in MDA-MB-231 and MCF-7 cells and was not modified by DHA supplementation. Under control conditions (0.02% ethanol), accumulation of [ $^{14}$ C]doxorubicin in MCF-7dox was 3-fold lower than that of the parental MCF-7 cell line ( $170 \pm 30$  versus  $546 \pm 70$  pmol/mg proteins, respectively) and remained unchanged after DHA supplementation. Furthermore, measures of P-gp activity by rhodamine 123, a fluorescent substrate, did not show any changes in rhodamine 123 efflux in DHA-treated cells (data not shown). Thus, DHA incorporation in cellular membrane did not lead to any changes in doxorubicin accumulation, regardless of the breast cancer cell type studied.

#### Malondialdehyde, glutathione, and $\alpha$ -tocopherol levels

We studied lipid peroxidation in cells supplemented or not with DHA or oleic acid (18:1n-9) a monounsaturated fatty acid. Under control conditions, basal levels of malondialdehyde were not statistically different (ANOVA,  $P > 0.05$ ),  $45 \pm 15$ ,  $32 \pm 10$ , and  $38 \pm 4$  nmol/g proteins in MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-7dox cell lines, respectively (Fig. 3), and oleic acid supplementation did not lead

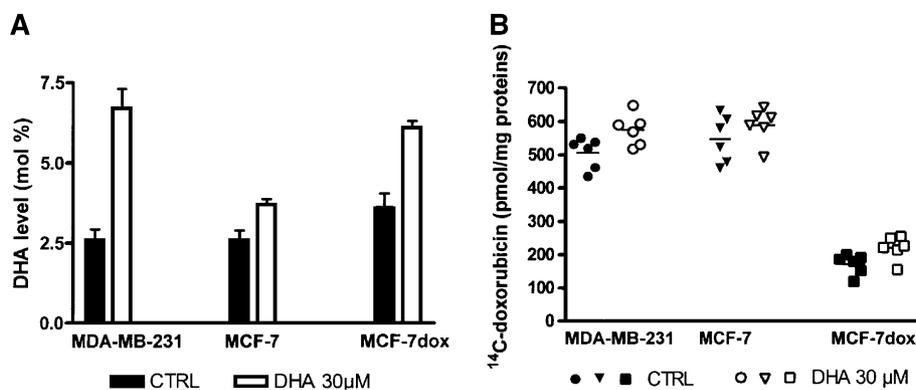


Fig. 2. Differential incorporation of DHA among three cell lines (A) and lack of relation with intracellular doxorubicin accumulation (B). Cells were grown for 7 days without (control: 0.02% ethanol) or with DHA 30  $\mu$ M (open bar, open symbol). DHA incorporation in membrane phospholipids (mol%) was quantified by gas chromatography after extraction and derivatization of membrane phospholipids. Accumulation of [ $^{14}$ C]doxorubicin (pmol/mg proteins) was measured after a 3-h incubation with doxorubicin 5  $\mu$ M. Bars are means  $\pm$  SD of six experiments.

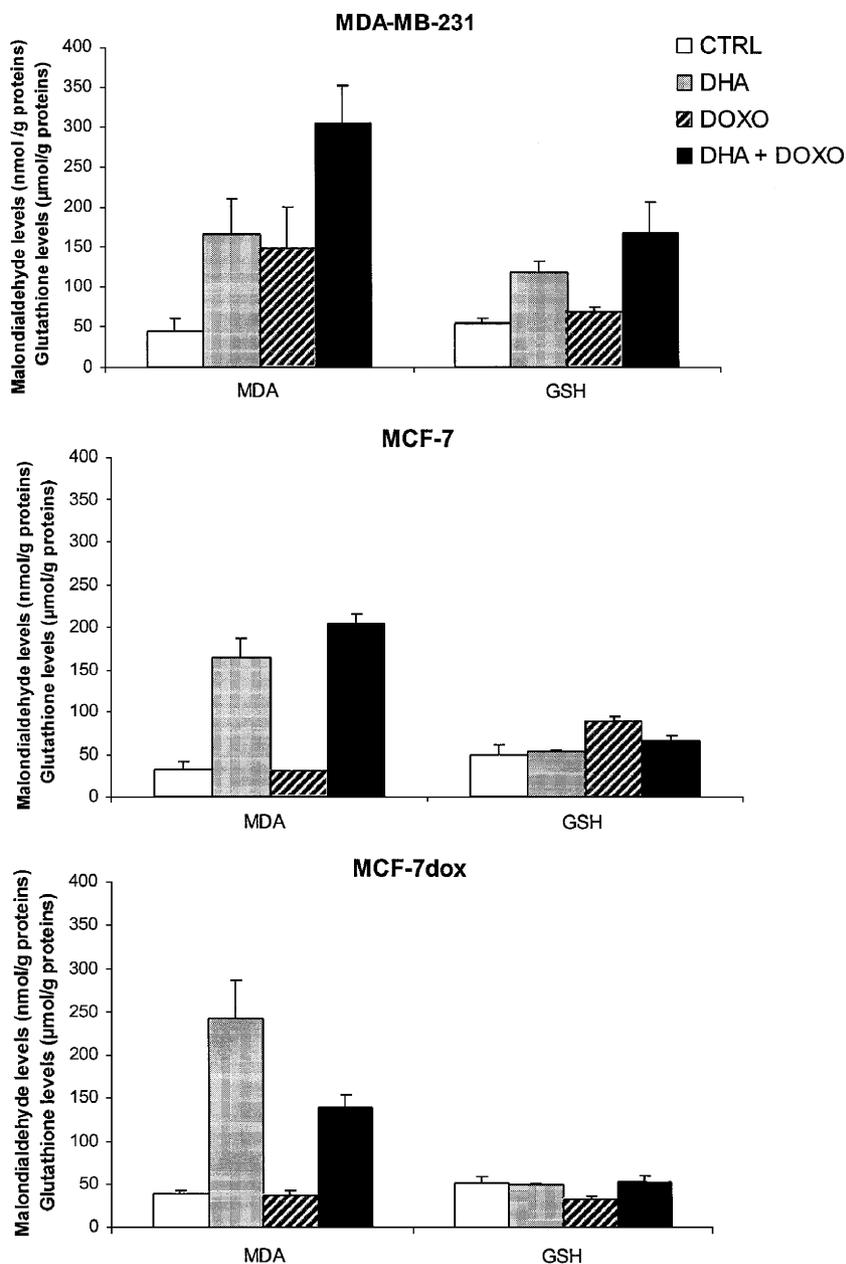


Fig. 3. Malondialdehyde (MDA, nmol/g proteins) and glutathione levels (GSH, μmol/g proteins) in the three breast cancer cell lines supplemented for 7 days without or with DHA 30 μM. Doxorubicin was used at IC<sub>50</sub> concentration for each cell line. Data are means ± SD of eight values and six values for malondialdehyde and glutathione, respectively.

to any change in these levels (data not shown). In contrast, DHA supplementation led to a marked ( $\approx 4$ -fold) increase of the malondialdehyde in the three cell lines. At 30 μM DHA, under conditions where no cytotoxicity was detectable, malondialdehyde reached 165 nmol/g proteins in MDA-MB-231, a similar level in MCF-7, and 242 nmol/g proteins in MCF-7dox ( $P < 0.01$ ). Doxorubicin, used at its IC<sub>50</sub> concentration, led to a 3.3-fold malondialdehyde level increase in MDA-MB-231. No such change was found in MCF-7 or in MCF-7dox cells.

Cotreatment with doxorubicin and DHA further increased cumulatively malondialdehyde ( $303 \pm 49$  versus

$166 \pm 45$  nmol/g proteins,  $P < 0.01$ ) in MDA-MB-231 compared to DHA alone. In MCF-7 cells, there was also an increase in malondialdehyde, although the extent was much lower ( $203 \pm 12$  versus  $165 \pm 23$  nmol/g proteins,  $P < 0.05$ ). In resistant cell line MCF-7dox, despite a 3.7-fold higher level in cells treated both with doxorubicin and DHA, this level remained lower than that induced by DHA supplementation alone.

Fig. 3 indicates that basal glutathione was at the level in the three cell lines ( $\approx 50$  μmol/g proteins) and was increased by DHA (2.2-fold,  $P < 0.05$ ) only in MDA-MB-231. GSH level was slightly increased (by 1.3- and 1.8-fold) in

doxorubicin-treated MDA-MB-231 and MCF-7 cells compared to those under control conditions. By contrast, doxorubicin led to a weak GSH level decrease in MCF-7dox. During cotreatment with DHA plus doxorubicin, a higher increase of GSH level was observed only in MDA-MB-231 compared to those under control conditions ( $167 \pm 39$  versus  $53 \pm 7$ ,  $P < 0.05$ ).

Glutathione disulfide was also measured. Its level is very low or undetectable. When the GSSG level was measurable, the GSSG level was increased by DHA in MDA-MB-231 by 1.5-fold compared to control cells ( $2.4 \pm 0.2$  versus  $1.6 \pm 0.2$   $\mu\text{mol/g}$  proteins,  $P < 0.001$ ). Its level was unchanged with DHA in MCF-7 compared control conditions ( $0.7 \pm 0.4$  versus  $0.5 \pm 0.4$   $\mu\text{mol/g}$  proteins). The GSSG level was undetectable in DHA-treated MCF-7-dox compared to control ( $0.3 \pm 0.1$   $\mu\text{mol/g}$  proteins).

Finally,  $\alpha$ -tocopherol, measured in each of the three cell lines, was found to be undetectable ( $<5$  ng per  $10^8$  cells) regardless of the condition explored: ethanol, DHA (30  $\mu\text{M}$ ), doxorubicin ( $\text{IC}_{50}$  concentration for each cell line), or doxorubicin plus DHA ( $n = 6$  for each condition).  $\alpha$ -Tocopherol was also undetectable in the culture medium, although a trace of  $\gamma$ -tocopherol was found.

## Discussion

Our study demonstrates that the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin can be increased when an oxidative stress is triggered, a condition brought about by a supplementation with DHA. We have taken advantage of the differential sensitivity of three breast cancer cell lines to doxorubicin and DHA in order to investigate mechanisms responsible for the chemosensitization induced by DHA. We found it to be cell-line selective, affecting MDA-MB-231 and resistant MCF-7dox cells but not the parental cell line MCF-7. MCF-7 is the cell line with the lower incorporation of DHA in phospholipids after 7 days of supplementation. However, when the DHA supplementation was applied for 10 days in MCF-7, the greatest DHA enrichment obtained did not lead to any change in doxorubicin sensitivity (data not shown), thus showing no relation between the drug toxicity and the level of membrane DHA. In MDA-MB-231, sensitization to doxorubicin by DHA was associated with an increase in malondialdehyde and in GSH levels, indicating that an oxidative stress took place. In MCF-7 cells, the slight increase in malondialdehyde observed, although indicative of lipid peroxidation, was not sufficient to trigger a noteworthy oxidative stress since there was no change in GSH. This suggests the need for a threshold in lipoperoxidation products for amplification of doxorubicin cytotoxic action to occur. Alternately, the fact that EPA was increased substantially in MDA-MB-231 compared to MCF-7 subsequent to DHA treatment indicates that this fatty acid may also play a role in the phenomenon. The

absence of  $\alpha$ -tocopherol in all cell lines rules out the hypothesis that lipid antioxidants influenced our results [39].

We considered the possibility that DHA might alter the pharmacokinetic parameters of doxorubicin, since DHA may cause greater membrane permeability, thus increasing doxorubicin accumulation [14,40,41]. In our study, doxorubicin accumulation was similar in the two drug-sensitive cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 under basal conditions. It was 3-fold lower in MCF-7dox, which are resistant cells with a membrane glycoprotein (P-gp) that functions as an efflux pump for cytotoxic drugs, accounting for the low doxorubicin accumulation. After DHA supplementation, the greater incorporation of DHA into MDA-MB-231 cell membranes (2.5-fold) compared to MCF-7 (1.4-fold) contrasted sharply with the similar accumulation level of doxorubicin between MDA-MB-231 and MCF-7. This indicates that the steady-state level of doxorubicin is not influenced by membrane lipid composition in these two sensitive cell lines. Despite the modification in DHA level of MCF-7dox membrane phospholipids (1.7-fold), DHA supplementation apparently did not change drug diffusion or P-gp drug efflux. Since DHA enhanced the sensitivity of MDA-MB-231 and MCF-7dox to doxorubicin, chemosensitization induced by DHA cannot be correlated to anticancer drug intracellular concentration.

Reactive oxygen species, which are continuously produced in cells, can stimulate lipid peroxidation and contribute, for example, to cell multiplication or differentiation through generation of biologically active lipid peroxidation products such as malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals, which are physiologically present in cells at low concentrations [42,43]. The level of malondialdehyde was significantly higher after DHA supplementation than those under control conditions in the three cell lines studied. The increased malondialdehyde level observed in sensitive cells treated with DHA alone (166 and 165 nmol/g proteins in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively) or in MCF-7dox-resistant cells (242 nmol/g proteins) may not be sufficient to alter cell viability, although it might be sufficient to slightly decrease cell proliferation, as observed during DHA supplementation (data not shown).

Several mechanisms have been proposed to explain the doxorubicin cytotoxic action. These include intercalation into DNA and initiation of DNA damage via the inhibition of topoisomerase II. Doxorubicin is also an anticancer drug known for its ability to generate ROS and to increase lipid peroxidation [21]. Lipid peroxidation is commonly regarded as a deleterious mechanism, leading to structural modification of complex lipid protein assemblies, such as biomembranes, and is usually associated with cellular dysfunction [20,44,45]. In our study, lipid peroxidation induced by doxorubicin treatment was cell-line selective since this drug led to a 3-fold increase in malondialdehyde level in MDA-MB-231 but not in MCF-7 cells. Thus, lipoperoxidation could damage MDA-MB-231 cells and strengthen the effect

of other mechanisms involved in doxorubicin cytotoxicity. This observation might explain why doxorubicin toxicity, under control conditions, was greater in MDA-MB-231 than in MCF-7, with an  $IC_{50}$  at 11.8 and 111 nM, respectively. In the present study, we observed that the enhancement of the sensitivity to doxorubicin by DHA affects MDA-MB-231 but not MCF-7 cell lines. Since MDA-MB-231 was the only chemosensitive cell line where the malondialdehyde level increased with either DHA or doxorubicin treatment, the cumulative increase of malondialdehyde level observed with cotreatment might be sufficient to trigger a noteworthy oxidative stress for amplification of doxorubicin cytotoxicity. By contrast, in MCF-7 cells, the slight increase in malondialdehyde observed with cotreatment, although indicative of lipid peroxidation, might not have been sufficient for cytotoxic substances to reach the threshold required for cytotoxicity. The existence of a cytotoxic threshold has already been described by others using 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation [42].

Furthermore, the increase in glutathione level induced by either treatment occurred only in MDA-MB-231. Similar to that of GSH, the GSSG level increased after DHA supplementation in MDA-MB-231 but not in MCF-7 cells. GSH plays a major role in detoxification of a variety of electrophilic compounds and peroxides via catalysis by antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and glutathione *S*-transferase [46], resulting in formation of its oxidized form, disulfide glutathione. It has been reported that the initial depletion of GSH subsequent to its consumption by antioxidant enzymes during the first hours of oxidant exposure is followed by an increased activity of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, the key enzyme of GSH synthesis [47–50]. It should be stressed that in this study the level of GSH was measured 7 days after DHA exposure, and therefore represents a steady-state level and not an acute response to a primary oxidative stress. Increased levels of both GSH and GSSG in MDA-MB-231 suggest that an oxidative stress has been operating for several days. Elevated intracellular GSH providing a reducing environment could indicate adaptation of cells against an oxidative stress, potentially contributing to drug resistance [51,52]. However, in MDA-MB-231, the hypothesis that increased GSH protects cells against doxorubicin-induced oxidative stress is not supported by the increased chemosensitivity found after DHA treatment. Thus, alternatively to an activation of enzyme in GSH biosynthesis, increased glutathione could be also the consequence of its lower utilization in relation to an inhibition of consuming enzymes such as glutathione peroxidase or glutathione *S*-transferase. Such an hypothesis has already been explored by others, who reported that DHA decrease glutathione peroxidase in endothelial cells [26].

Despite the lack of an oxidative stress the reasons that DHA chemosensitizes MCF-7dox to doxorubicin are not clear. The resistance is associated with gene amplification such as, for example, increased expression of antioxidant

enzymes, increased expression of the drug transporter P-glycoprotein, and elevated cytosolic pH [30,53]. We may therefore contemplate the possibility that DHA modified one of these resistance pathways, leading in turn to enhanced sensitivity of these cells to doxorubicin. Additional studies on antioxidant enzyme regulation by DHA in three cell types should allow a better understanding of the different sensitivity to doxorubicin and DHA.

In conclusion, we suggest that the differential effect of DHA on the sensitivity of the two different cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 to doxorubicin results from their differential oxidative responses to doxorubicin, but not to DHA. MDA-MB-231 seems to be the only cell line where a cumulative effect of DHA and doxorubicin could lead to a level of lipid peroxidation sufficient enough to induce cell death. In MCF-7, doxorubicin did not lead to such an oxidative stress. Consequently, although DHA was equally peroxidized in the two cell lines, this effect was not sufficient to induce an increased cytotoxicity in MCF-7. Therefore, the prooxidant abilities of anticancer agents such as anthracyclines should not be underestimated. This process appears as a promising way to increase their efficacy in the presence of physiological molecules such as  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda) for the gift of resistant cell line MCF-7dox used in this study. We thank Lysiane Boulay for excellent technical assistance. This work was supported in part by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (Comités d'Indre et Loire, Loir et Cher, Indre), by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM: Action Thématique Concertée "Nutrition"), by Conseil Régional (Région Centre), and by Cancéropôle Grand-Ouest. Sophie Vibet was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Caroline Dartigeas was the recipient of a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

## References

- [1] Bougnoux, P.; Maillard, V.; Ferrari, P.; Jourdan, M. L.; Chajes, V. n-3 fatty acids and breast cancer. *IARC Sci. Publ.* **156**:337–341; 2002.
- [2] Franceschi, S.; Favero, A.; Decarli, A.; Negri, E.; La Vecchia, C.; Ferraroni, M.; Russo, A.; Salvini, S.; Amadori, D.; Conti, E.; et al. Intake of macronutrients and risk of breast cancer. *Lancet* **347**: 1351–1356; 1996.
- [3] Rose, D. P.; Connolly, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther.* **83**:217–244; 1999.
- [4] Maillard, V.; Bougnoux, P.; Ferrari, P.; Jourdan, M. L.; Pinault, M.; Lavillonniere, F.; Body, G.; Le Floch, O.; Chajes, V. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *Int. J. Cancer.* **98**:78–83; 2002.

- [5] Bagga, D.; Anders, K. H.; Wang, H. J.; Glaspy, J. A. Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr. Cancer* **42**:180–185; 2002.
- [6] Goodstine, S. L.; Zheng, T.; Holford, T. R.; Ward, B. A.; Carter, D.; Owens, P. H.; Mayne, S. T. Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U. S. women. *J. Nutr.* **133**:1409–1414; 2003.
- [7] Hardman, W. E.; Avula, C. P.; Fernandes, G.; Cameron, I. L. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* **7**:2041–2049; 2001.
- [8] Das, U. N. Essential fatty acids and their metabolites and cancer. *Nutrition* **15**:239–240; 1999.
- [9] Germain, E.; Chajes, V.; Cognault, S.; Lhuillery, C.; Bougnoux, P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int. J. Cancer* **75**:578–583; 1998.
- [10] Hardman, W. E. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J. Nutr.* **132**:3508S–3512S; 2002.
- [11] Jump, D. B. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **41**:41–78; 2004.
- [12] Narayanan, B. A.; Narayanan, N. K.; Reddy, B. S. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* **19**:1255–1262; 2001.
- [13] Chamras, H.; Ardashian, A.; Heber, D.; Glaspy, J. A. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* **13**:711–716; 2002.
- [14] Burns, C. P.; North, J. A. Adriamycin transport and sensitivity in fatty acid-modified leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* **888**: 10–17; 1986.
- [15] Spector, A. A.; Burns, C. P. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.* **47**:4529–4537; 1987.
- [16] Das, U. N. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **61**:157–163; 1999.
- [17] Stoll, B. A. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br. J. Nutr.* **87**:193–198; 2002.
- [18] Menendez, J. A.; Mehmi, I.; Atlas, E.; Colomer, R.; Lupu, R. Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-kappaB. *Int. J. Oncol.* **24**:591–608; 2004.
- [19] Das, U. A radical approach to cancer. *Med. Sci. Monit.* **8**: RA79–RA92; 2002.
- [20] Spiteller, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med. Hypotheses* **60**:69–83; 2003.
- [21] Sinha, B. K.; Mimnaugh, E. G.; Rajagopalan, S.; Myers, C. E. Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res.* **49**:3844–3848; 1989.
- [22] Quiles, J. L.; Huertas, J. R.; Battino, M.; Mataix, J.; Ramirez-Tortosa, M. C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* **180**:79–95; 2002.
- [23] Palozza, P.; Sgarlata, E.; Luberto, C.; Piccioni, E.; Anti, M.; Marra, G.; Armelao, F.; Franceschelli, P.; Bartoli, G. M. n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**:297–304; 1996.
- [24] Kubo, K.; Saito, M.; Tadokoro, T.; Maekawa, A. Changes in susceptibility of tissues to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexaenoic acid and vitamin E. *Br. J. Nutr.* **78**:655–669; 1997.
- [25] Jenkinson, A.; Franklin, M. F.; Wahle, K.; Duthie, G. G. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **53**:523–528; 1999.
- [26] Delton-Vandenbroucke, I.; Vericel, E.; Januel, C.; Carreras, M.; Lecomte, M.; Lagarde, M. Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:895–904; 2001.
- [27] Lemaitre, D.; Vericel, E.; Polette, A.; Lagarde, M. Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **53**:479–486; 1997.
- [28] Polavarapu, R.; Spitz, D. R.; Sim, J. E.; Follansbee, M. H.; Oberley, L. W.; Rahemtulla, A.; Nanji, A. A. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* **27**:1317–1323; 1998.
- [29] Krishna, R.; Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11**:265–283; 2000.
- [30] Sinha, B. K.; Mimnaugh, E. G. Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Radic. Biol. Med.* **8**:567–581; 1990.
- [31] Fairchild, C. R.; Ivy, S. P.; Kao-Shan, C. S.; Whang-Peng, J.; Rosen, N.; Israel, M. A.; Melera, P. W.; Cowan, K. H.; Goldsmith, M. E. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* **47**: 5141–5148; 1987.
- [32] Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Med. Sci.* **37**:911–917; 1959.
- [33] Morrison, W. R.; Smith, L. M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* **53**:600–608; 1964.
- [34] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55–63; 1983.
- [35] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275; 1951.
- [36] Steghens, J. P.; van Kappel, A. L.; Denis, I.; Collombel, C. Diaminonaphthalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:242–249; 2001.
- [37] Steghens, J. P.; Flourie, F.; Arab, K.; Collombel, C. Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **798**:343–349; 2003.
- [38] Hatam, L. J.; Kayden, H. J. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J. Lipid Res.* **20**:639–645; 1979.
- [39] Kim, H. Y.; Akbar, M.; Lau, A.; Edsall, L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J. Biol. Chem.* **275**:35215–35223; 2000.
- [40] Abulrob, A. N.; Mason, M.; Bryce, R.; Gumbleton, M. The effect of fatty acids and analogues upon intracellular levels of doxorubicin in cells displaying P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *J. Drug Target* **8**:247–256; 2000.
- [41] Zijlstra, J. G.; de Vries, E. G.; Muskiet, F. A.; Martini, I. A.; Timmer-Bosscha, H.; Mulder, N. H. Influence of docosahexaenoic acid in vitro on intracellular adriamycin concentration in lymphocytes and human adriamycin-sensitive and -resistant small-cell lung cancer cell lines, and on cytotoxicity in the tumor cell lines. *Int. J. Cancer.* **40**:850–856; 1987.

- [42] Dianzani, M. U. 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol. Aspects Med.* **24**:263–272; 2003.
- [43] Forman, H. J.; Dickinson, D. A. Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:594–596; 2004.
- [44] Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**:81–128; 1991.
- [45] Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**:83–95; 1999.
- [46] Griffith, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:922–935; 1999.
- [47] Shi, M. M.; Kugelman, A.; Iwamoto, T.; Tian, L.; Forman, H. J. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J. Biol. Chem.* **269**:26512–26517; 1994.
- [48] Rahman, I.; Bel, A.; Mulier, B.; Donaldson, K.; MacNee, W. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**:L80–L86; 1998.
- [49] Dickinson, D. A.; Iles, K. E.; Watanabe, N.; Iwamoto, T.; Zhang, H.; Krzywanski, D. M.; Forman, H. J. 4-Hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:974–987; 2002.
- [50] Tian, L.; Shi, M. M.; Forman, H. J. Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**:126–133; 1997.
- [51] Seo, Y. J.; Lee, J. W.; Lee, E. H.; Lee, H. K.; Kim, H. W.; Kim, Y. H. Role of glutathione in the adaptive tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:1272–1281; 2004.
- [52] O'Brien, M. L.; Tew, K. D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer.* **32A**:967–978; 1996.
- [53] Simon, S.; Roy, D.; Schindler, M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1128–1132; 1994.

Original Contribution

# Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response

Sophie Vibet<sup>a</sup>, Caroline Goupille<sup>a</sup>, Philippe Bougnoux<sup>a</sup>, Jean-Paul Steghens<sup>b</sup>,  
Jacques Goré<sup>a</sup>, Karine Mahéo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Inserm E-0211, Nutrition, Croissance et Cancer; Université François-Rabelais, Tours, France*

<sup>b</sup> *Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France*

Received 26 July 2007; revised 11 January 2008; accepted 11 January 2008

Available online 26 January 2008

## Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA, a lipid of marine origin) has been found to enhance the activity of several anticancer drugs through an oxidative mechanism. To examine the relation between chemosensitization by DHA and tumor cells antioxidant status, we used two breast cancer cell lines: MDA-MB-231, in which DHA increases sensitivity to doxorubicin, and MCF-7, which does not respond to DHA. Under these conditions, reactive oxygen species (ROS) level increased on anthracycline treatment only in MDA-MB-231. This was concomitant with a decreased cytosolic glutathione peroxidase (GPx1) activity, a crucial enzyme for protection against hydrogen and lipid peroxides, while major antioxidant enzyme activities increased in both cell lines in response to ROS. GPx-decreased activity was accompanied by an accumulation of glutathione, the GPx cosubstrate, and resulted from a decreased amount of GPx protein. In rat mammary tumors, when a DHA dietary supplementation led to an increased tumor sensitivity to anthracyclines, GPx1 activity was similarly decreased. Furthermore, vitamin E abolished both DHA effects on chemotherapy efficacy enhancement and on GPx1 inhibition. Thus, loss of GPx response to an oxidative stress in transformed cells may account for the ability of peroxidizable targets such as DHA to enhance tumor sensitivity to ROS-generating anticancer drugs.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Breast cancer; DHA; Glutathione peroxidase; Oxidative stress; Chemotherapy sensitization

## Introduction

Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) enhance the sensitivity of tumor cells to chemotherapy that induces

oxidative stress *in vitro* [1,2] or *in vivo* [3–5]. Among PUFA, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) showed a moderate enhancement of drug efficacy and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) was the most potent to enhance doxorubicin efficacy in breast cancer cell lines [2].

The cytotoxic action of doxorubicin has been mainly related to inhibition of topoisomerase II and to the production of reactive oxygen species (ROS) [6,7]. Thus cardiotoxicity induced by anthracyclines could be mediated through ROS produced during its metabolism [8]. Since DHA, with its 6 double bonds, is very prone to oxidation, the increased membrane unsaturation index resulting from a DHA supplementation would provide more abundant targets for ROS generated by doxorubicin metabolism. *In vivo* and *in vitro* studies on the influence of DHA supplementation reported higher peroxidation and oxidative stress resulting from ROS attack, as demonstrated by an increase of thiobarbituric acid-reactive substances, conjugated dienes, or

**Abbreviations:** CAT, catalase; carboxy-DCFDA, 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate; CM-H<sub>2</sub>DCFDA, (5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester; DHA, docosahexaenoic acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; EPA, eicosapentaenoic acid;  $\gamma$ GCS, gamma-glutamine cysteine synthetase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; IC<sub>25</sub>, drug concentration producing 25% cell toxicity; NMU, *N*-methylnitrosourea; RFU, relative fluorescence unit; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; tert-BHP, *tert*-butyl hydroperoxide.

\* Corresponding author. Université François-Rabelais, Inserm E-0211 Nutrition, Croissance et Cancer, Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 Tours Cedex, France. Fax: +33 247 36 62 26.

E-mail address: [karine.mahéo@univ-tours.fr](mailto:karine.mahéo@univ-tours.fr) (K. Mahéo).

malondialdehyde and a decrease of antioxidant vitamins [9–12]. Products of lipid peroxidation such as hydroperoxides and aldehydes have been implicated in the cytotoxic process and increase the drug efficacy [13]. Thus, conditions favoring an increased lipid peroxidation in response to doxorubicin would lead to a higher activity of the drug.

In previous studies, we observed that sensitization of rat mammary tumor to chemotherapy or radiotherapy by n-3 PUFA was suppressed in the presence of antioxidant molecules, such as vitamin E [14,15]. Therefore the antioxidant status appears to be crucial determinant in the sensitivity of tumors to ROS-generating anticancer therapy.

Protection against oxidative damages is normally ensured by nonenzymatic (especially vitamins provided by diet) and enzymatic defenses [16]. Superoxide dismutase (SOD) reduces superoxide anion into hydrogen peroxide [17]. Catalase (CAT) dismutates hydrogen peroxide [18]. Glutathione peroxidase (GPx), a selenoenzyme, catalyzes the reduction of hydrogen and lipid peroxides by oxidizing reduced glutathione (GSH) which is recycled by glutathione reductase (GR) [19,20].

GSH is synthesized from glutamate and cysteine by gamma-glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ GCS) [21]. Changes in the activity of these antioxidant enzymes have also been described during PUFA supplementation [22,23].

Our aim was to take an advantage of the differential sensitivities of two breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 to doxorubicin and DHA in order to investigate mechanisms involved in this chemosensitization. Previous observations have reported that DHA supplementation enhanced cytotoxic activity of anthracyclines in MDA-MB-231, but not in MCF-7. In MDA-MB-231, sensitization to doxorubicin by DHA was associated with an increase in malondialdehyde (a final product of lipid peroxidation) and in reduced glutathione (GSH) levels, indicating that an oxidative stress took place. The slight increase in lipid peroxidation observed in MCF-7 during DHA supplementation was not sufficient to amplify doxorubicin cytotoxic action. This suggests that differential antioxidant capacities of cells may account for DHA chemosensitization [24].

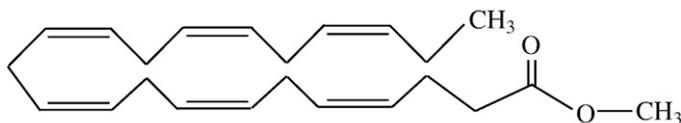
The present study compares the antioxidant status within MCF-7 and MDA-MB-231 cells and examines the influence of DHA supplementation on this status. It was evaluated through the measure of ROS level and the activities of the main antioxidant enzymes. We report here that sensitization of breast cancer cell lines is associated with a lack of GPx1 response to an oxidative stress. Further, we used rat autochthonous mammary tumors induced by *N*-methylnitrosourea (NMU) to investigate whether GPx expression was associated with the enhancement of mammary tumor sensitivity to chemotherapy.

## Materials and methods

### Drugs and chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Chimie, France) or from Teva Pharma S.A. (France) for doxorubicin (chlorhydrate de doxo-

rubicine Teva, 10 mg/5 ml). Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) was used as methyl ester.



The fatty acid was dissolved in 99% ethanol and stored as stock solution (150 mM) under nitrogen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . CM-H<sub>2</sub>DCFDA (C-6827: 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester) and carboxy-DCFDA (C-369: 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate) were purchased from Molecular Probes (Invitrogen, France). To measure protein concentration a colorimetric dosage based on the Biuret reaction with bicinchoninic acid (Uptima, Interchim, France) was used.

### Cell culture

The human breast carcinoma cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, France). Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Cambrex, France). Cells were seeded at low density ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and 1 day after seeding the medium was replaced by the same growth medium containing 0.02% ethanol (control), DHA (30  $\mu\text{M}$ ), or doxorubicin at IC<sub>25</sub> (concentration producing 25% toxicity): 5 nM for MDA-MB-231 and 20 nM for MCF-7. The cells were cultured 1 week before experiments ( $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>). Culture medium was changed each 24 h. The concentration of selenium in culture medium was determined by electrothermal atomic-absorption spectroscopy, as described [25]. Viability of cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Formazan crystals produced by metabolically active cells were dissolved with DMSO as described [26]. Absorbance of formazan was measured at 570 nm using a multiwell plate reader (Molecular Devices, USA).

### Animal experiment

Female Sprague-Dawley rats aged 40 days (Harlan Gannat, France) were housed in a temperature/humidity-controlled room ( $22^{\circ}\text{C}$  and 60%, respectively) under reversed light/dark conditions using a 12 h on/off schedule and had ad libitum access to food and water. After tumorigenesis initiation by NMU [27], rats were randomly divided into two groups ( $n = 12$ ) fed different diets containing 15% lipids (w/w) up to the end of the experiment: (i) the "control" diet contained peanut (12%) and rapeseed (3%) oils; (ii) the "fish oil" diet contained peanut (8%), rapeseed (2%), and fish (5%) oils. Fish oil was purchased from Phosphotech (Phosphotech, France) and contained DHA (50%) and EPA (23%). When the surface of the mammary tumors

reached 3 cm<sup>2</sup>, rats were killed by a lethal injection of pentobarbital, and tumors were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. All animal studies and experimental procedures were approved by the animal care committee: Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale, Centre-Limousin.

#### Measurement of reactive oxygen species

ROS level was determined using ROS-sensitive (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) and ROS-insensitive (carboxy-DCFDA) fluorescent probes. Cells cultured in 9 cm<sup>2</sup> multiwell plates were incubated with the fluorescent probe (10 μM) at 37°C, in the dark for 30 min. The ROS-sensitive probe, CM-H<sub>2</sub>DCFDA, is a cell-permeable indicator for ROS (hydrogen peroxide, hydroxyl and peroxy radicals) and becomes fluorescent when the acetate groups are hydrolyzed by intracellular esterases and oxidation occurs within the cell. The ROS-insensitive probe was used as a control to detect changes in uptake, ester cleavage, and efflux. After incubation, cells were rinsed twice with cold Hanks-Hepes (pH 7.3, 4°C), and 1 ml of distilled water (4°C) was added before ultrasound lysis. Whole cells lysates were centrifuged (10,000×g, 5 min, 4°C) and fluorescence intensities were measured on supernatants at 522 nm (excitation wavelength: 480 nm) with an Hitachi F-2500 spectrofluorimeter (ScienceTec, Les Ulis, France).

#### Enzymatic activities

MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells (75 cm<sup>2</sup> flask) or rat mammary tumors samples (30 mg) were homogenized in 500 μl of cold buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM). After centrifugation (10,000×g, 15 min, 4°C), the supernatant was assayed for total cytosolic protein and for GPx1 activity adapted to the method developed by Paglia and Valentine [28]. The reaction mixture (200 μl) consisted of cytosolic proteins (200 μg from cell culture or 40 μg from tumors), 0.14 mM NADPH, 2 mM GSH, and 1 U/ml glutathione reductase (one unit will reduce 1 μmol of oxidized glutathione per min) in 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA buffer, at 25°C. The reaction was started by addition of *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BHP) 100 μM (final concentration) as substrate for GPx1. NADPH disappearance was monitored spectrophotometrically at 30-s intervals for 5 min at 340 nm using a multiwell plate reader (Molecular Devices, USA). GPx activity was calculated as nanomoles of NADPH oxidized per minute per milligram proteins.

The activity of γGCS was determined by a new kinetic LC/MS method according to Chik et al. [29]. GR was measured on a Kone analyzer with a method adapted from Worthington and Rosemeyer [30]. The first reagent (200 μl) was Tris-HCl 90 mM, EDTA 1 mM, and NADPH 0.16 mM. The starting reagent was oxidized glutathione 4.6 mM. The kinetic analysis was carried out at 37°C and 340 nm for 2 min.

Cells cultured in multiwell plates (9 cm<sup>2</sup>) were harvested by using a rubber policeman, resuspended in cold lysis buffer (Hepes 20 mM, EDTA 1 mM, mannitol 210 mM, sucrose 70 mM, pH 7.2) and assayed for SOD activity and (potassium phosphate 50 mM, pH 7, containing 1 mM EDTA) for CAT activity. After sonication and centrifugation at 4°C (1500×g, 5 min for SOD, and 10,000×g,

15 min for CAT) the supernatant was used for SOD (cytosolic and mitochondrial) or CAT activities using quantitative colorimetric assay (Superoxide Dismutase Assay 707002 and Catalase Assay Kit 706002, Cayman, France).

#### Measurement of reduced glutathione

Reduced glutathione (GSH) was measured by the HPLC/MS method [31] with only a modification for the sample preparation. Cell extracts (50 μl) were first mixed with a solution containing *N*-ethylmaleimide, EDTA, and γ-glutamylglutamic acid as an internal standard, incubated 20 min at room temperature, and then deproteinized with sulfosalicylic acid.

#### Western blotting of GPx

Cell lysates (150 μg proteins) were subjected to SDS-polyacrylamide (12%) gel electrophoresis and electrotransferred to a nitrocellulose membrane. After blocking with TTBS buffer (Tris base 200 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.6) containing 5% nonfat dry milk (NFDM), membrane was incubated overnight with a mouse monoclonal antibody (anti-glutathione peroxidase clone 347 purchased from Clinisciences, France) raised against human GPx1, 22.5 kDa (1:250 in TTBS buffer containing 2% NFDM). The bound antibodies were detected with horseradish-conjugated goat anti-mouse IgG (purchased from Southern Biotech, France) diluted 1:3000 in TTBS NFDM 2%. Immunoreactive GPx was revealed by chemiluminescence reagent (ECL Western blotting detection reagents, Amersham, France), identified with comparison with GPx standard (Sigma, France) and molecular mass prestained standards. Bands were quantified using the Quantity One acquisition software (Bio-Rad, France).

#### GPx mRNA level

The quantification of GPx mRNA was performed by real-time quantitative PCR with the 18S rRNA as reference. 18S rRNA was previously controlled to be unaffected by DHA. The primer sequences of human GPx1 used were: 5'-GGGACTACACCCA-GATGAA-3' (sense) and 5'-TCTCTTCGTTCTTGCGTTC-3' (antisense). Total RNAs, extracted with the TRIzol reagent, were treated with DNase I and reverse-transcribed using the SuperScript II reverse transcriptase. Quantitative real-time PCR was carried out with MyiQ thermocycler (Bio-Rad) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit. All reagents were purchased from Invitrogen. PCR protocol was applied: 2 min start at 50°C, followed by 50 cycles of denaturation (15 s at 95°C), annealing (30 s at 60°C), and synthesis (10 s at 72°C) in a total volume of 25 μl. Using the comparative C<sub>T</sub> method (C<sub>T</sub>: cycle threshold value), the amount of mRNAs was expressed as ΔC<sub>T</sub> (C<sub>T</sub><sup>GPx</sup> - C<sub>T</sub><sup>18S rRNA</sup>).

#### Statistics

Statistical analysis was carried out using one-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison tests and Mann-

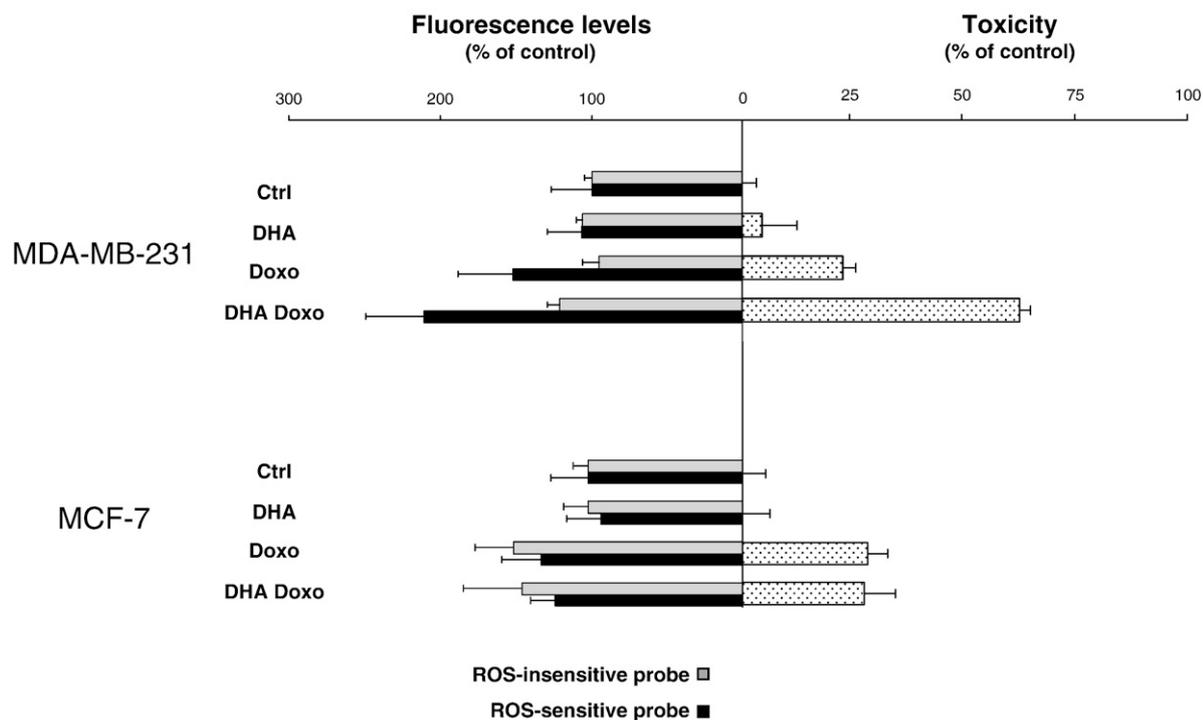


Fig. 1. Differential effect of DHA on ROS level and doxorubicin toxicity in two breast cancer cell lines. MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines were grown for 7 days in the presence or absence of DHA (30  $\mu$ M) and doxorubicin at IC<sub>25</sub> (DOX). Cell viability was measured by the tetrazolium test. Data are means $\pm$ SD of three independent assays in triplicate. Fluorescence intensity levels (relative fluorescence unity/mg proteins) obtained with the ROS-sensitive probe (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) and the ROS-insensitive probe (carboxy-DCFDA) were expressed as percentage of control (see Materials and methods). Data are means $\pm$ SD of four independent assays, with 6 replicates.

Whitney test (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc);  $P < 0.05$  was regarded as significant.

## Results

### Reactive oxygen species level

Fig. 1 shows the differential effects of DHA on ROS level and on doxorubicin cell toxicity in MDA-MB-231 and MCF-7 cells.

Under control conditions, the level of ROS measured with ROS-sensitive fluorescent probe (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) was  $1882 \pm 503$  in MDA-MB-231 and  $2332 \pm 559$  RFU/mg proteins in MCF-7 cells. No increase of ROS level or cell toxicity was observed in the two cell lines after DHA supplementation compared to control conditions. In MDA-MB-231, ROS-sensitive fluorescence levels were linked to ROS production since ROS-insensitive fluorescence levels remained unchanged whatever the conditions. In these cells, doxorubicin led to a ROS increase

Table 1  
Effect of DHA and doxorubicin on antioxidant defense level in doxorubicin-treated MDA-MB-231 cells

| MDA-MB-231         | Control        | DHA                              | DOX                             | DOX/DHA                                               |
|--------------------|----------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| SOD (U/g)          | 302 $\pm$ 64   | 309 $\pm$ 70                     | 988 $\pm$ 122*** <sup>(a)</sup> | 938 $\pm$ 146 *** <sup>(a)</sup>                      |
| CAT (nmol/min/mg)  | 22 $\pm$ 7     | 22 $\pm$ 8                       | 18 $\pm$ 4                      | 27 $\pm$ 6                                            |
| GPx1 (pmol/min/mg) | 1991 $\pm$ 247 | 1441 $\pm$ 341 ** <sup>(a)</sup> | 1444 $\pm$ 435** <sup>(a)</sup> | 773 $\pm$ 264 *** <sup>(a)</sup><br>** <sup>(b)</sup> |
| $\gamma$ GCS (U/g) | 0.5 $\pm$ 0.2  | 0.9 $\pm$ 0.2                    | 0.8 $\pm$ 0.2                   | 1.9 $\pm$ 0.5 ** <sup>(a)</sup><br>** <sup>(b)</sup>  |
| GR (U/g)           | 28 $\pm$ 6     | 36 $\pm$ 4                       | 31 $\pm$ 9                      | 72 $\pm$ 18 ** <sup>(a)</sup><br>*** <sup>(b)</sup>   |
| GSH ( $\mu$ mol/g) | 54 $\pm$ 7     | 112 $\pm$ 11 *** <sup>(a)</sup>  | 67 $\pm$ 3                      | 159 $\pm$ 40 *** <sup>(a)</sup><br>*** <sup>(b)</sup> |

MDA-MB-231 cells were grown for 7 days with or without DHA (30  $\mu$ M) and treated or not with doxorubicin (DOX) at IC<sub>25</sub>. Data are means $\pm$ SD of three or four independent assays in triplicate. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test to control <sup>(a)</sup> and to doxorubicin <sup>(b)</sup>. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

of 50% ( $P < 0.05$ ). Compared to doxorubicin alone, DHA supplementation further increased both ROS levels ( $2856 \pm 685$  versus  $3972 \pm 727$  RFU/mg proteins;  $P < 0.01$ ) and drug toxicity (by 2-fold,  $P < 0.01$ ). In MCF-7 cells, similar increases of fluorescence levels of ROS-sensitive and ROS-insensitive probes (carboxy-DCFDA) were observed in doxorubicin-treated cells compared to control. Thus the increase of ROS-sensitive fluorescence observed in doxorubicin cells cannot be attributed to ROS production but to changes in uptake, ester cleavage, or efflux of probe. In these cells, no doxorubicin toxicity increase by DHA was observed.

#### Antioxidant level in MDA-MB-231 cells

Enzyme (SOD, CAT, GPx1,  $\gamma$ GCS, GR) activities and GSH levels were measured in MDA-MB-231 cells in the presence and absence of DHA and doxorubicin (Table 1). GPx1 activity was reduced by 30% in DHA-supplemented MDA-MB-231 cells ( $P < 0.01$ ), whereas no variations of SOD and CAT activities were observed. Despite no significant change of GSH-related enzymes ( $\gamma$ GCS and GR), GSH was increased by 2-fold in DHA-supplemented cells ( $P < 0.001$ ).

Major changes of glutathione-related enzyme were observed with doxorubicin in DHA supplemented cells.  $\gamma$ GCS, GR, and GSH content were induced by 2.3-fold compared to doxorubicin alone ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , and  $P < 0.001$ , respectively). Doxorubicin alone affected SOD and GPx1 activities. SOD activity was increased by 3-fold compared to control ( $P < 0.001$ ). Compared to doxorubicin alone, cotreatment of doxorubicin plus DHA did not further increase SOD activity. GPx1 was decreased by 1.4-fold ( $P < 0.01$ ) with doxorubicin treatment. Cotreatment with doxorubicin and DHA led to a stronger decrease (by 50%) of GPx1 activity compared to doxorubicin or DHA alone ( $P < 0.01$ ). The decrease of this selenoenzyme was not due to a selenium deficiency because the culture medium contained  $12.2 \pm 0.7$   $\mu$ g/L selenium (155 nM). A supplementation with higher levels of selenium (sodium selenite 250 nM) was performed for 7 days. Under these conditions, the increase of doxorubicin toxicity by

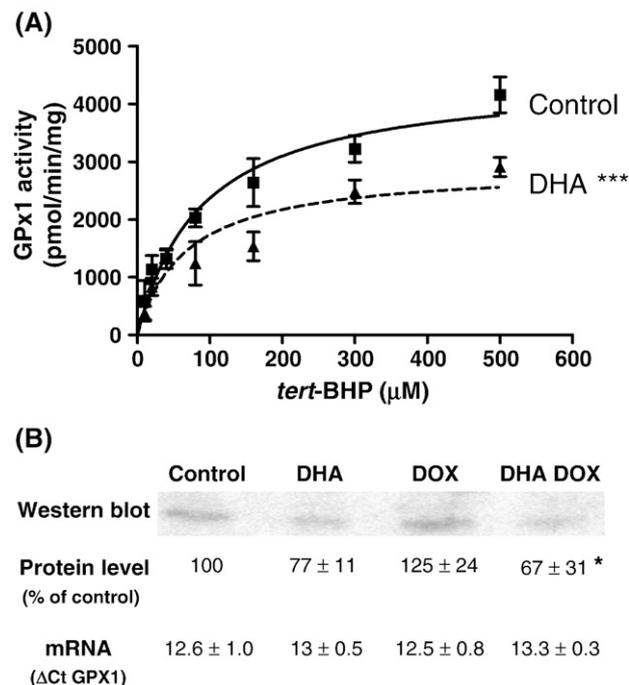


Fig. 2. Decrease of GPx protein level in DHA-supplemented MDA-MB-231. MDA-MB-231 cells were grown for 7 days in the presence or absence of DHA (30  $\mu$ M) and doxorubicin at IC<sub>25</sub>. (A) GPx1 activity of control or DHA-supplemented MDA-MB-231 cells was measured with different concentrations of *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BHP) (in the range of 10–500  $\mu$ M) and a fixed GSH concentration of 2 mM, *F* test, \*\*\*  $P < 0.001$ . (B) Western blot is representative of three independent experiments. Immunoreactive GPx was revealed by ECL, identified with comparison with GPx standard and molecular mass prestained standards. The results of the quantification by densitometry are expressed as percentage of control and are means  $\pm$  SD of 3 independent experiments. Comparison to control by one-way ANOVA, and Newman-Keuls multiple comparison tests \*  $P < 0.05$ . Quantification of GPx1 mRNA level by quantitative real-time PCR. The amount of mRNAs was expressed as  $\Delta C_T$  ( $C_T$  GPx –  $C_T$  18S rRNA),  $C_T$ : cycle threshold value. Data are means  $\pm$  SD of 4 independent experiments.

DHA was still observed in MDA-MB-231 cells (data not shown). This selenium supplementation induced higher baseline levels in GPx activity (64 nmol/min/mg proteins). Under these conditions,

Table 2  
Effect of DHA and doxorubicin on antioxidant defense level in doxorubicin-treated-MCF-7 cells

| MCF-7              | Control       | DHA                            | DOX                               | DOX/DHA                                                 |
|--------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| SOD (U/g)          | 340 $\pm$ 53  | 388 $\pm$ 92                   | 663 $\pm$ 156 ** <sup>(a)</sup>   | 687 $\pm$ 46 ** <sup>(a)</sup>                          |
| CAT (nmol/min/mg)  | 14 $\pm$ 10   | 15 $\pm$ 8                     | 10 $\pm$ 3                        | 16 $\pm$ 5                                              |
| GPx1 (pmol/min/mg) | 404 $\pm$ 120 | 566 $\pm$ 104                  | 2092 $\pm$ 389 *** <sup>(a)</sup> | 4265 $\pm$ 755 *** <sup>(a)</sup><br>*** <sup>(b)</sup> |
| $\gamma$ GCS (U/g) | 0.9 $\pm$ 0.2 | 1.2 $\pm$ 0.2 * <sup>(a)</sup> | 0.8 $\pm$ 0.1                     | 1.5 $\pm$ 0.1 ** <sup>(a)</sup><br>** <sup>(b)</sup>    |
| GR (U/g)           | 74 $\pm$ 17   | 86 $\pm$ 10                    | 67 $\pm$ 9                        | 84 $\pm$ 10                                             |
| GSH ( $\mu$ mol/g) | 52 $\pm$ 9    | 53 $\pm$ 3                     | 89 $\pm$ 5 *** <sup>(a)</sup>     | 66 $\pm$ 5 * <sup>(a)</sup><br>** <sup>(b)</sup>        |

MCF-7 cells were grown for 7 days with or without DHA (30  $\mu$ M) and treated or not with doxorubicin (DOX) at IC<sub>25</sub>. Data are means  $\pm$  SD of three or four independent assays in triplicate. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test to control <sup>(a)</sup> and to doxorubicin <sup>(b)</sup>. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

DHA and doxorubicin showed similar effects on GPx1 activity in MDA-MB-231 cells than those observed without selenium supplementation.

#### Antioxidant level in MCF-7 cells

The same enzyme activities were measured in MCF-7 cells treated with DHA, doxorubicin, or doxorubicin plus DHA (Table 2). The basal level of enzyme activities was the same in the two cell lines except for GPx1 which was 5-fold lower and for GR which was 2.5-fold higher in MCF-7 than in MDA-MB-231.

DHA supplementation did not change antioxidant SOD and CAT activities in MCF-7 cells.  $\gamma$ GCS activity was slightly increased (by 1.3-fold) by DHA ( $P < 0.05$ ). GSH level and GR activity remained unchanged in DHA-supplemented cells compared to control cells.

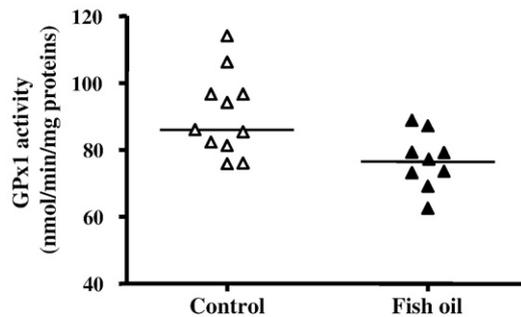
Doxorubicin alone increased SOD and GPx1 activities by 2- and 5-fold compared to control ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively). CAT activity was not changed with doxorubicin treatment. Whereas GSH-related enzymes ( $\gamma$ GCS and GR) were unchanged, GSH level was increased by 1.7-fold in doxorubicin-treated cells compared to control ( $P < 0.001$ ).

Compared to doxorubicin alone, cotreatment did not further increase SOD activity. Doxorubicin treatment of DHA-supplemented MCF-7 cells led to an increase by 2-fold of GPx1 activity compared to doxorubicin ( $P < 0.001$ ) or by 11-fold compared to control ( $P < 0.001$ ). GSH level was slightly enhanced by 1.3-fold with cotreatment compared to control ( $P < 0.05$ ).  $\gamma$ GCS activity increased by 1.9-fold in DHA-supplemented cells treated with doxorubicin compared to doxorubicin alone ( $P < 0.01$ ).

#### Kinetic parameters and expression of GPx

The relation between the enzyme-catalyzed reaction velocity and the concentration of *tert*-butyl hydroperoxide was measured with a fixed concentration of GSH in excess (2 mM). GPx enzyme is known to exhibit a ping pong mechanism. However, as already described, GPx activity displayed a pseudo Michaelis-Menten kinetic, which tends toward steady-state value when one of the two substrates is set in large excess (GSH: 2 mM) [32]. The curves shown in Fig. 2A were significantly different between control and DHA-supplemented MDA-MB-231 (F test,  $P < 0.001$ ). Under these conditions, apparent kinetic parameters  $K_m^{tert-BHP}$  and  $V_m^{tert-BHP}$  of GPx1 for *tert*-BHP were determined in control

#### (A) without chemotherapy



#### (B) with chemotherapy

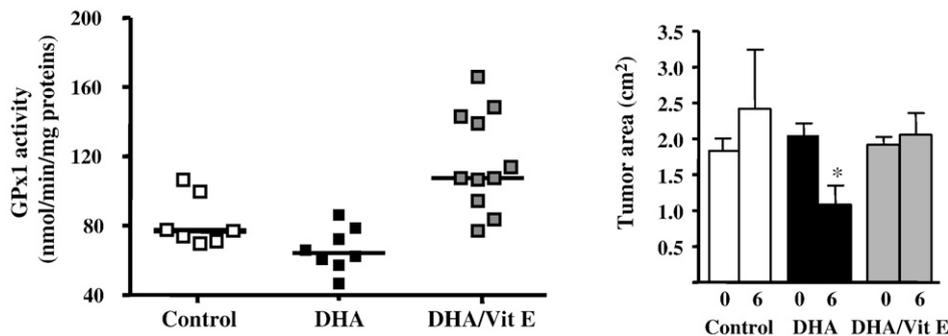


Fig. 3. GPx1 activity of rat mammary tumors. Relation between the diet and the enhancement of chemotherapy efficacy. (A) Effect of a fish oil diet (enriched in DHA and EPA) on GPx1 activity in mammary tumors. Twenty-four rats were initiated with NMU, and then received either a control or a fish oil-enriched diet. Mammary tumors were allowed to grow spontaneously. GPx1 activity was measured in tumors sampled at autopsy, as described under Materials and methods. (B) Effect of DHA- and DHA/vitamin E-enriched diets on GPx1 activity of mammary tumors (left panel) and on tumor area (right panel). Rats were initiated with NMU, and then assigned to three dietary groups: control, DHASCO (containing 40% DHA), and DHASCO/vitamin E (500 IU/kg food). When the size of mammary tumors reached 1.5 cm<sup>2</sup>, epirubicin (an anthracycline) was injected ip weekly. Epirubicin efficacy was evaluated as a function of tumor regression (percentage area change) before (0 weeks) and at the end of chemotherapy (6 weeks). The number of rats per group was between 8 and 12 rats. Symbols, value from one rat tumor; lines, medians; \*  $P < 0.05$ .

and DHA-supplemented cells.  $K_{m(\text{app})}^{\text{tert-BHP}}$  value was not significantly different between control and DHA-supplemented cells ( $68 \pm 20$  versus  $89 \pm 21$   $\mu\text{M}$ , respectively,  $P > 0.05$ ), suggesting that enzyme apparent affinity for hydroperoxydes was not changed by DHA supplementation. By contrast,  $V_{m(\text{app})}^{\text{tert-BHP}}$  was reduced by 1.5-fold in DHA-supplemented cells compared to control ( $2907 \pm 293$  versus  $4480 \pm 393$  pmol/min/mg, respectively,  $P < 0.01$ ).

Densitometry analysis of Western blot showed a decrease by  $\approx 20\%$  of GPx protein level (23 kD) in DHA-supplemented MDA-MB-231 compared to control cells (Fig. 2B). A decrease by 46% of the protein level was observed in DHA-supplemented MDA-MB-231 treated by doxorubicin compared to doxorubicin alone ( $P < 0.05$ ). The protein expression was not associated with a similar change of mRNA because analysis by quantitative real-time PCR of the GPx1 (Fig. 2B) did not show any variation of gene expression whatever the condition used. In MCF-7 cells, immunoblot analysis did not show any detectable expression of GPx1 protein whatever the treatment.

#### GPx activity in rat mammary tumors

To determine whether the inhibition of GPx1 activity by DHA observed in vitro in breast cancer cell lines exists in vivo, we measured this enzyme activity in mammary tumors in two groups of rats fed a diet enriched or not in DHA/EPA (fish oil). A decrease of GPx1 activity was observed in fish oil-supplemented tumors (means:  $90 \pm 5$  and  $76 \pm 3$  nmol/min/mg proteins in control and fish oil groups, respectively,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3A).

To investigate whether DHA-enhanced sensitivity of mammary tumors to epirubicin (an anthracycline used in human care) was associated with a decrease in GPx1 activity in vivo, we took advantage of the availability of frozen mammary tumor tissue

from a previous experiment [14]. This experiment was aimed to evaluate the ability of a dietary supplementation with DHA to increase the sensitivity of NMU-induced mammary tumors to epirubicin, and the ability of vitamin E to suppress the effect of DHA. The experimental group was supplemented with DHASCO, an algae-derived oil containing 40% DHA. Rats from the experimental or control groups received weekly 6 injections of epirubicin (2.5 mg/kg, a noncardiotoxic dose [33]) when the mammary tumors reached 1.5 cm<sup>2</sup>. Tumor GPx1 activity was 20% lower in the DHA-supplemented group than in the control group ( $P < 0.05$ ), (Fig. 3B, left), under conditions where tumor sensitivity to epirubicin was increased (Fig. 3B, right). Tumor GPx1 activity was restored (+40% compared to DHA alone) in the DHA group with additional vitamin E (500 IU/kg food) (Fig. 3B, left), under conditions where DHA-induced chemosensitization was abolished by vitamin E (Fig. 3B, right).

Fig. 4 shows an inverse correlation between epirubicin efficacy (expressed as percentage of tumor regression) and GPx1 activity ( $r^2 = 0.488$ ,  $F$  test  $P < 0.001$ ). Tumors with the lowest GPx1 activity were the most sensitive to chemotherapy.

#### Discussion

Our study demonstrates that sensitization of breast cancer cells to doxorubicin by DHA is associated with a marked decrease in GPx1, a major antioxidant enzyme which detoxifies hydrogen and fatty acid peroxides by using glutathione as a hydrogen donor. The comparison between the antioxidant equipment of the two cell lines allowed us to make this observation. These two cell lines were MDA-MB-231, on the one hand, which sensitivity to doxorubicin was increased by DHA, and MCF-7, on the other hand, which was not chemosensitizable. Our cellular findings have been extended to mammary tumor tissues from rats. GPx1 activity was decreased in the tumors from rats receiving dietary groups containing EPA/DHA or DHA alone. This modification of GPx response in the DHA supplemented group was associated with an increase of tumor sensitivity to anthracyclines. Conversely, when antioxidant vitamin E was added in the DHA diet, DHA-induced chemosensitization was abolished and tumor GPx1 activity was restored. This suggests that the inhibition of GPx1 activity could be a major mechanism in tumor sensitization to anthracyclines. Actually, tumor regression during chemotherapy was correlated to low GPx1 activity.

Numerous in vivo and in vitro studies have reported a higher lipid peroxidation and oxidative stress as a consequence of DHA supplementation [9,11]. ROS generated during doxorubicin metabolism will oxidize membrane DHA and generate a wide range of very reactive lipid peroxidation products, such as malondialdehyde, hydroxyalkenals, and others. Accumulation of these deleterious products leads to cell toxicity [13]. In the present study, we observed that the increase of doxorubicin activity induced by DHA in MDA-MB-231 was associated with a higher level of ROS. This is in accordance with the increase in malondialdehyde level, indicative of lipid peroxidation, associated with sensitization to doxorubicin by DHA in MDA-MB-231 cells [24]. By contrast doxorubicin or doxorubicin plus DHA did not increase ROS level in MCF-7, suggesting an

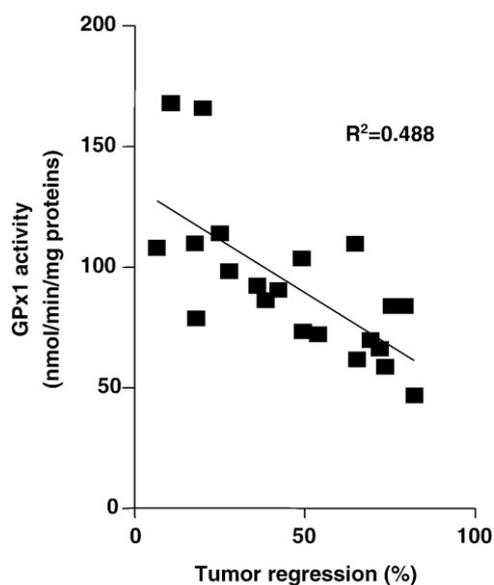


Fig. 4. Inverse correlation between GPx1 activity and tumor regression. GPx1 activity was measured in 21 mammary tumors from rats treated with epirubicin. Size of the tumor at initiation of chemotherapy was set as the reference for determining the percentage of tumor regression.

efficient detoxication of ROS and accounting for the absence of chemosensitization by DHA.

Doxorubicin treatment in DHA-treated cells induced a marked antioxidant response compared to doxorubicin alone in the two cell types, indicating a cellular response to an oxidative stress. Antioxidant enzymes are known to be upregulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and other ROS [34,35]. In the present study, the major difference between the two breast cancer cell lines was the GPx1 regulation of activity, which was down-regulated by DHA and doxorubicin in MDA-MB-231 and not in MCF-7 cells. This decreased activity was accompanied by an accumulation of glutathione, the GPx cosubstrate. Inhibition of GPx has been described to be sufficient to alter cell survival, and low GPx activity is especially lethal under conditions of oxidative stress such as treatment with anti-neoplastic agents [36–38].

Similar to the observation made in MCF-7 cells, GPx activity has been found to be enhanced after DHA supplementation in several cell types, such as human platelets [22] or endothelial cells [39]. However GPx1 protein levels remain undetectable in MCF-7 as other teams described in several studies [40,41]. Opposite effects of DHA on GPx1 expression have already been described in bovine retinal and bovine aortic endothelial cells [12]. In our study, the decreased GPx1 activity induced by DHA in MDA-MB-231 was associated with a decreased protein level but not with a decreased mRNA, suggesting an effect of DHA at a post-transcriptional level. A down-regulation of GPx4 protein level by DHA in MDA-MB-231 could not be ruled out, since such an event has been recently described in other human cancer cell lines [42].

How could a post-transcriptional regulation of GPx by DHA be understood? One possibility is that GPx could be damaged by lipid peroxidation products, which were strongly induced in DHA-supplemented MDA-MB-231 cells treated by doxorubicin [24]. These products have been described to lead to a loss of GPx activity, probably by a modification of the selenocysteine residue at the active site of the enzyme [43,44], and GPx inactivated by free radicals has been reported to be degraded by proteases [45].

The differential response of GPx to DHA between the two cell lines remains unclear. DHA is known to bind to the nuclear retinoid receptor RXR [46,47]. The RXR pathway has been suggested to be involved because GPx1 expression was inhibited in RXR<sub>α</sub> knockout mice [48] and because this receptor has been reported to be inactive in MDA-MB-231 whereas it was localized to active transcription sites in MCF-7 [49].

Other possibilities potentially accounting for a limited response of GPx1 to an oxidative stress include an allelic loss at the GPx1 locus, which has precisely been reported in cancer cells [50]. Whatever the mechanism involved, the membrane incorporation of peroxidizable targets in cancer cells during DHA supplementation and the lack of an appropriate GPx response may participate in enhancing their sensitivity to therapies generating ROS.

## Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (Comités d'Indre et Loire, Loir et Cher, Indre), by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Cancéropôle Grand Ouest (ACI 2004), and

by the Association pour la Recherche sur le Cancer. Sophie Vibet was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Caroline Goupille was supported by the University Hospital Bretonneau, Tours.

## References

- [1] Kinsella, J. E.; Black, J. M. Effects of polyunsaturated fatty acids on the efficacy of antineoplastic agents toward L5178Y lymphoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **45**:1881–1887; 1993.
- [2] Germain, E.; Chajes, V.; Cognault, S.; Lhuillery, C.; Bougnoux, P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int. J. Cancer* **75**:578–583; 1998.
- [3] Borgeson, C. E.; Pardini, L.; Pardini, R. S.; Reitz, R. C. Effects of dietary fish oil on human mammary carcinoma and on lipid-metabolizing enzymes. *Lipids* **24**:290–295; 1989.
- [4] Shao, Y.; Pardini, L.; Pardini, R. S. Intervention of transplantable human mammary carcinoma MX-1 chemotherapy with dietary menhaden oil in athymic mice: increased therapeutic effects and decreased toxicity of cyclophosphamide. *Nutr. Cancer* **28**:63–73; 1997.
- [5] Hardman, W. E.; Avula, C. P.; Fernandes, G.; Cameron, I. L. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* **7**:2041–2049; 2001.
- [6] Sinha, B. K.; Mimnaugh, E. G.; Rajagopalan, S.; Myers, C. E. Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res.* **49**:3844–3848; 1989.
- [7] Quiles, J. L.; Huertas, J. R.; Battino, M.; Mataix, J.; Ramirez-Tortosa, M. C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* **180**:79–95; 2002.
- [8] Singal, P. K.; Iliskovic, N.; Li, T.; Kumar, D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J.* **11**:931–936; 1997.
- [9] Palozza, P.; Sgarlata, E.; Luberto, C.; Piccioni, E.; Anti, M.; Marra, G.; Armelao, F.; Franceschelli, P.; Bartoli, G. M. n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**:297–304; 1996.
- [10] Kubo, K.; Saito, M.; Tadokoro, T.; Maekawa, A. Changes in susceptibility of tissues to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexaenoic acid and vitamin E. *Br. J. Nutr.* **78**:655–669; 1997.
- [11] Jenkinson, A.; Franklin, M. F.; Wahle, K.; Duthie, G. G. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **53**:523–528; 1999.
- [12] Delton-Vandenbroucke, I.; Vericel, E.; Januel, C.; Carreras, M.; Lecomte, M.; Lagarde, M. Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:895–904; 2001.
- [13] Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**:81–128; 1991.
- [14] Colas, S.; Maheo, K.; Denis, F.; Goupille, C.; Hoinard, C.; Champeroux, P.; Tranquart, F.; Bougnoux, P. Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin. Cancer Res.* **12**:5879–5886; 2006.
- [15] Colas, S.; Paon, L.; Denis, F.; Prat, M.; Louisot, P.; Hoinard, C.; Le Floch, O.; Ogilvie, G.; Bougnoux, P. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int. J. Cancer* **109**:449–454; 2004.
- [16] Nordberg, J.; Arner, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1287–1312; 2001.
- [17] Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:337–349; 2002.
- [18] Kirkman, H. N.; Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* **32**:44–50; 2007.

- [19] Brigelius-Flohe, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:951–965; 1999.
- [20] Arthur, J. R. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**:1825–1835; 2000.
- [21] Hayes, J. D.; McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* **31**:273–300; 1999.
- [22] Lemaitre, D.; Vericel, E.; Polette, A.; Lagarde, M. Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **53**:479–486; 1997.
- [23] Polavarapu, R.; Spitz, D. R.; Sim, J. E.; Follansbee, M. H.; Oberley, L. W.; Rahemtulla, A.; Nanji, A. A. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* **27**:1317–1323; 1998.
- [24] Maheo, K.; Vibet, S.; Steghens, J. P.; Dartigeas, C.; Lehman, M.; Bougnoux, P.; Gore, J. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **39**:742–751; 2005.
- [25] Nève, J.; Chamart, S.; Molle, L. Optimization of a direct procedure for the determination of selenium in plasma and erythrocytes using Zeeman effect atomic absorption spectroscopy. In: Brätter, P., Schramel, P., eds. *Trace Elem. Anal. Chem. Med. Biol.* Berlin: de Gruyter; 1987: 349–358.
- [26] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55–63; 1983.
- [27] Lhuillery, C.; Bougnoux, P.; Groscolas, R.; Durand, G. Time-course study of adipose tissue fatty acid composition during mammary tumor growth in rats with controlled fat intake. *Nutr. Cancer* **24**:299–309; 1995.
- [28] Paglia, D. E.; Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**:158–169; 1967.
- [29] Chik, K.; Flourie, F.; Arab, K.; Steghens, J. P. Kinetic measurement by LC/MS of gamma-glutamylcysteine ligase activity. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. BioMed. Life Sci.* **827**:32–38; 2005.
- [30] Worthington, D. J.; Rosemeyer, M. A. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **48**:167–177; 1974.
- [31] Steghens, J. P.; Flourie, F.; Arab, K.; Collombel, C. Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **798**:343–349; 2003.
- [32] Liu, J.; Luo, G.; Ren, X.; Mu, Y.; Bai, Y.; Shen, J. A bis-cyclodextrin diselenide with glutathione peroxidase-like activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1481**:222–228; 2000.
- [33] Yeung, T. K.; Simmonds, R. H.; Hopewell, J. W. The relative toxicity of intravenous and intraperitoneal doses of epirubicin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **24**:211–218; 1989.
- [34] Franco, A. A.; Odom, R. S.; Rando, T. A. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:1122–1132; 1999.
- [35] Rohrdanz, E.; Kahl, R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **24**:27–38; 1998.
- [36] Coudray, C.; Mouhieddine, S.; Richard, M. J.; Arnaud, J.; De Leiris, J.; Favier, A. Effects of adriamycin on chronic cardiotoxicity in selenium-deficient rats. *Basic Res. Cardiol.* **87**:173–183; 1992.
- [37] Remacle, J.; Lambert, D.; Raes, M.; Pigeolet, E.; Michiels, C.; Toussaint, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem. J.* **286** (Pt 1):41–46; 1992.
- [38] Schonberg, S. A.; Rudra, P. K.; Noding, R.; Skorpen, F.; Bjerve, K. S.; Krokan, H. E. Evidence that changes in Se-glutathione peroxidase levels affect the sensitivity of human tumour cell lines to n-3 fatty acids. *Carcinogenesis* **18**:1897–1904; 1997.
- [39] Crosby, A. J.; Wahle, K. W.; Duthie, G. G. Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 beta. *Biochim. Biophys. Acta* **1303**:187–192; 1996.
- [40] Weydert, C. J.; Waugh, T. A.; Ritchie, J. M.; Iyer, K. S.; Smith, J. L.; Li, L.; Spitz, D. R.; Oberley, L. W. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radic. Biol. Med.* **41**:226–237; 2006.
- [41] Yan, T.; Jiang, X.; Zhang, H. J.; Li, S.; Oberley, L. W. Use of commercial antibodies for detection of the primary antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:688–693; 1998.
- [42] Ding, W. Q.; Lind, S. E. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* **6**:1467–1474; 2007.
- [43] Kinter, M.; Roberts, R. J. Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell lines by 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:457–462; 1996.
- [44] Miyamoto, Y.; Koh, Y. H.; Park, Y. S.; Fujiwara, N.; Sakiyama, H.; Misonou, Y.; Ookawara, T.; Suzuki, K.; Honke, K.; Taniguchi, N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol. Chem.* **384**:567–574; 2003.
- [45] Pigeolet, E.; Remacle, J. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **11**:191–195; 1991.
- [46] Egea, P. F.; Mitschler, A.; Moras, D. Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Mol. Endocrinol.* **16**:987–997; 2002.
- [47] de Urquiza, A. M.; Liu, S.; Sjoberg, M.; Zetterstrom, R. H.; Griffiths, W.; Sjoval, J.; Perlmann, T. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* **290**:2140–2144; 2000.
- [48] Wu, Y.; Zhang, X.; Bardag-Gorce, F.; Robel, R. C.; Aguilo, J.; Chen, L.; Zeng, Y.; Hwang, K.; French, S. W.; Lu, S. C.; Wan, Y. J. Retinoid X receptor alpha regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. *Mol. Pharmacol.* **65**:550–557; 2004.
- [49] Tanaka, T.; Dancheck, B. L.; Trifiletti, L. C.; Birnkrant, R. E.; Taylor, B. J.; Garfield, S. H.; Thorgeirsson, U.; De Luca, L. M. Altered localization of retinoid X receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**:3972–3982; 2004.
- [50] Hu, Y. J.; Dolan, M. E.; Bae, R.; Yee, H.; Roy, M.; Glickman, R.; Kiremidjian-Schumacher, L.; Diamond, A. M. Allelic loss at the GPx-1 locus in cancer of the head and neck. *Biol. Trace Elem. Res.* **101**:97–106; 2004.



## Augmentation par le DHA de la sensibilité aux taxanes de tumeurs mammaires chez le rat : rôle de l'architecture vasculaire tumorale.

### .A Introduction

La vascularisation tumorale est connue pour être une vascularisation de mauvaise qualité avec des vaisseaux sanguins tortueux, dilatés, immatures et hyper perméables<sup>333</sup>. Avec ces défauts d'architecture vasculaire, les gradients de pression sont insuffisants entre les compartiments vasculaire et interstitiel tumoral, ce qui réduit considérablement la diffusion des molécules comme l'oxygène ou les agents anticancéreux. Le faible taux de libération de l'oxygène crée de nombreuses zones d'hypoxie intratumorales. Des données récentes montrent que l'hypoxie tumorale est un facteur prédictif dans le cancer du sein quant à la mauvaise réponse aux traitements anticancéreux (radiothérapie, chimiothérapie) et est corrélée au taux de survie des patientes<sup>334 335 336</sup>. La vascularisation tumorale joue donc un rôle essentiel dans la réponse au traitement.

Dans un modèle de tumeurs mammaires chimioinduites chez le rat, une précédente étude au laboratoire<sup>337</sup> a montré qu'un régime enrichi en DHA diminue la vascularisation tumorale (mesurée par échographie Doppler puissance) avant et au cours d'un traitement à base d'anthracyclines (**Figure 57**) et cet effet est associé à une augmentation de la réponse des tumeurs. De plus, lorsque l'effet du DHA sur la diminution de la vascularisation tumorale est aboli (par une supplémentation en vitamine E), l'amélioration de la réponse tumorale tend aussi à être abolie. La vascularisation paraît donc jouer un rôle important dans la chimiosensibilisation des tumeurs par le DHA.

La technique d'échographie Doppler puissance permet d'évaluer la macro-vascularisation (diamètre > 100 µm). Le régime enrichi en DHA étant capable de modifier la macrovascularisation tumorale avant la chimiothérapie, le premier objectif de cette étude a été d'étudier les effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur l'ensemble de la vascularisation tumorale sans traitement anticancéreux. L'ensemble de la vascularisation tumorale a été explorée par échographie de contraste (en collaboration avec le Pr F. Tranquart, Unité INSERM U930 à Tours). De plus, nous avons développé une méthode d'analyse des images obtenues par échographie de contraste nommée ARCHIVASC, pour distinguer les différents compartiments vasculaires (macro-vascularisation et micro-vascularisation). Enfin, nous avons mesuré la pression partielle en oxygène dans les tumeurs.

Le deuxième objectif de cette étude a été d'explorer *in vivo* si les AGPI n-3 sont capables de potentialiser les effets antitumoraux et antivasculaires d'un agent anticancéreux possédant aussi une action antiangiogénique : le docetaxel<sup>338</sup>. Pour l'étude de la vascularisation, la méthodologie décrite précédemment a été appliquée. Nous avons de plus étudié à partir de prélèvements tumoraux, l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans l'angiogenèse pouvant

<sup>333</sup> Jain RK. Science. 2005. PMID: 15637262.

<sup>334</sup> Hussain SA. Br J Cancer. 2007. PMID : 17213826.

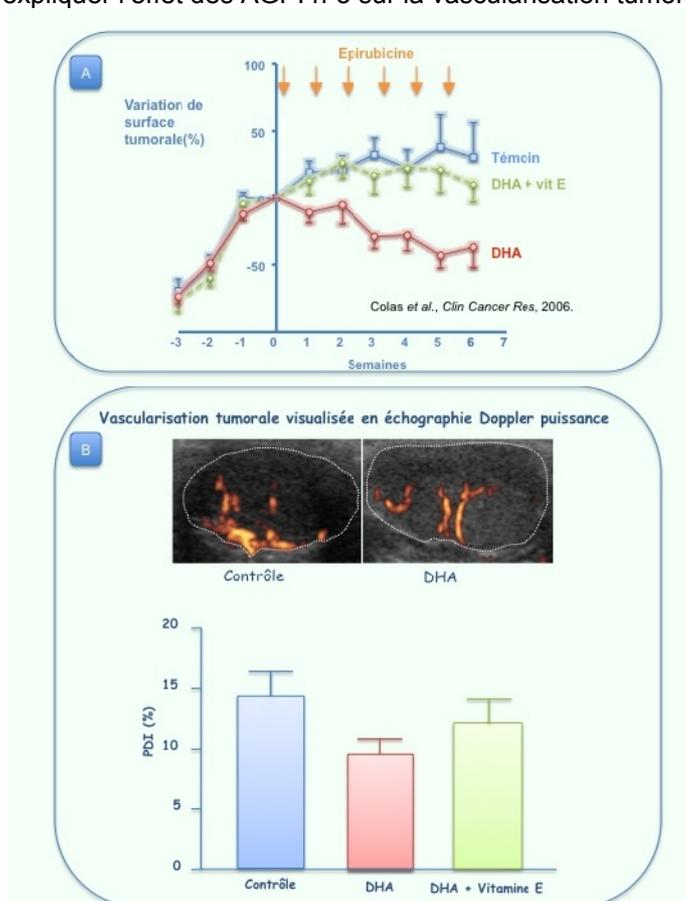
<sup>335</sup> Trastour C. Int J Cancer. 2007. PMID : 17245699.

<sup>336</sup> Kronblad A. Int J Cancer. 2006. PMID : 16381002.

<sup>337</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.

<sup>338</sup> Grant DS. Int J Cancer. 2003. PMID : 12532428.

permettre d'expliquer l'effet des AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale.



**Figure 57 : Effet du DHA sur la réponse et la vascularisation tumorales de tumeurs mammaires chimioinduites chez la rate, lors d'une chimiothérapie à base d'épirubicine.**

Tiré d'une étude précédente (Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.). (A) Le DHA augmente la réponse tumorale à l'épirubicine alors que la vitamine E abolit cet effet. (B) Le DHA diminue la vascularisation tumorale, évaluée par échographie Doppler puissance en densité de pixels allumés (Power Doppler Index PDI %). Cet effet tend à être aboli par la vitamine E.

## .B Matériel et méthodes

### .1 Induction de la carcinogenèse mammaire par le NMU.

Les animaux sont des rats femelles de souche Sprague-Dawley (Harlan, France). Une semaine avant l'induction de la carcinogenèse, les animaux sont arrivés au laboratoire pour une période d'acclimatation. Ils ont été hébergés sous température et humidité contrôlées, avec des cycles jour-nuit de 12 heures. Pendant la période d'acclimatation précédent le début de l'étude, les animaux ont reçu une alimentation de base sous forme de croquettes (Harlan Teklad TRM). L'induction de la carcinogenèse a été effectuée sur des animaux de 47-48 jours, correspondant à la période de maturation des glandes mammaires.

Le NMU a été mis en solution, juste avant l'initiation, dans du sérum physiologique puis injecté aux animaux en sous-cutané sur le flanc gauche, à

raison de 25 mg/kg. Le NMU est un carcinogène responsable de mutations ponctuelles. Ce composé est hautement réactif, particulièrement en milieu aqueux, où il génère des ions méthyl carbonium ( $\text{CH}_3^+$ ), alkylant ainsi les acides nucléiques. Le principal produit de cette méthylation est la 7-méthyle-guanine mais d'autres bases peuvent également être méthylées<sup>339</sup>. Le modèle NMU produit des tumeurs mammaires qui sont toutes des adénocarcinomes localement invasifs et dont la croissance est dépendante des œstrogènes.

## .2 Chronologie de l'expérimentation animale

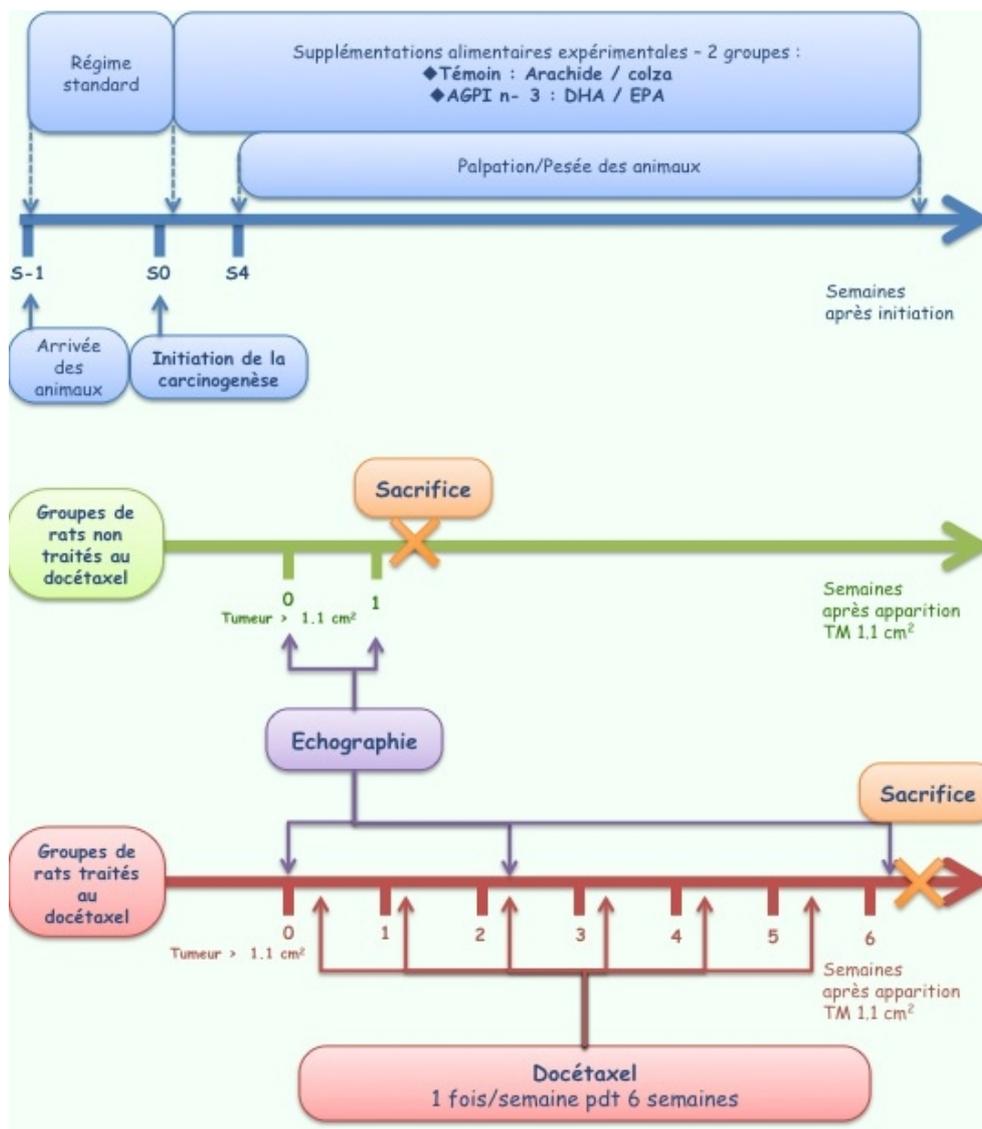


Figure 58 : Chronologie de l'expérimentation animale.

La chronologie de l'expérimentation animale est présentée dans la **Figure 58**. A l'arrivée des rats, une randomisation est effectuée pour répartir les rats en 4

<sup>339</sup> IARC. N-methyl-n-nitrosourea. Monographies du Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), 1978.

groupes :

|                 | Rats non traités | Rats traités au docetaxel   |
|-----------------|------------------|-----------------------------|
| Régime témoin   | Groupe témoin    | Groupe docetaxel            |
| Régime AGPI n-3 | Groupe AGPI n-3  | Groupe AGPI n-3 + docetaxel |

### ***Ja Régimes alimentaires expérimentaux***

| Acides Gras (%surface)  | HUILES (%)  |             |                           | Composition en acides gras du mélange d'huile utilisé |              |
|-------------------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|
|                         | Arachide    | Colza       | Huile Poisson PHOSPHOTECH | Témoin                                                | AGPI n-3     |
| <b>AG saturés</b>       |             |             |                           |                                                       |              |
| 14:00                   | 0.2         | 0           | 0.25                      | 0.16                                                  | 0.19         |
| 16:00                   | 10.8        | 8.2         | 0.83                      | 10.28                                                 | 7.13         |
| 18:00                   | 3.3         | 2.6         | 0.13                      | 3.16                                                  | 2.15         |
| <b>Total</b>            | <b>15.6</b> | <b>11.7</b> | <b>1.36</b>               | <b>14.82</b>                                          | <b>10.33</b> |
| <b>AG monoinsaturés</b> |             |             |                           |                                                       |              |
| 18:1n-9c                | 57.7        | 60.6        | 2.12                      | 58.28                                                 | 39.56        |
| <b>Total</b>            | <b>60.2</b> | <b>63.6</b> | <b>6.59</b>               | <b>60.88</b>                                          | <b>42.78</b> |
| <b>n-6 AGPI</b>         |             |             |                           |                                                       |              |
| 18:2n-6c                | 22.4        | 20.9        | 0.51                      | 22.1                                                  | 14.9         |
| 20:4 n-6                |             |             | 1.68                      | 0                                                     | 0.56         |
| 22:5 n-6                |             |             | 1.21                      | 0                                                     | 0.4          |
| <b>Total</b>            | <b>22.6</b> | <b>20.9</b> | <b>4.12</b>               | <b>22.26</b>                                          | <b>16.21</b> |
| <b>n-3 AGPI</b>         |             |             |                           |                                                       |              |
| 18:3 n-3                | 0.2         | 3.7         | 0.47                      | 0.9                                                   | 0.76         |
| 20:5 n-3                |             |             | 23.23                     | 0                                                     | 7.74         |
| 22:5 n-3                |             |             | 5.59                      | 0                                                     | 1.86         |
| 22:6 n-3                | 0.1         | 0           | 50.79                     | 0.08                                                  | 16.98        |
| <b>Total</b>            | <b>0.3</b>  | <b>3.7</b>  | <b>84.37</b>              | <b>0.98</b>                                           | <b>28.77</b> |

**Tableau VII : Composition en acides gras de chaque huile et du mélange d'huiles utilisé pour la préparation des régimes alimentaires.**

Au final 15% de lipides ont été apportés dans la nourriture, soit un apport final de 2.5 g de DHA pour 100 g de régime et de 1.2 g d'EPA pour 100 g de régime.

La supplémentation alimentaire débute 2 jours après l'initiation de la carcinogenèse qui a lieu une semaine après l'arrivée des animaux. Elle apporte 15% de lipides dont (**Tableau VII**) :

- 12% d'huile d'arachide et 3% d'huile de colza pour le régime témoin
- 8% d'huile d'arachide, 2 % d'huile de colza et 5 % d'huile de poisson pour le régime « AGPI n-3 ».

Au final, sachant que les 15% d'huiles apportées dans le régime « AGPI n-3 » apportent 16.98% de DHA et 7.74% d'EPA, le régime alimentaire apporte au final 2.5% de DHA et 1.2% d'EPA. Les éléments autres que les lipides (acides aminés, minéraux, vitamines) ont été apportés de façon identique à tous les groupes. L'alimentation sous forme de croquettes (INRA, Jouy en Josas, France) a été conditionnée sous vide et stockée à 4°C pour éviter tout risque d'oxydation des huiles.

***)b Suivi de la croissance tumorale***

La croissance tumorale est suivie de manière hebdomadaire, par la mesure au pied à coulisse des tumeurs. La surface tumorale a été calculée selon la formule de surface d'une ellipse :

$$S = (\pi/4) * D1 * D2$$

où D1 et D2 sont les dimensions des deux plus grands axes de la tumeur.

### **.3 Chimiothérapie**

Les rates sont incluses dans le protocole de chimiothérapie au docetaxel, lorsque elles présentent une tumeur d'une taille d'au moins 1.1 cm<sup>2</sup>. Le docetaxel a été injecté en intra-péritonéal, une fois par semaine pendant 6 semaines (6 mg/kg).

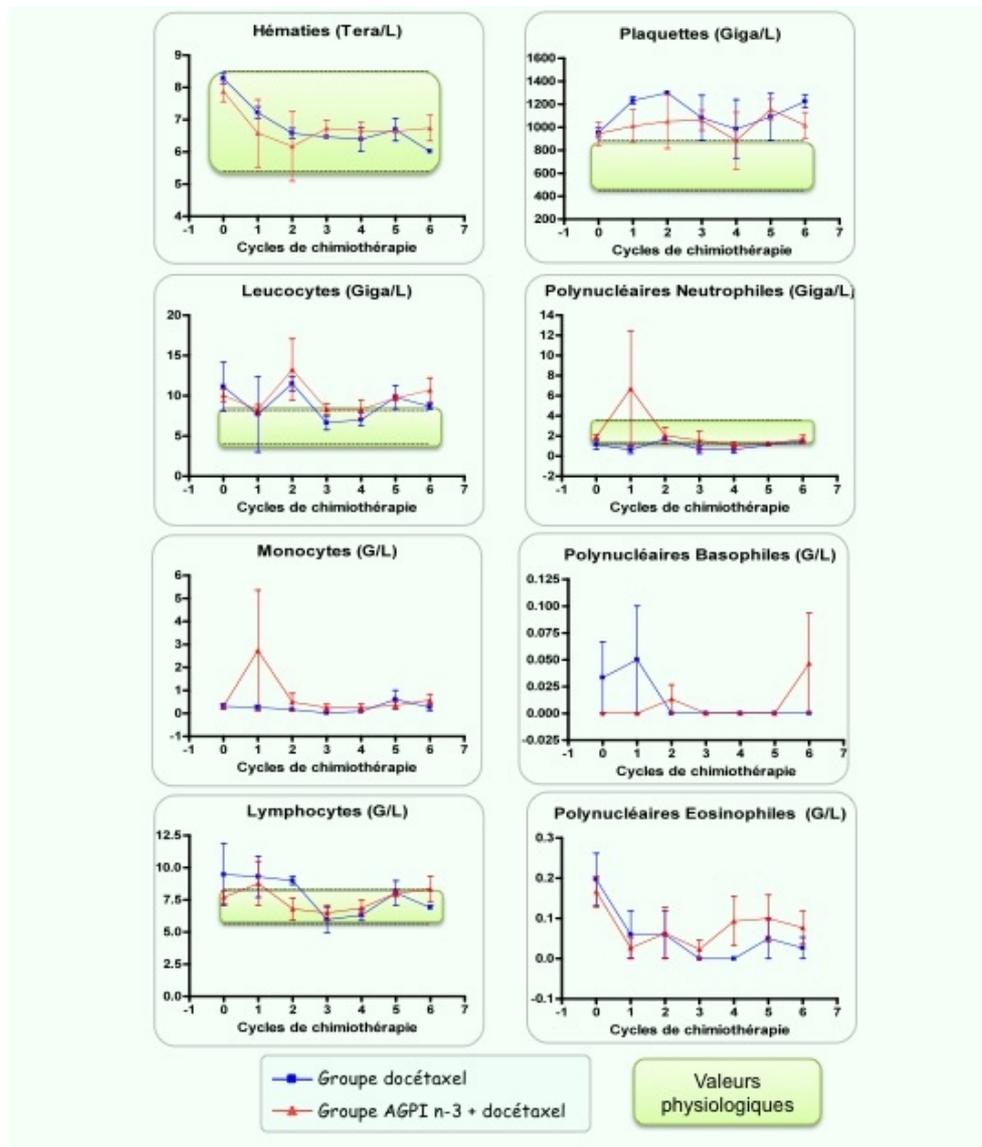
Le protocole de chimiothérapie a été élaboré en fonction de ce qui est administré en clinique, à savoir une dose hebdomadaire de 25 à 35 mg/m<sup>2</sup>. La dose équivalente chez le rat se situe autour de 6 mg/kg.

Afin d'évaluer la toxicité de la chimiothérapie et d'adapter le protocole si besoin, chaque semaine, des prises de sang (0.5 mL) ont été effectuées sur des rates choisies au hasard, pour établir une formule sanguine (Services hospitaliers – Hôpital Bretonneau de Tours).

Les valeurs ont été comparées à des valeurs physiologiques <sup>340</sup> (**Figure 59**). Au cours de la chimiothérapie, malgré une diminution significative des hématies, l'ensemble des valeurs en fin de chimiothérapie reste dans les normes des valeurs physiologiques. La dose de 6 mg/kg a donc été maintenue tout au long de la chimiothérapie.

---

<sup>340</sup> « Guide to the care and use of experimental animals », canadian council on animal care, volume 1.



**Figure 59 : Evolution de la formule sanguine au cours de la chimiothérapie.**

La formule sanguine a été mesurée dans chaque groupe au cours de la chimiothérapie (n = 3). Les valeurs ont été comparées à des valeurs physiologiques tirées de « guide to the care and use of experimental animals », canadian council on animal care, volume 1. Chaque point représente la moyenne de 3 rats, et les barres les écarts type à la moyenne.

## .4 Echographie

Dans les groupes non traités, la première échographie est réalisée sur une tumeur mesurant au minimum 1.1 cm<sup>2</sup>, et la deuxième une semaine après. Pour les groupes traités, trois séries d'échographie sont réalisées : avant le début de la chimiothérapie (où la tumeur mesure au minimum 1.1 cm<sup>2</sup>), deux semaines et six semaines après la première échographie (**Figure 58**).

La vascularisation tumorale a été évaluée par échographie car c'est une technique non invasive qui permet le suivi de l'évolution de la vascularisation fonctionnelle au cours de la croissance tumorale et de la chimiothérapie. Deux techniques d'échographie ont été utilisées :

- échographie Doppler puissance, déjà utilisée dans notre modèle et qui permet d'évaluer la macrovascularisation (>100 µm)
- échographie de contraste (CEUS, contrast-enhanced ultrasonography), qui par injection d'un produit de contraste le SonoVue® permet de quantifier l'ensemble de la vascularisation. De plus le suivi de l'entrée et de la sortie du produit dans le réseau vasculaire permet d'acquérir des paramètres dynamiques de la perfusion sanguine.

### **)a Déroulement des échographies, acquisition des données**

Les échographies ont été réalisées sur animal anesthésié avec de l'isoflurane (Aerrane, Baxter, France) (2%). Pour éviter tout refroidissement de l'animal et les conséquences sur le débit sanguin, les rats ont été placés sur tapis chauffant et l'anesthésie n'a pas été prolongée au delà de 15 minutes. De plus la compression de la tumeur est minimale du fait de la persistance tout au long de l'examen, d'une couche importante de gel entre la sonde et la tumeur.

Dans un premier temps, l'échographie de contraste est réalisée avec un scanner Technos (ESAOTE, Italie) équipé d'une sonde 5-10 MHz et des microbulles d'hexafluorure de soufre (45 µg/mL SonoVue® Bracco Imaging SpA, Italie). Cette solution est préparée extemporanément et injectée par voie intraveineuse (veine caudale). Les microbulles présentes dans la solution ont une taille (entre 2 et 8 µm) proche de celle des hématies (7 µm), donc peuvent passer dans toute la vascularisation. De plus, elles augmentent le retour du signal échographique (échogénicité) par rapport aux hématies, ce qui permet une amélioration du rapport signal/bruit. Une seconde avant l'injection intraveineuse du SonoVue® (0.3 mL), l'enregistrement vidéo de la montée en contraste dans la tumeur débute et dure 60 secondes.

Cet examen est aussitôt suivi de l'échographie Doppler puissance qui permet d'évaluer la macro-vascularisation (vaisseaux dont le diamètre est supérieur à 100 µm) avec une sonde 4-13 MHz sur le même échographe. Les tumeurs ont été scannées selon 5 axes médians.

Suite à l'acquisition des données de vascularisation, sont effectués : la prise de mesure de la taille de la tumeur en échographie, et la prise de sang (1 mL) en fin d'anesthésie. Le sang est conservé une à deux heures à 4°C, puis après centrifugation, le sérum est conservé à -80°C.

### **)b Analyse des données d'échographie**

Cette partie est décrite de manière exhaustive dans l'article en préparation : « From tumor vascular architecture to blood flow dynamics: principles and applications of the "ARCHIVASC" sonographic analysis. »

#### **Analyse de l'échographie Doppler puissance**

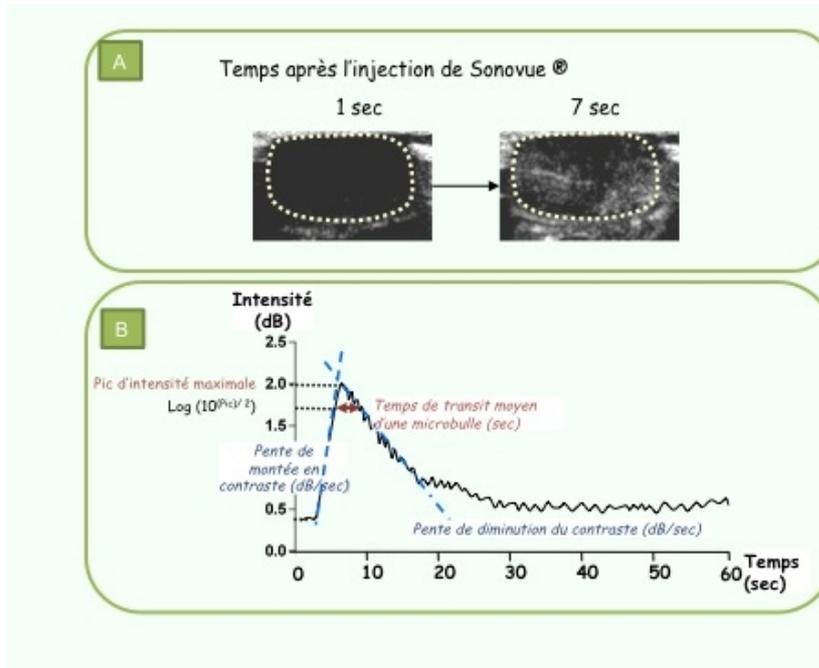
Le flux des hématies est analysé par le Doppler puissance et est représenté par des pixels colorés sur les images d'échographie. Une analyse d'image (logiciel MATLAB®) dédié à l'échographie Doppler puissance, permet de quantifier la densité de vascularisation dans une région d'intérêt (ROI) circonscrite à la tumeur selon la formule suivante :

Densité de vascularisation = (nombre de pixels colorés/nombre total de pixels dans la ROI)\*100

La densité de vascularisation est mesurée en PDI (Power Doppler Index en %). Cette quantification ne tient donc pas compte de l'intensité des pixels.

#### **Analyse standard des données d'échographie de contraste.**

La montée en contraste dans la tumeur est enregistrée sous forme de clip vidéo, et analysée par le logiciel Visilog 6 (**Figure 60**).



**Figure 60 : Montée en contraste dans les vaisseaux tumoraux mesurée par échographie de contraste.**

(A) Images d'une tumeur (pointillés) tirées d'un clip de montée en contraste de l'agent de contraste Sonovue® avant l'injection (1sec) et au moment du pic d'intensité maximale. (B) L'analyse de la montée en contraste par le logiciel Visilog permet d'obtenir la courbe temps-intensité et différents paramètres tels que le pic d'intensité maximal, la pente de montée en contraste, le temps de transit moyen d'une microbulle dans la tumeur. La pente de diminution du contraste est déterminée manuellement sur les courbes.

Le signal de montée en contraste est exprimé en décibels (échelle logarithmique) en fonction du temps. Après analyse de la courbe de l'intensité de contraste en fonction du temps par le logiciel, plusieurs paramètres peuvent être mesurés tels que le pic d'intensité maximal, le temps de transit moyen des bulles au sein de la tumeur, la vitesse de diffusion des bulles au sein de la vascularisation tumorale (pente de montée en contraste), la vitesse de décroissance du signal, l'aire sous la courbe.

## **.5 Mesure de la pression partielle en oxygène dans les tumeurs**

La pression partielle en oxygène ( $PO_2$ ) a été mesurée dans les tumeurs sur animal anesthésié à l'isoflurane avant le sacrifice, avec une sonde polarographique LICOX<sup>®</sup>, et le signal issu de l'interface CMP LICOX<sup>®</sup> est analysé par le logiciel LICOX<sup>®</sup> CMP. Les mesures ont été obtenues 5 min après l'insertion de la sonde à l'intérieur de la tumeur et la  $PO_2$  a été mesurée à 3 endroits différents. Les résultats correspondent à la moyenne de ces 3 mesures.

## **.6 Sacrifice, autopsie et prélèvement de tissu**

Après injection létale de pentobarbital, le sang est prélevé par ponction intracardiaque. Les tumeurs, le foie et le tissu adipeux abdominal sont prélevés et pesés.

Une fois le prélèvement effectué, l'échantillon est immédiatement placé sur une plaque réfrigérante pour éviter toute dégradation du tissu. Les échantillons de tumeurs, foie, tissu adipeux sont conservés dans l'azote. Quant au prélèvement de sang, le sérum est récupéré après centrifugation.

## **.7 Analyse de la composition en acides gras du tissu adipeux**

Les lipides totaux sont extraits du tissu adipeux (100 mg) par un mélange de méthanol/chloroforme selon la méthode de Folch<sup>341</sup>. La séparation des différentes classes de lipide est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) avec une phase mobile constituée de 70 mL d'hexane, 30 mL d'éther diéthylique et 1 mL d'acide acétique. Les triglycérides ainsi séparés subissent une transestérification avec du méthanol en présence de trifluorure de bore (14 %) (atmosphère sous azote, 20 min, 100 °C). Les ester-méthyliques d'acides gras (EMAG) obtenus sont extraits à l'hexane en utilisant la partition de phase avec de l'eau ultra-pure. Après évaporation de l'hexane, les EMAG sont pesés puis repris dans l'hexane à la concentration de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Cette concentration permet d'obtenir une surface optimale pour l'analyse par chromatographie. Sur le chromatogramme, chaque pic correspondant à un ester méthylique d'acide gras est identifié par comparaison de son temps de rétention avec des acides gras standards authentifiés. La surface des pics obtenus pour chaque acide gras (proportionnelle à la masse d'acide gras brûlée dans le détecteur à ionisation de flamme) est intégrée et exprimée en pourcentage de la surface totale des pics en phase gazeuse (Thermo-Finnigan).

## **.8 Mesure des quantités de protéine VEGF-A dans le sérum**

Les concentrations de VEGF-A ont été mesurées par un kit de dosage ELISA (RayBio, Norcross, GA) dans les sera recueillis avant la première injection de docetaxel et à la fin de la chimiothérapie. La concentration minimale de VEGF-A détectée est de 2 pg/mL.

---

<sup>341</sup> Folch J. J Biol Chem. 1957. PMID : 13428781.

## .9 Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse par PCR quantitative en temps réel.

L'extraction des ARNs a été réalisée à partir de 50 à 100 mg de tumeurs. Les échantillons ont été homogénéisés dans 1 mL de Trizol® (à l'ultraturax). Les ARN totaux des tumeurs mammaires ont été extraits selon le protocole « Trizol » fourni par Invitrogen, puis traités à la DNase. L'intégrité des ARN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% en conditions dénaturantes. Les ARN ont été rétrotranscrits avec le kit fourni par SuperArray – RayBiotech® (1 µg d'ARN totaux issus de chaque tumeur sont requis pour les analyses par puce).

Un criblage par puce de 84 gènes impliqués dans l'angiogenèse (**Tableau VIII**) a été réalisé sur une partie des échantillons d'ARN extraits. Six tumeurs ont été sélectionnées dans chaque groupe selon leur vascularisation à la fin de la chimiothérapie i.e. les tumeurs présentant une forte vascularisation dans le régime témoin et une faible vascularisation dans le régime AGPI n-3.

La Q-PCR est réalisée sur le thermocycler : iCycler (Biorad) selon le protocole fourni par SuperArray. L'amplification des acides nucléiques est suivie grâce à un agent intercalent fluorescent lorsqu'il est fixé à de l'ADN bicaténaire, le SYBR Green®. Les résultats ont été retraités par le logiciel MyiQ, qui permet la détermination du cycle seuil (Ct). Le cycle seuil est le nombre de cycle nécessaire pour atteindre un seuil de fluorescence choisi situé dans la phase exponentielle de la réaction. Le Ct est directement lié au nombre de copie d'un gène : plus le nombre de copies est important, plus la fluorescence seuil sera atteinte pour un nombre de cycles (Ct réduit) réduit.

Pour déterminer les niveaux d'expression des différents gènes de l'angiogenèse, la « méthode comparative des Ct » a été utilisée<sup>342</sup>. Cette méthode consiste à comparer l'expression d'un gène cible (exprimée en Ct) dans une tumeur du groupe AGPI n-3 à l'expression de ce même gène cible dans une tumeur du groupe témoin. L'expression de ce gène cible est normalisée par le Ct de plusieurs gènes de référence (dont l'expression n'est pas modifiée par la supplémentation en AGPI n-3) :

$$\Delta Ct = Ct(\text{gène cible}) - Ct(\text{gène(s) de référence})$$

La comparaison des  $\Delta Ct$  entre les ARN de tumeurs AGPI n-3 et les ARN de tumeurs témoin aboutit à :

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{groupe AGPI n-3}) - \Delta Ct(\text{groupe témoin})$$

Le rapport du taux d'ARNm du gène cible entre les tumeurs AGPI n-3 et les tumeurs témoin est donné par la formule suivante :

$$Q = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Cette formule suppose que l'efficacité d'amplification des amorces du gène de référence et du gène cible soit égale à 100 %.

Dans les plaques *Superarray*, 5 gènes de référence (gènes dont l'expression n'est potentiellement pas modifiée par les 2 conditions étudiées) sont analysés : Rplp 1 (protéine ribosomale), Hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase), Rpl13a (protéine ribosomale), Ldha (Lactate déshydrogénase A) et Actb (Actine bêta).

<sup>342</sup> Livak KJ., Methods. 2001. PMID : 11846609.

|                                                                       |                                           |                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Angiopoietin 2                                                        | C-fos induced growth factor               | Natriuretic peptide receptor 1                                                        |
| Thymoma viral proto-oncogene 1                                        | FMS-like tyrosine kinase 1                | Neuropilin 1                                                                          |
| Angiopoietin 1                                                        | Fibronectin 1                             | Neuropilin 2                                                                          |
| Alanyl (membrane) aminopeptidase                                      | Frizzled homolog 5 (Drosophila)           | Platelet derived growth factor, alpha                                                 |
| Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (predicted)                   | Hepatocyte growth factor                  | Platelet derived growth factor, B polypeptide                                         |
| Chemokine (C-C motif) ligand 2                                        | Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit | Platelet/endothelial cell adhesion molecule                                           |
| Cadherin 5 (predicted)                                                | Inhibitor of DNA binding 1                | Placental growth factor                                                               |
| Procollagen, type XVIII, alpha 1                                      | Inhibitor of DNA binding 3                | Plasminogen activator, urokinase                                                      |
| Procollagen, type IV, alpha 3                                         | Interferon-alpha 1                        | Plasminogen                                                                           |
| Connective tissue growth factor                                       | Interferon beta 1, fibroblast             | Prostaglandin-endoperoxide synthase 1                                                 |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 1                                      | Interferon gamma                          | Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5                           |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 2                                      | Insulin-like growth factor 1              | Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1                           |
| Chemokine (C-X-C motif) ligand 9                                      | Interleukin 1 beta                        | Sphingosine kinase 1                                                                  |
| Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)                   | Interleukin 6                             | T-box 4 (predicted)                                                                   |
| Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 | Integrin alpha 5 (mapped)                 | Endothelial-specific receptor tyrosine kinase                                         |
| Ephrin A1                                                             | Integrin alpha V (predicted)              | Transforming growth factor alpha                                                      |
| Ephrin A2                                                             | Integrin beta 3                           | Transforming growth factor, beta 1                                                    |
| Ephrin A5                                                             | Jagged 1                                  | Transforming growth factor, beta 2                                                    |
| Epidermal growth factor                                               | Kinase insert domain protein receptor     | Transforming growth factor, beta 3                                                    |
| Endoglin                                                              | Laminin, alpha 5                          | Transforming growth factor, beta receptor 1                                           |
| Endothelial PAS domain protein 1                                      | Leukocyte cell derived chemotaxin 1       | Thrombospondin 4                                                                      |
| Epiregulin                                                            | Leptin                                    | Tissue inhibitor of metalloproteinase 1                                               |
| Coagulation factor II                                                 | Mitogen activated protein kinase 14       | Tissue inhibitor of metalloproteinase 2                                               |
| Fibroblast growth factor 1                                            | Midkine                                   | Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) |
| Fibroblast growth factor 16                                           | Matrix metalloproteinase 19 (predicted)   | Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)                                     |
| Fibroblast growth factor 2                                            | Matrix metalloproteinase 2                | Vascular endothelial growth factor A                                                  |
| Fibroblast growth factor 6                                            | Matrix metalloproteinase 3                | Vascular endothelial growth factor B                                                  |
| Fibroblast growth factor receptor 3                                   | Matrix metalloproteinase 9                | Vascular endothelial growth factor C                                                  |

Tableau VIII : Liste des 84 gènes de l'angiogenèse dont l'expression a été mesurée dans les tumeurs mammaires de rates.

## .10 Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des tests non paramétriques avec le logiciel GraphPad Prism 4 : i) Mann-Whitney pour les comparaisons deux à deux ii) test de Spearman pour les corrélations. Les résultats des puces à oligonucléotides ont été analysés par un test t (insérés dans un fichier d'analyse sur « Excel » fourni par *Superarray*).

*Dans un premier temps nous présenterons la nouvelle méthode d'analyse de la vascularisation que nous avons développée pour déterminer les modifications des compartiments de micro-, de medium-, ou de macro-vascularisation lors de la croissance tumorale ou sous traitement au docetaxel : ARCHIVASC.*

**.C**

## .D 1<sup>e</sup> objectif : les AGPI n-3 modifient-ils la vascularisation tumorale sans traitement anticancéreux ?

### .1 Résultats

#### .)a Le régime alimentaire AGPI n-3 modifie la composition en acides gras des triglycérides du tissu adipeux.

| Composition en acides gras des triglycérides du tissu adipeux |                   |                   |              |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| Acides Gras (%surface)                                        | Régime témoin     | Régime AGPI n-3   | Statistiques |
| <b>AG saturés</b>                                             |                   |                   |              |
| 14:00                                                         | 0.5 ± 0.1         | 0.6 ± 0.1         | NS           |
| 16:00                                                         | 12.9 ± 1.1        | 13.2 ± 1.1        | NS           |
| 18:00                                                         | 2.6 ± 0.5         | 2.9 ± 0.7         | NS           |
| <b>Total</b>                                                  | <b>17.3 ± 1.3</b> | <b>17.8 ± 1.4</b> | <b>NS</b>    |
| <b>AG monoinsaturés</b>                                       |                   |                   |              |
| 16:1                                                          | 0.9 ± 0.4         | 0.9 ± 0.3         | NS           |
| 18:1n-9c                                                      | 48.0 ± 1.0        | 42.1 ± 1.1        | ***          |
| <b>Total</b>                                                  | <b>52.3 ± 0.9</b> | <b>46.8 ± 1.1</b> | <b>***</b>   |
| <b>n-6 AGPI</b>                                               |                   |                   |              |
| 18:2n-6c                                                      | 25.3 ± 0.7        | 22.7 ± 0.8        | ***          |
| 20:3 n-6                                                      | 0.1 ± 0.0         | 0.1 ± 0.0         | NS           |
| 20:4 n-6                                                      | 0.6 ± 0.1         | 0.3 ± 0.0         | ***          |
| <b>Total</b>                                                  | <b>26.6 ± 0.8</b> | <b>23.5 ± 0.8</b> | <b>***</b>   |
| <b>n-3 AGPI</b>                                               |                   |                   |              |
| 18:3 n-3                                                      | 0.6 ± 0.1         | 0.7 ± 0.1         | NS           |
| 20:5 n-3                                                      | 0.0 ± 0.0         | 0.7 ± 0.2         | ***          |
| 22:6 n-3                                                      | 0.1 ± 0.0         | 5.0 ± 0.7         | ***          |
| <b>Total</b>                                                  | <b>0.8 ± 0.1</b>  | <b>7.2 ± 0.9</b>  | <b>***</b>   |

**Tableau IX : Composition en acides gras des triglycérides du tissu adipeux de rats nourris avec un régime témoin ou un régime enrichi en AGPI n-3.**

Après séparation des acides gras en chromatographie en phase gazeuse, la surface des pics obtenus pour chaque acide gras (proportionnelle à la masse d'acide gras brûlée dans le détecteur à ionisation de flamme) est intégrée et exprimée en pourcentage de la surface totale des pics. Moyenne ± écart type n = 12 rates dans chaque groupe.

L'incorporation des AGPI n-3, apportés par l'alimentation, a été contrôlée par l'analyse de la composition en acide gras des triglycérides du tissu adipeux. Le tissu adipeux reflète la composition en acides gras des phospholipides de la tumeur<sup>343</sup>.

Le **Tableau IX** montre un enrichissement de 3 fois des taux d'AGPI n-3 dans le groupe de rats dont le régime alimentaire est enrichi en AGPI n-3 (7.2 ± 0.9 % de surface) par rapport au groupe témoin (0.8 ± 0.1 % de surface). On observe une augmentation de 50 fois des taux de DHA (22:6n-3) (p<0.001) dans le régime AGPI n-3 (5 ± 0.7 % de surface) par rapport au régime témoin (0.1 ± 0.0 % de surface). Alors que l'EPA (20:5 n-3) n'est pas détecté dans le groupe témoin, la

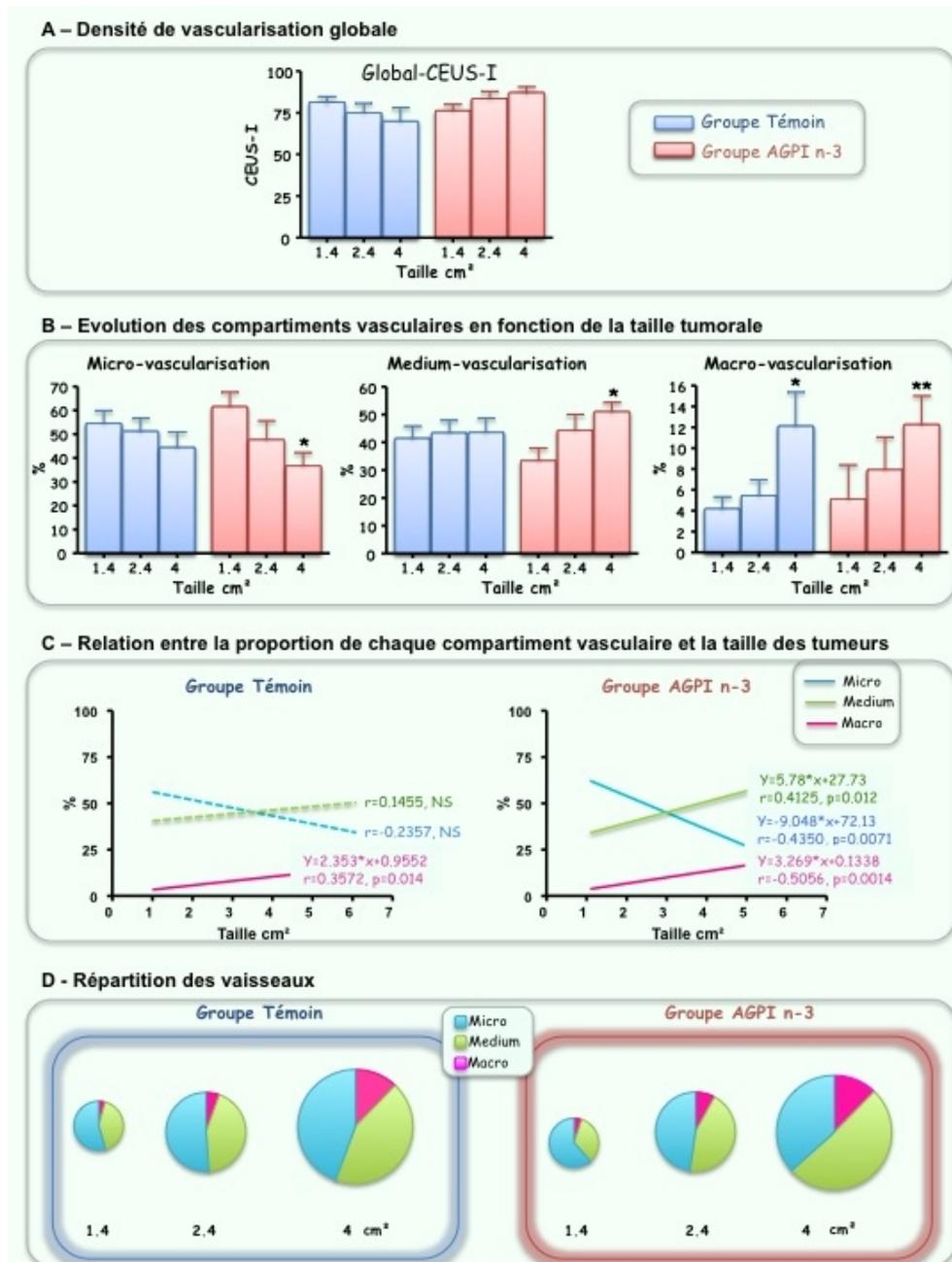
<sup>343</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.

supplémentation en huile de poisson conduit à la présence de  $0.7 \pm 0.2$  % d'EPA dans le tissu adipeux. Aucune différence n'est observée entre les deux groupes pour les acides gras saturés. En revanche, le régime enrichi en AGPI n-3 montre une diminution de 11 % des AGPI n-6 et des acides gras monoinsaturés

**)b Les AGPI n-3 améliorent l'organisation des compartiments vasculaires**

La vitesse de croissance tumorale a été suivie chez des rates nourries avec un régime témoin ou un régime AGPI n-3 et elle n'est pas différente entre les deux groupes.

Les échographies ont été réalisées sur des tumeurs de taille comprise entre 1 et 5 cm<sup>2</sup>. Nous avons classé les tumeurs en trois groupes selon leur taille : petites ( $1.4 \pm 0.3$  cm<sup>2</sup>) moyennes ( $2.4 \pm 0.3$  cm<sup>2</sup>) et grosses tumeurs ( $4 \pm 0.9$  cm<sup>2</sup>). Nous avons montré que la vascularisation globale évolue de manière identique à la taille c'est-à-dire que la densité de vascularisation globale reste constante quelque soit la taille des tumeurs. La densité de vascularisation est identique dans les 2 groupes nutritionnels (**Figure 62-A**). Dans le groupe témoin, les tumeurs de grosse taille montrent une augmentation des vaisseaux de gros calibre et une tendance à la diminution de la microvascularisation (**Figure 62-B**). Dans le groupe AGPI n-3, l'organisation vasculaire évolue également en fonction de la taille avec une modification de l'ensemble des compartiments vasculaires (micro-, medium- et macro-vaisseaux). Ainsi, une corrélation significative entre le pourcentage de macro-vascularisation et la taille de la tumeur est observée dans les 2 groupes. La corrélation entre la répartition des vaisseaux de moyen et petit calibre et la taille de la tumeur n'est significative que dans le groupe AGPI n-3 (**Figure 62-C**). Ces variations significatives des compartiments vasculaires en fonction de la taille de la tumeur traduisent une hiérarchisation plus structurée de l'architecture vasculaire. La répartition des compartiments vasculaires est traduite sous forme de secteurs dont le diamètre est fonction de la taille de la tumeur (**Figure 62-D**).



**Figure 61 : Vascularisation tumorale en fonction de la surface tumorale.**  
 Toutes les tumeurs des groupes non traitées ont été reclassées en 3 groupes en fonction de leur taille ( $1.4 \pm 0.2 \text{ cm}^2$  -  $n = 25$ ,  $2.4 \pm 0.4 \text{ cm}^2$  -  $n = 19$ ,  $4 \pm 0.9 \text{ cm}^2$  -  $n = 14$ ). (A) Densité de vascularisation globale en fonction de la surface tumorale dans les deux groupes témoin et AGPI n-3. Les histogrammes représentent les moyennes, et les barres, les écarts types à la moyenne. (B) Proportion de micro-, medium- et macro-vascularisation dans les deux groupes témoin et AGPI n-3 (%). Les histogrammes représentent les moyennes, et les barres, les écarts types à la moyenne. (C) Relation entre la proportion de chaque compartiment vasculaire et la taille des tumeurs. La relation linéaire pour chaque compartiment a été calculée sur l'ensemble des données. Seules les droites en trait plein montrent une corrélation significative. (D) Répartition des vaisseaux en fonction de leur calibre (micro-, medium- et macro-vascularisation) dans les tumeurs classées en fonction de leur taille ( $1.4$ ,  $2.4$ ,  $4 \text{ cm}^2$ ).

**)c La pression partielle en oxygène dans les tumeurs n'est pas modifiée par les AGPI n-3.**

Afin de compléter cette étude par un marqueur de qualité vasculaire, la pression partielle en oxygène (PO<sub>2</sub>) a été mesurée dans les tumeurs avant le sacrifice des animaux par sonde polarographique. La moyenne des valeurs de PO<sub>2</sub> mesurées est de 21 ± 13 mmHg pour le groupe témoin (**données non montrées**). Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Vaupel dans le tissu tumoral mammaire <sup>344</sup>. La PO<sub>2</sub> n'est pas modifiée par le régime enrichi en AGPI n-3 (15 ± 11 mmHg).

## **.2 Discussion**

La vascularisation tumorale est décrite pour être peu organisée, chaotique, ne présentant pas d'organisation bien définie comme dans un tissu normal. En effet si la taille d'un organe augmente, sa vascularisation doit s'organiser pour continuer à assurer des échanges performants entre les compartiments vasculaire et interstitiel (distribution des nutriments, de l'oxygène et drainage efficace).

Lors de la croissance tumorale, les tumeurs enrichies en AGPI n-3 ont une quantité de vaisseaux identique à celles du groupe témoin et qui progresse de façon proportionnelle à la taille des tumeurs. En revanche, l'ensemble des compartiments vasculaires de la tumeur (micro-, medium- et macro-) évoluent en fonction de la taille de la tumeur dans le groupe AGPI n-3 alors que seule la macro-vascularisation est modifiée dans le groupe témoin. Ce résultat suggère une meilleure organisation du réseau vasculaire par les AGPI n-3. Ces modifications d'architecture (en terme de répartition des compartiments vasculaires) pourraient se traduire par une amélioration de la distribution de l'oxygène au sein de la tumeur. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de PO<sub>2</sub> tumorale entre les deux groupes. L'utilisation de la sonde polarographique qui est une technique très invasive ne permet pas de quantifier l'oxygénation de l'ensemble du tissu, mais d'une zone circonscrite autour de l'extrémité de la sonde. Ces mesures mériteraient d'être complétées par une analyse de l'hypoxie tumorale avec l'utilisation de marqueurs de l'hypoxie tels que les nitroimidazoles associés à l'imagerie TEP scan.

Si le réseau vasculaire est réellement mieux organisé par les AGPI n-3 lors de la croissance tumorale, cela pourrait contribuer également à une meilleure distribution de l'agent anticancéreux et participer à une efficacité accrue du traitement chimiothérapeutique par les AGPI n-3. Ces questions sont l'objet d'étude du 2<sup>e</sup> objectif.

---

<sup>344</sup> Vaupel P. Cancer Res. 1991. PMID : 2040005.

## **.E 2<sup>e</sup> objectif : les AGPI n-3 augmentent-ils l'efficacité du docetaxel ? La vascularisation tumorale est-elle impliquée dans cette chimiosensibilisation?**

### **.1 Résultats**

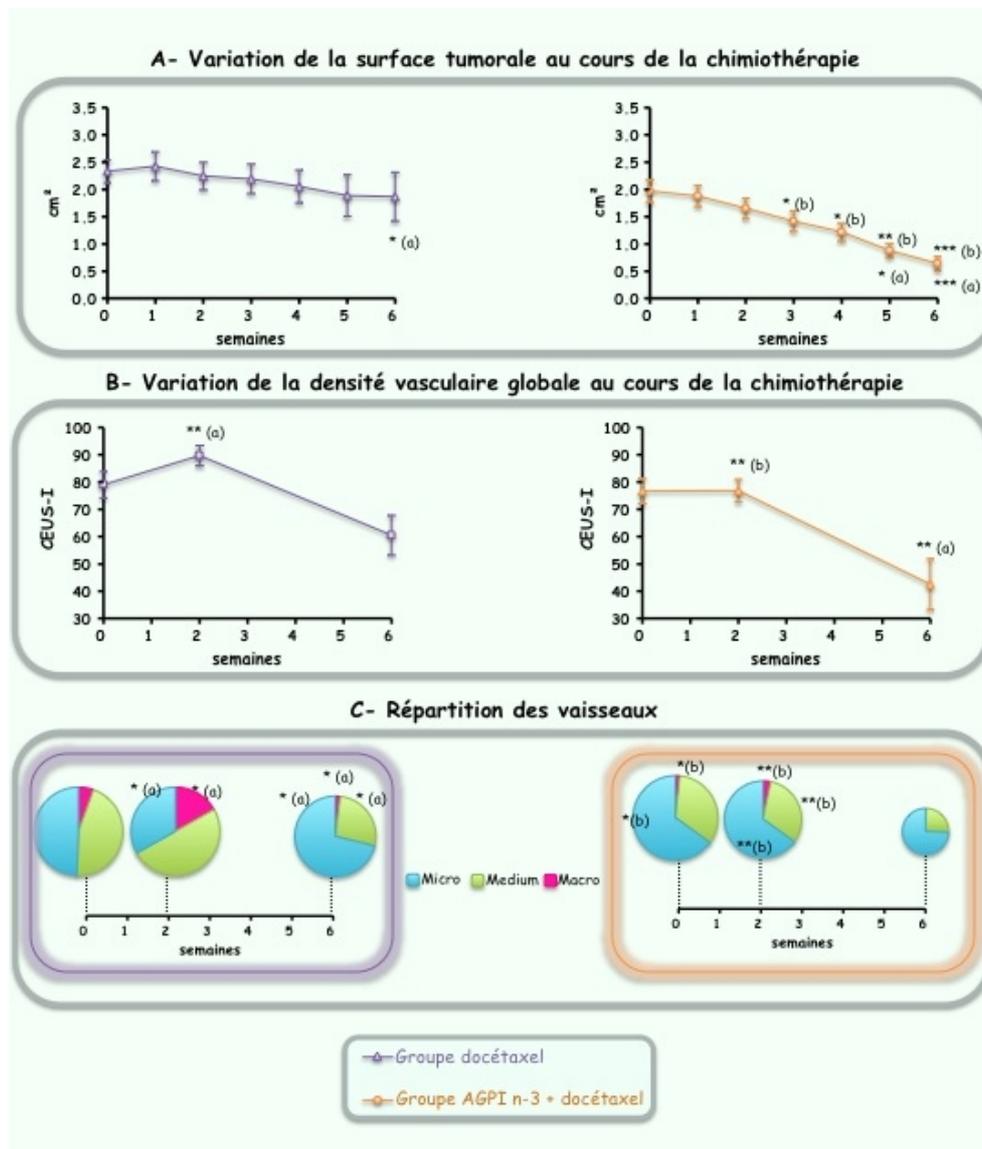
#### **)a Effet d'un régime enrichi en AGPI n-3 sur l'efficacité du docetaxel :**

La **figure 63-A** montre les surfaces tumorales au cours du traitement chez les rats nourris par le régime témoin (groupe docetaxel) et par le régime enrichi en AGPI n-3 (groupe AGPI n-3 + docetaxel).

Dans le groupe docetaxel, la surface tumorale est légèrement diminuée de 17 % à la fin du traitement (1.9 cm<sup>2</sup> vs 2.3 0.6 cm<sup>2</sup> avant traitement,  $p>0.05$ ). L'apport d'AGPI n-3 augmente fortement la réponse tumorale au docetaxel en fin de traitement ( $p<0.001$ ) avec une diminution de la surface tumorale de l'ordre de 70 % (0.6 cm<sup>2</sup> vs 2.0 cm<sup>2</sup> avant traitement). La régression tumorale devient significativement différente dès 3 semaines de chimiothérapie ( $p<0.05$ ). Les AGPI n-3 potentialisent ainsi l'effet du docetaxel de 4 fois.

#### **)b Effet d'un régime enrichi en AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale au cours du traitement:**

Dans le groupe docetaxel, à 2 semaines de traitement, alors que la croissance tumorale est stoppée, la densité de vascularisation globale augmente légèrement de 14 % ( $p<0.01$ ) (**Figure 63-B**). La répartition des compartiments vasculaires est significativement modifiée avec une augmentation du pourcentage de la macro- et de la medium-vascularisation et une diminution de la micro-vascularisation (**Figure 63-C**). Si l'on compare cette répartition à celle des tumeurs non traitées, elle correspond à l'architecture d'une tumeur de grosse taille (environ 4 cm<sup>2</sup>) (**Figure 63-D**). Ceci indique donc qu'à deux semaines, la chimiothérapie contrôle le développement de la tumeur, mais pas celui de la vascularisation.



**Figure 62 : Effet d'un régime enrichi en AGPI n-3 sur l'évolution de la surface tumorale et de la vascularisation dans les groupes de rats traités au docétaxel.**

(A) Variation de la surface tumorale au cours de la chimiothérapie. (B) Variation de la densité de vascularisation globale au cours de la chimiothérapie. Les points représentent les moyennes de 16 rats, la barre, les écarts type à la moyenne. (C) Evolution de la répartition des compartiments vasculaires. Chaque secteur représente la valeur moyenne des répartitions de 16 rats. La taille des secteurs est proportionnelle à la taille des tumeurs à la semaine correspondante. Comparaison avec la semaine 0 (a) et avec le groupe docétaxel (b) par test de Mann-Whitney, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

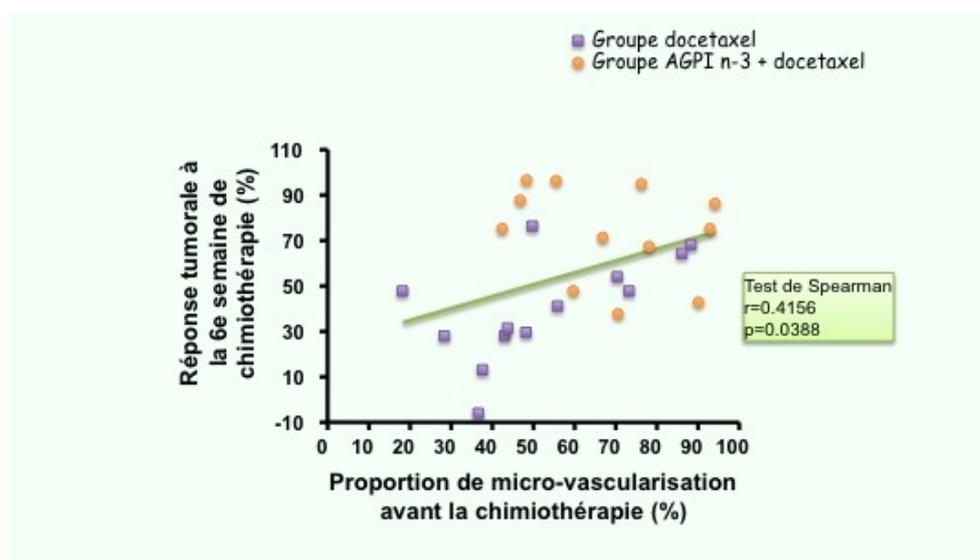
Après six semaines de traitement, alors que la surface tumorale est légèrement diminuée, la densité de vascularisation globale a tendance à être réduite ( $p = 0.079$ ) ce qui traduit un effet anti-angiogénique du docétaxel. En effet, nous avons montré précédemment dans le groupe témoin que la densité vasculaire est stable quel que soit la taille de la tumeur. En utilisant les résultats de l'étude sur les tumeurs non traitées qui établissent la relation entre le pourcentage de la macro-vascularisation et la taille de la tumeur (**Figure 62-C**), une valeur moyenne de surface tumorale de 1.9 cm<sup>2</sup> aurait dû correspondre à une valeur moyenne de pourcentage de macro-vascularisation de l'ordre de 5.4 %. A la fin de

la chimiothérapie, une moyenne de 2 % de macro-vascularisation est mesurée, ce qui représente une importante réduction de ce compartiment par le docétaxel.

Dans le groupe AGPI n-3 + docétaxel, à deux semaines de traitement, la croissance tumorale est stoppée. La densité de vascularisation globale et la répartition des compartiments vasculaire ne sont pas modifiées (**Figure 63-B**) par rapport à celles observées avant la chimiothérapie. Contrairement au régime témoin, après deux semaines, la chimiothérapie associée au régime AGPI n-3 limite le développement de la tumeur et de sa vascularisation.

Après six semaines de traitement, la surface tumorale est diminuée de 70%. La densité de vascularisation globale est fortement réduite, ce qui traduit un effet anti-angiogénique du docétaxel majoré par les AGPI n-3. En utilisant la relation entre le pourcentage de la macro-, la medium et la micro-vascularisation et la taille de la tumeur obtenue pour les tumeurs AGPI n-3, une valeur moyenne de surface tumorale de 0.6 cm<sup>2</sup> aurait dû correspondre à des valeurs moyennes de macro-, de medium- et de micro-vascularisation, de 2.1 % , 31.2 % et 66.7 % respectivement. Or les pourcentages de macro- et de medium-vascularisation réellement mesurés à la fin de la chimiothérapie sont nettement inférieurs et la micro-vascularisation est quant à elle légèrement augmentée. L'ensemble de ces résultats reflète une forte diminution de la vascularisation tumorale à la fin de la chimiothérapie sous docétaxel, majorée par les AGPI n-3.

### **)c Importance du compartiment microvasculaire sur la réponse à la chimiothérapie.**



**Figure 63 : Relation entre la proportion de microvascularisation dans les tumeurs mesurée avant la chimiothérapie (semaine 0) et la réponse des tumeurs à la fin de la chimiothérapie (semaine 6).**

La relation linéaire est déterminée sur l'ensemble des données (groupe docétaxel et groupe AGPI n-3 + docétaxel).

Le compartiment micro-vasculaire semble jouer un rôle clé dans la réponse tumorale au docétaxel, puisqu'il existe une corrélation entre le pourcentage de micro-vascularisation avant le début de la chimiothérapie et la régression tumorale en fin de chimiothérapie ( $r = 0.4156$ ;  $p = 0.0388$ , **Figure 64**).

De plus, le pourcentage de micro-vascularisation dans les tumeurs avant la chimiothérapie est significativement plus important dans le groupe AGPI n-3 + docetaxel que dans le groupe docetaxel ( $65 \pm 20$  vs  $49 \pm 21$  % respectivement,  $p < 0.05$ ). Ce résultat concorde avec l'effet potentialisateur des AGPI n-3 sur la réponse des tumeurs au docetaxel.

En conclusion, les AGPI n-3 permettent une réponse plus précoce des tumeurs au docetaxel et potentialisent l'effet anti-tumoral et anti-vasculaire du docetaxel. Cet effet semble être associé à une plus forte proportion de micro-vascularisation dans les tumeurs avant le début de la chimiothérapie.

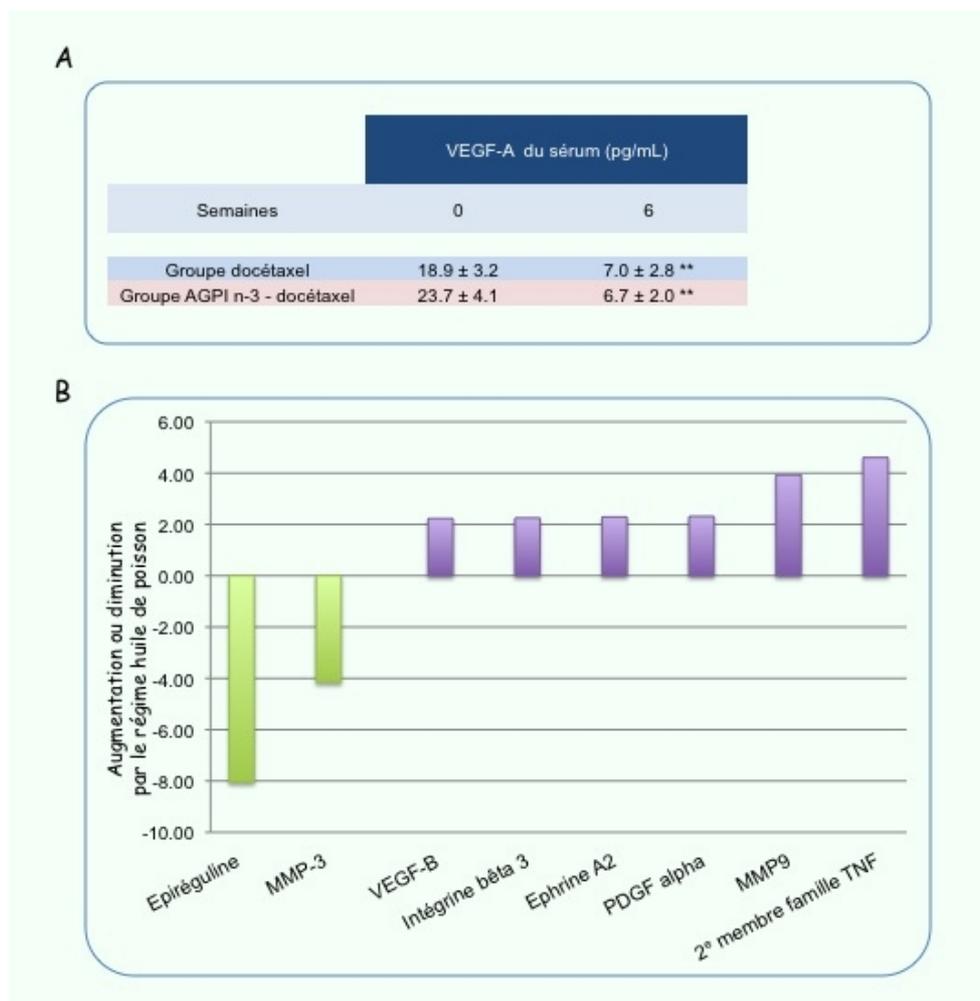
**)d Mesure de la pression partielle en oxygène tumorale.**

Dans le groupe témoin, la  $PO_2$  mesurée dans les tumeurs après 6 semaines de traitement est de l'ordre de 36 mmHg (**données non montrées**). La régression tumorale étant importante dans le groupe AGPI n-3, la  $PO_2$  n'a pu être mesurée en fin de chimiothérapie.

**)e Les AGPI n-3 modifient-ils l'expression de facteurs de l'angiogenèse (expression protéique et génique) ?**

Nous avons mesuré les taux de protéine VEGF-A dans le sérum des rats traités au docetaxel avant et après la chimiothérapie. Le taux de VEGF-A circulant dans le sérum est diminué de manière significative à la fin du traitement par le docetaxel (**Figure 65-A**) ( $p < 0.01$ ). Les valeurs de taux de VEGF-A dans le groupe AGPI n-3 + docetaxel ne sont pas différentes.

Nous avons analysé l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse sur puces à oligonucléotides en PCR quantitative en temps réel. La **figure 65-B** représente les gènes qui sont modifiés de manière significative par un régime enrichi en huile de poisson dans les tumeurs traitées au docetaxel. Nous avons observé une diminution significative de l'expression tumorale des gènes de l'épiréguline (de 8 fois,  $p < 0.01$ ) et de la métalloprotéinase-3 (de 4 fois,  $p < 0.05$ ). En revanche les AGPI n-3 augmentent l'expression tumorale des gènes du VEGF-B (de 2.2 fois,  $p < 0.01$ ), de l'intégrine bêta 3 (de 2.2 fois,  $p < 0.05$ ), de l'éphrine A2 (de 2.3 fois,  $p < 0.05$ ), du PDGF alpha (de 2.3 fois,  $p < 0.05$ ), de la métalloprotéinase-9 (de 4 fois,  $p < 0.05$ ), et enfin d'un membre de la famille TNF (de 4.6 fois,  $p < 0.05$ ).



**Figure 64 : Effet d'une supplémentation alimentaire en AGPI n-3 sur l'expression de facteurs de l'angiogenèse après la chimiothérapie.**

(A) Mesure des taux de VEGF-A dans le sérum de rates avant et après chimiothérapie. Les données sont les moyennes ± les écarts type à la moyenne (n = 16). \*\*: p<0.01 semaine 6 vs semaine 0. (B) Augmentation ou diminution de l'expression de gènes de l'angiogenèse par le régime AGPI n-3 dans les tumeurs traitées au docétaxel. Ne sont représentés ici que les gènes significativement modifiés par le régime enrichi en huile de poisson par rapport au régime témoin (n = 6).

## .2 Discussion

Les résultats du premier objectif de cette étude suggèrent que les AGPI n-3 améliorent l'organisation du réseau vasculaire lors de la croissance tumorale. De plus, nous avons montré que les AGPI n-3 peuvent augmenter la sensibilité des tumeurs mammaires au docétaxel et cet effet est associé à une diminution accrue de la vascularisation tumorale en fin de chimiothérapie. Cet effet semble être associé à une plus forte proportion de micro-vascularisation dans les tumeurs du groupe AGPI n-3 + docétaxel avant le début de la chimiothérapie.

Le docétaxel a été décrit comme présentant un effet antiangiogénique dans plusieurs études <sup>345</sup> <sup>346</sup> <sup>347</sup>. Ces études mesurent l'ensemble de la vascularisation

<sup>345</sup> Grant DS. Int J Cancer. 2003. PMID : 12532428.

<sup>346</sup> Klauber N. Cancer Res. 1997. PMID : 8988045.

<sup>347</sup> Belotti D. Clin Cancer Res. 1996. PMID : 9816139.

fonctionnelle et non-fonctionnelle et de plus quantifie la vascularisation à la fin de la chimiothérapie. Grâce à l'échographie de contraste et ARCHIVASC, nous avons pu suivre au cours du traitement l'effet du docétaxel sur la densité de vascularisation et sur la répartition des compartiments vasculaires. Il apparaît que cet effet est tardif. En effet, le docétaxel stabilise la croissance de la tumeur après deux semaines de chimiothérapie mais ne stoppe pas la vascularisation tumorale. Ceci pourrait indiquer que le docétaxel n'a pas d'action cytotoxique directe sur les cellules endothéliales à deux semaines, et/ou d'action inhibitrice de la production de facteurs proangiogéniques favorisant la prolifération des cellules endothéliales. Après 6 semaines de chimiothérapie, nous avons observé un effet anti-vasculaire du docétaxel. Ceci pourrait être la conséquence de la diminution des facteurs proangiogéniques comme nous l'avons observé pour le VEGF-A synthétisé par les cellules tumorales.

Nous avons observé que le pourcentage de micro-vascularisation dans les tumeurs avant chimiothérapie était positivement corrélé à la réponse des tumeurs au docétaxel. La part de micro-vascularisation est significativement plus importante dans le groupe AGPI n-3 + docétaxel avant la chimiothérapie et augmente à la fin de la chimiothérapie. Les AGPI n-3 en modifiant l'architecture vasculaire et en favorisant la micro-vascularisation tumorale peuvent ainsi améliorer la distribution intra-tissulaire de l'agent anticancéreux. En effet, la réponse des tumeurs au docétaxel est plus précoce avec les AGPI n-3 et plus importante en fin de chimiothérapie. En effet, la micro-vascularisation capillaire joue un rôle important dans la distribution de l'oxygène et des nutriments au sein des tissus. Une forte proportion de micro-vascularisation pourrait permettre une meilleure distribution de l'agent anticancéreux à l'ensemble des cellules tumorales et favoriser son action.

L'augmentation de la micro-vascularisation pourrait également améliorer la distribution de l'oxygène. Il est aujourd'hui connu que la plupart des molécules anti-angiogéniques utilisées en thérapeutiques normalisent le réseau vasculaire et rétablissent l'oxygénation (cf le paragraphe sur la vascularisation tumorale dans l'introduction)<sup>348</sup>. L'architecture vasculaire obtenue (tumeur avec une micro-vascularisation prépondérante) en fin de traitement est associée à une normalisation de la PO<sub>2</sub>, ce qui pourrait traduire une amélioration de la fonction vasculaire tumorale.

Dès la deuxième semaine de chimiothérapie le développement de la vascularisation tumorale est contrôlé dans le groupe AGPI n-3 + docétaxel. Ceci suppose une production de facteurs pro-angiogéniques maîtrisée. C'est ce que l'on observe avec la diminution importante de l'expression tumorale de l'épiréguline par les AGPI n-3. L'épiréguline est un ligand de la famille EGF. Cette famille comprenant sept ligands et quatre récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR/HER ou erbB) est impliquée dans la prolifération cellulaire<sup>349</sup>. Une sur-activation de cette voie de signalisation est observée dans de nombreux cancers, en particulier, le cancer du sein<sup>350 351</sup>. La diminution de la synthèse de l'épiréguline par les AGPI n-3 peut participer à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales et endothéliales. Nous n'avons pas quantifié l'expression d'EGFR, cependant l'équipe de Menendez a montré une diminution de l'expression de l'EGFR par les AGPI n-3 dans des lignées tumorales mammaires<sup>352</sup>. Ces résultats sont des données préliminaires sur un nombre restreint de rats et nécessiteraient une étude plus approfondie sur un nombre plus important d'individus.

---

<sup>348</sup> Jain RK. Nat Rev. 2008. PMID : 18337733.

<sup>349</sup> Normanno N. Gene. 2006. PMID : 16377102.

<sup>350</sup> Dannenberg AJ. J Clin Oncol. 2005. PMID : 15637389.

<sup>351</sup> Komurasaki T. Oncogene. 1997. PMID : 9419975.

<sup>352</sup> Menendez JA. Eur J Cancer Prev. 2005. PMID: 15901996.

En conclusion, la modification du réseau vasculaire par les AGPI n-3 semble être un mécanisme important dans la chimiosensibilisation des tumeurs mammaires. Ces premiers résultats sur l'impact des AGPI n-3 sur la répartition des compartiments vasculaires nécessitent une validation en histologie avec une quantification des vaisseaux en fonction de leur calibre. Des données nous renseignant sur la qualité de la vascularisation pourront enrichir cette étude histologique telle que la mesure du recouvrement en péricytes des vaisseaux. La mesure de la pression partielle en oxygène avec une sonde polarographique ne peut se faire qu'en fin de chimiothérapie. Des indicateurs tels que les nitroimidazoles utilisés en imagerie TEP scan (technique peu invasive) pourraient permettre de suivre indirectement l'oxygénation tumorale au cours du traitement en mesurant l'hypoxie tumorale. Enfin il serait intéressant de mesurer la perméabilité vasculaire en imagerie avec des agents de contraste



## Discussion générale et Perspectives



Ce travail de thèse a eu pour objectif d'identifier les mécanismes par lesquels les AGPI n-3 augmentent la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux (**Figure 66**).

Nous avons montré tout d'abord, que le DHA augmente l'accumulation dans les cellules tumorales mammaires d'un agent anticancéreux, la mitoxantrone, et modifie sa distribution et sa métabolisation intracellulaires avec l'apparition d'un métabolite oxydé de la mitoxantrone. Ces effets sont associés à une toxicité cellulaire accrue de l'agent anticancéreux. De plus, lorsque la production du métabolite oxydé est diminuée en présence d'anti-oxydant (N-acétyl cystéine), l'effet chimiosensibilisant du DHA est aussi inhibé. La production accrue de ce métabolite oxydé par le DHA semble donc jouer un rôle important dans la chimiosensibilisation des cellules tumorales, et pourrait refléter une augmentation du stress oxydant cellulaire.

En effet, les AGPI peuvent augmenter le stress oxydant cellulaire car ils peuvent subir l'attaque d'espèces réactives de l'oxygène. La peroxydation lipidique qui en découle peut avoir des effets cytotoxiques. La production des ERO étant accrue par des agents anticancéreux tels que les anthracyclines, si le nombre des cibles de ces ERO est lui aussi augmenté par une supplémentation en DHA, alors la peroxydation lipidique est majorée. Nous avons montré que l'augmentation de sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux par le DHA est due à l'augmentation de la peroxydation lipidique, cause et conséquence de la diminution des défenses anti-oxydantes cellulaires et en particulier de la GPx.

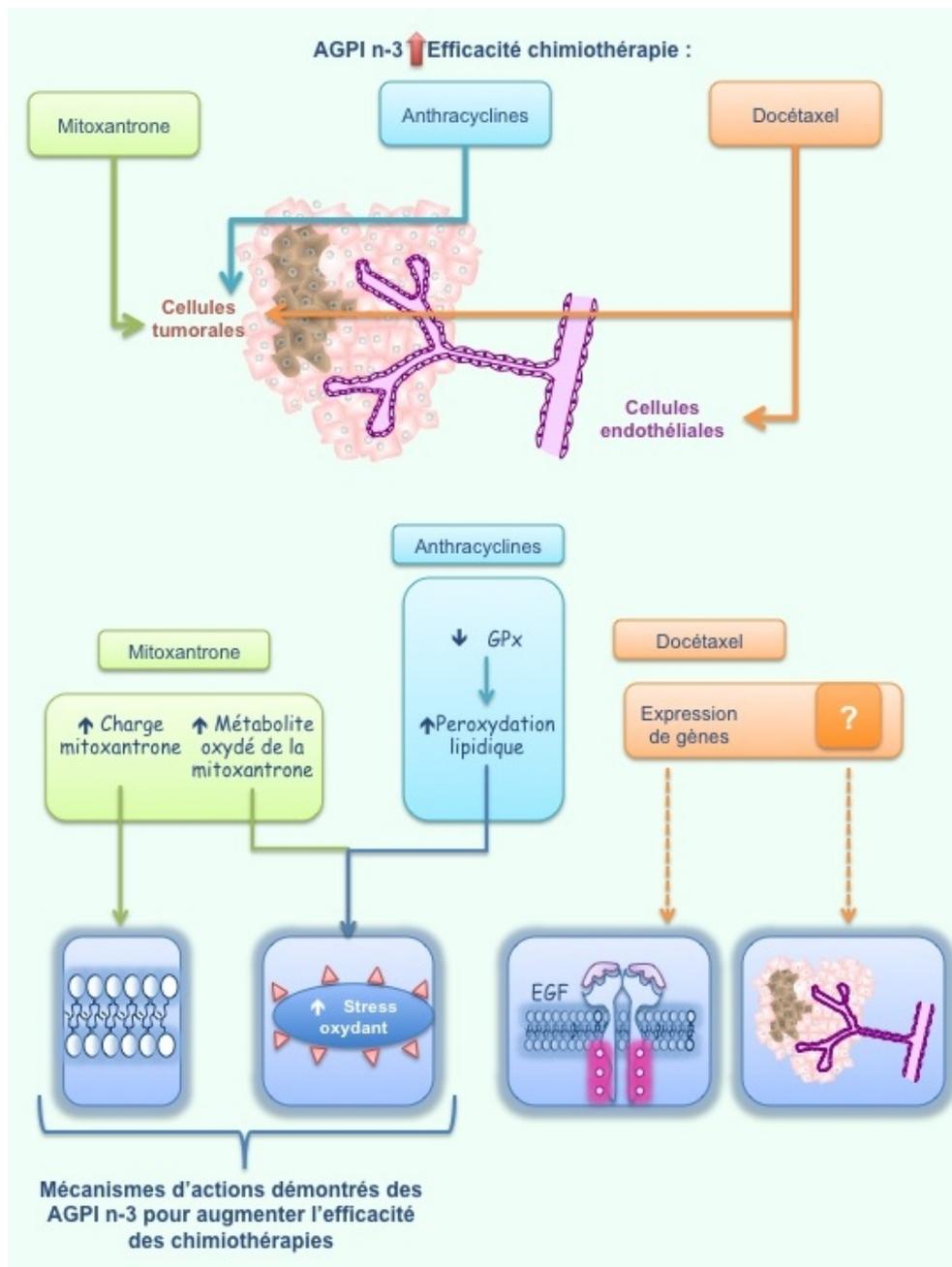
Nous avons montré de plus que les AGPI n-3 potentialisent les effets anti-tumoraux d'une autre classe d'agents anticancéreux, les taxanes. La voie du stress oxydant n'a pas été étudiée dans ce cas. Cependant l'équipe de Noguchi a montré qu'une forte expression d'enzyme antioxydante avant le traitement était associée à un mauvais pronostic de réponse au docetaxel de patients atteints de cancer du sein <sup>353 354</sup>. La réponse des tumeurs au docetaxel semble donc impliquer la voie du stress oxydant. L'effet du DHA sur la diminution de l'activité de la GPx et sur l'augmentation du stress oxydant que nous avons observé dans les cellules tumorales mammaires pourrait ainsi expliquer une meilleure réponse des tumeurs traitées au docetaxel par les AGPI n-3.

Enfin, nous avons montré que les AGPI n-3 potentialisent les effets anti-vasculaires du docetaxel et cet effet serait associé à une modification de la répartition des compartiments vasculaires par les AGPI n-3. Les AGPI n-3 en favorisant la micro-vascularisation tumorale peuvent ainsi améliorer la distribution intra-tissulaire de l'agent anticancéreux. Il reste à explorer les mécanismes qui sous-tendent l'effet des AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale.

---

<sup>353</sup> Kim SJ. Clin Cancer Res. 2005. PMID : 16322305.

<sup>354</sup> Iwao-Koizumi K. J Clin Oncol. 2005. PMID : 15659489.



**Figure 65 : Résultats principaux des travaux de thèse sur les mécanismes d'actions démontrés des AGPI n-3 pour augmenter l'efficacité des chimiothérapies.**

(?) Le mécanisme d'action expliquant l'effet structurant des AGPI n-3 sur l'architecture vasculaire nécessite des investigations supplémentaires.

### **Perspectives**

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que la réponse des tumeurs *in vivo* aux anthracyclines était corrélée à la dérégulation de la GPx. Les mécanismes expliquant la défaillance de la GPx dans les cellules MDA-MB-231 restent à explorer. Qu'est ce qui différencie la lignée MDA-MB-231 de la lignée MCF-7 et qui pourrait expliquer que cette dérégulation de la GPx soit observée uniquement dans les cellules MDA-MB-231 ? Nous avons émis l'hypothèse que l'absence de protéine P53 dans les cellules tumorales MDA-MB-231 expliquerait l'absence d'induction de la GPx que ce soit par les AGPI n-3 ou par la doxorubicine. Afin de savoir si la présence d'une protéine P53 fonctionnelle est suffisante pour permettre à la GPx d'être induite, des transfectants stables MDA-MB-231 P53+ et des cellules MCF-7 traitées avec des ARN interférants dirigés contre les ARNm P53 pourraient être utilisés. De plus, il serait intéressant d'observer si l'extinction de la GPx seule dans les MCF-7 suffit à sensibiliser ces cellules à la doxorubicine. Des ARN interférants ou des traitements avec des inhibiteurs de l'activité GPx comme le mercaptosuccinate pourraient être utilisés.

Outre la protéine P53, les récepteurs aux rétinoïdes qui sont activés par le DHA (RXR alpha murin ou RXR bêta humain) peuvent aussi réguler l'expression de la GPx. En effet, il a été montré que les RXR sont actifs dans les MCF-7, et inactifs dans les MDA-MB-231<sup>355</sup>. De plus, une étude<sup>356</sup> a montré que des souris déficientes en RXR alpha présentaient des taux réduits de la protéine GPx1.

Enfin la GPx est une enzyme importante dans la lutte contre le stress oxydant et une altération de cette défense anti-oxydante peut fragiliser les cellules cancéreuses et augmenter spécifiquement l'efficacité des traitements anticancéreux qui génèrent des ERO. Il serait donc intéressant d'étudier en clinique la relation entre l'expression / l'activité de la GPx dans les tumeurs, le taux d'AGPI n-3 dans le tissu adipeux et le pronostic de réponse du cancer du sein aux chimiothérapies.

Nous avons montré un effet potentialisateur des AGPI n-3 sur l'activité antiangiogénique du docétaxel. Cependant les mécanismes d'action responsables de cet effet des AGPI n-3 sur la vascularisation restent à éclaircir. Nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'une augmentation du stress oxydant par les AGPI n-3 dans les cellules endothéliales. En effet, une étude précédente au laboratoire a montré que l'effet inhibiteur des AGPI n-3 sur la vascularisation était aboli en présence d'un anti-oxydant, la vitamine E<sup>357</sup>. Les AGPI n-3 en augmentant le stress oxydant dans les cellules endothéliales pourraient ainsi les sensibiliser aux agents anticancéreux.

Les ERO sont des molécules impliquées dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Les effets des radicaux oxygénés sur l'angiogenèse sont controversés et semblent dépendre de l'oxygénation de la tumeur. En conditions normoxiques, les ERO favorisent l'angiogenèse car ils empêchent l'activation des prolyl-hydroxylases intervenant dans la dégradation de HIF<sup>358 359 360</sup>. Au contraire dans les conditions hypoxiques une augmentation modérée des ERO ou des dérivés azotés augmente l'activité des prolyl-hydroxylases ce qui entraîne une dégradation de HIF (ce qui tendrait vers une diminution de l'angiogenèse). Cet effet a été décrit pour être contrecarré par l'ajout de molécules anti-oxydantes<sup>361</sup>. Il

<sup>355</sup> Tanaka T. Mol Cell Biol. 2004. PMID : 15082790.

<sup>356</sup> Wu Y. Mol Pharmacol. 2004. PMID : 14978233.

<sup>357</sup> Colas S. Clin Cancer Res. 2006. PMID: 17020996.

<sup>358</sup> Gerald D. Cell. 2004. PMID : 15369676.

<sup>359</sup> Pouyssegur J. Biol Chem. 2006. PMID : 17081104.

<sup>360</sup> Sandau KB. Blood. 2001. PMID : 11159530.

<sup>361</sup> Callapina M. Free Radic Biol Med. 2005. PMID : 16140212.

paraît donc nécessaire d'approfondir l'étude des effets du DHA sur le statut oxydant des cellules endothéliales en condition normoxiques et hypoxiques.

Outre leur effet indirect sur la vascularisation via le stress oxydant, il a été montré que les AGPI n-3 sont capables de diminuer l'expression du VEGFR<sub>2</sub> dans les cellules endothéliales<sup>362 363 364</sup>. Or une étude a montré que l'injection d'un anticorps dirigé contre le VEGFR<sub>2</sub> chez la souris aboutit à une diminution des vaisseaux tumoraux et à leur « normalisation » avec une couche homogène de péricytes. La normalisation des vaisseaux se caractérise par une augmentation des différences de pressions hydrostatiques et oncotiques entre le compartiment vasculaire et interstitiel. Ceci favorise les échanges entre ces deux compartiments et augmente la pénétration d'oxygène ou d'agents anticancéreux dans la tumeur<sup>365</sup>. Une diminution de la synthèse d'HIF- $\alpha$  par le DHA dans des cellules de cancer du colon a également été rapportée<sup>366</sup>. Ainsi les AGPI n-3, en agissant via VEGFR<sub>2</sub> ou HIF- $\alpha$ , seraient susceptibles de « normaliser » l'architecture des vaisseaux, et d'assurer ainsi une meilleure distribution de l'oxygène au sein des tumeurs. Il est donc nécessaire d'approfondir l'étude des gènes de l'angiogenèse initiée dans ces travaux de thèse. Il paraît aussi nécessaire de poursuivre l'étude de l'effet des AGPI n-3 sur la normalisation de la vascularisation des tumeurs mammaires en mesurant le recouvrement des vaisseaux par les péricytes, les pressions interstitielles tumorales et la mesure de l'oxygénation tumorale. De plus, des marqueurs de l'hypoxie tels que les nitroimidazoles, (pimonidazole en immunohistochimie ou le Fluoro-misonidazole (FMISO) en tomographie par émission de positrons) ou l'analyse de l'expression tumorale de l'anhydrase carbonique 9 qui est induite par HIF, pourraient permettre d'étudier de manière indirecte l'oxygénation tumorale.

En conclusion les travaux de cette thèse ont montré que la sensibilisation des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux par les AGPI n-3 impliquait la voie du stress oxydant et plus particulièrement la glutathion peroxydase. En collaboration avec le service d'Anatomie Pathologie du CHU de Tours, une étude clinique évaluant l'expression et l'activité de la GPx dans des tumeurs mammaires a été initiée cette année. Nous avons montré de plus que l'effet chimiosensibilisant des AGPI n-3 implique la vascularisation tumorale. L'étude de cet effet reste descriptive. Cependant, elle a permis d'ouvrir de nombreuses pistes mécanistiques pouvant rendre compte de l'effet des AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale.

---

<sup>362</sup> Tevar R. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2002. PMID : 12216707.

<sup>363</sup> Tsuji M. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2003. PMID : 12711251.

<sup>364</sup> Yang SP. J Cell Physiol. 1998. PMID : 9648921.

<sup>365</sup> Tong RT. Cancer Res. 2004. PMID : 15172975.

<sup>366</sup> Calviello G. Carcinogenesis. 2004. PMID : 15358633.

## Références bibliographiques



- AFSSA (2008 - Septembre). <http://www.afssa.fr/TableCIQUAL/index.htm>
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Alitalo K. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):946-53. PMID: 16355212.
- Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(1):1-11. PMID: 11340256.
- Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc*. 2006 Sep;81(9):1241-57. PMID: 16970222.
- Anderson TJ, Ferguson DJ, Raab GM. Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer*. 1982 Sep;46(3):376-82. PMID: 7126427.
- Asahi M, Fujii J, Takao T, Kuzuya T, Hori M, Shimonishi Y, Taniguchi N. The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem*. 1997 Aug 1;272(31):19152-7. PMID : 9235904.
- Attributable causes of cancer in France in the year 2000, OMS-Centre international de recherche sur le cancer, Group reports volume 3, 2007.
- Auerbach R. Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int J Radiat Biol*. 1991 Jul-Aug;60(1-2):1-10. PMID: 1677953.
- Aurousseau B, Gruffat D, Durand D. Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reprod Nutr Dev*. 2006 Nov-Dec;46(6):601-20. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17169308.
- Aurousseau B. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod Anim*. 2002. 15(1), 67-82.
- Badawi AF, El-Sohemy A, Stephen LL, Ghoshal AK, Archer MC. The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of cyclooxygenase 1 and 2 and levels of p21ras in rat mammary glands. *Carcinogenesis*. 1998 May;19(5):905-10. PMID : 9635881.
- Bagga D, Anders KH, Wang HJ, Glaspy JA. Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr Cancer*. 2002;42(2):180-5. PMID : 12416257.
- Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan ML. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006 Feb;38(2):196-208. PMID: 16194618.
- Barouki R, Morel Y. Oxidative stress and gene expression. *J Soc Biol*. 2001;195(4):377-82. PMID : 11938553.
- Baumgartner M, Sturlan S, Roth E, Wessner B, Bachleitner-Hofmann T. Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using docosahexaenoic acid in arsenic trioxide-resistant solid tumor cells. *Int J Cancer*. 2004 Nov 20;112(4):707-12. PMID : 15382055.
- Bazan NG. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007 Mar;10(2):136-41. PMID : 17285000.
- Bazan NG. The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2006 Jul-Aug;26(4-

6):901-13. Epub 2006 Aug 1. PMID: 16897369.

Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Tarabozetti G. Clin Cancer Res. 1996 Nov;2(11):1843-9. PMID : 9816139.

Benchekroun MN, Robert J. Measurement of doxorubicin-induced lipid peroxidation under the conditions that determine cytotoxicity in cultured tumor cells. Anal Biochem. 1992 Mar;201(2):326-30. PMID: 1632521.

Benchekroun MN, Sinha BK, Robert J. Doxorubicin-induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. FEBS Lett. 1993 Jul 12;326(1-3):302-5. PMID: 8392002.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med. 2002. PMID: 11818483.

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. 2003;53:409-35. PMID: 12778130.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. Endocr Rev. 1997 Feb;18(1):26-45. PMID: 9034785.

Biondo PD, Brindley DN, Sawyer MB, Field CJ. J Nutr Biochem. 2008 Jul 3. PMID : 18602809

Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Delattre J. Radicaux libres et anti-oxydants. Tiré de « Biochimie Pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires». 2003. Ed. Flammarion Médecine-Sciences pages : 59 :81. ISBN : 2-257-10946-5.

Borgeson CE, Pardini L, Pardini RS, Reitz RC. Effects of dietary fish oil on human mammary carcinoma and on lipid-metabolizing enzymes. Lipids. 1989 Apr;24(4):290-5. PMID : 2502698.

Bortman P, Folgueira MA, Katayama ML, Snitcovsky IM, Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review. Braz J Med Biol Res. 2002 Jan;35(1):1-9. PMID : 11743608.

Bougnoux P, Chajès V, Germain E, Hubert B, Lhuillery C, Le Floch O, Body G, Calais G. Cytotoxic drug efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. Lipids. 1999;34 Suppl:S109. PMID: 10419111.

Bougnoux P, Germain E, Chajès V, Hubert B, Lhuillery C, Le Floch O, Body G, Calais G. Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. Br J Cancer 1999 Apr;79(11-12):1765-9. PMID : 10206290.

Bougnoux P, Hajjaji N, Baucher MA, Jourdan ML, Goupille C, Body G, Le Floch O. Docosahexaenoic acid (DHA) intake during first line chemotherapy improves survival in metastatic breast cancer. AACR Meeting Abstracts. 2006. Abstract number 5376.

Bougnoux P, Giraudeau B, Couet C. Diet, cancer, and the lipidome. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Mar;15(3):416-21. PMID: 16537692.

Bougnoux P, Koscielny S, Chajès V, Descamps P, Couet C, Calais G. alpha-Linolenic acid content of adipose breast tissue: a host determinant of the risk of early metastasis in breast cancer. Br J Cancer. 1994 Aug;70(2):330-4. PMID : 7914425.

Bougnoux P. n-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1999 Mar;2(2):121-6. PMID : 10453342.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973 Jul;134(3):707-16. PMID : 4749271.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972 Jul;128(3):617-30. PMID: 4404507.

Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. (1996). Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer." *Contraception* 54(3 Suppl): 1S-106S

Breast cancer cell line database

<http://www.mdanderson.org/departments/cancerbiology/dlIndex.cfm?pn=31062032-B0EB-11D4-80FB00508B603A14> (Septembre – 2008).

Brigélius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 1999 Nov;27(9-10):951-65. PMID : 10569628.

Brossard N, Croset M, Pachiaudi C, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. Retroconversion and metabolism of [<sup>13</sup>C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [<sup>13</sup>C]22:6n-3-triacylglycerols. *Am J Clin Nutr.* 1996 Oct;64(4):577-86. PMID : 8839503.

Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1878-86. PMID: 10766175.

Bryant RW, Simon TC, Bailey JM. Role of glutathione peroxidase and hexose monophosphate shunt in the platelet lipoxygenase pathway. *J Biol Chem.* 1982 Dec 25;257(24):14937-43. PMID : 6816802.

Burns CP, Luttenegger DG, Dudley DT, Buettner GR, Spector AA. Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and methotrexate transport in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.* 1979 May;39(5):1726-32. PMID : 218733.

Burns CP, Spector AA. Effects of lipids on cancer therapy. *Nutr Rev.* 1990 Jun;48(6):233-40. PMID : 1365747.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1977 Apr 30;180(2):248-57. PMID : 195520.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2000 Aug;29(3-4):222-30. PMID: 11035250.

Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974 Sep;53(3):661-74. PMID : 4412247.

Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug;56 Suppl 3:S14-9. PMID: 12142955.

Callapina M, Zhou J, Schmid T, Köhl R, Brüne B. NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2005 Oct 1;39(7):925-36. PMID : 16140212.

Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N, Tringali G, Navarra P, Ranelletti FO, Palozza P. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis*. 2004 Dec;25(12):2303-10. Epub 2004 Sep 9. PMID: 15358633.

Calviello G, Serini S, Piccioni E. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. *Curr Med Chem*. 2007 ; 14(29):3059-69. PMID: 18220742.

Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999 ;237:133-58. PMID: 9893349.

Caygill CP, Charlett A, Hill MJ. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer*. 1996 Jul;74(1):159-64. PMID : 8679451.

Chajès V, Bougnoux P. Omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acid ratio and cancer. *World Rev Nutr Diet*. 2003 ;92:133-51. PMID : 14579688.

Chajès V, Hultén K, Van Kappel AL, Winkvist A, Kaaks R, Hallmans G, Lenner P, Riboli E. Fatty-acid composition in serum phospholipids and risk of breast cancer: an incident case-control study in Sweden. *Int J Cancer*. 1999 Nov 26;83(5):585-90. PMID: 10521790.

Chajès V, Thiébaud AC, Rotival M, Gauthier E, Maillard V, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir GM, Clavel-Chapelon F. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol*. 2008 Jun 1;167(11):1312-20. Epub 2008 Apr 4. PMID : 18390841.

Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 1):2169-79. PMID : 3058718.

Chaudiere J, Wilhelmsen EC, Tappel AL. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J Biol Chem*. 1984 Jan 25;259(2):1043-50. PMID : 6693375.

Chen HW, Lii CK, Wu MH, Ou CC, Sheen LY. Amount and type of dietary lipid modulate rat hepatic cytochrome P-450 activity. *Nutr Cancer*. 1997 ;29(2):174-80. PMID : 9427983.

Chen HW, Yang JJ, Tsai CW, Wu JJ, Sheen LY, Ou CC, Lii CK. Dietary fat and garlic oil independently regulate hepatic cytochrome p(450) 2B1 and the placental form of glutathione S-transferase expression in rats. *J Nutr*. 2001 May;131(5):1438-43. PMID: 11340096.

Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. *Exp Biol Med*. 2007 Sep;232(8):1071-80. PMID : 17720953

Chiu LC, Wan JM. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett*. 1999 Oct 18;145(1-2):17-27. PMID : 10530765.

Chiu LC, Wong EY, Ooi VE. Docosahexaenoic acid modulates different genes in cell cycle and apoptosis to control growth of human leukemia HL-60 cells. *Int J Oncol*. 2004 Sep;25(3):737-44. PMID : 15289877.

Chu FF, Esworthy RS, Lee L, Wilczynski S. Retinoic acid induces Gpx2 gene

expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Nutr.* 1999 Oct;129(10):1846-54. PMID : 10498757.

Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.* 2000 Sep 1;60(17):4705-8. PMID : 10987272.

Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 1;90(7):3113-7. PMID : 8464931.

Clavel-Chapelon F; E3N-EPIC Group. Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. E3N-EPIC Group. *Br J Cancer.* 2002 Mar 4;86(5):723-7. PMID: 11875733.

Colas S, Germain E, Arab K, Maheo K, Goupille C, Bougnoux P. Alpha-tocopherol suppresses mammary tumor sensitivity to anthracyclines in fish oil-fed rats. *Nutr Cancer.* 2005;51(2):178-83. PMID: 15860440.

Colas S, Mahéo K, Denis F, Goupille C, Hoinard C, Champeroux P, Tranquart F, Bougnoux P. Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5879-86. PMID : 17020996.

Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, Le Floch O, Ogilvie G, Bougnoux P. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer.* 2004 Apr 10;109(3):449-54. PMID: 14961586.

Collett ED, Davidson LA, Fan YY, Lupton JR, Chapkin RS. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 ;280(5):C1066-75. PMID : 11287318.

Connolly JM, Liu XH, Rose DP. Effects of dietary menhaden oil, soy, and a cyclooxygenase inhibitor on human breast cancer cell growth and metastasis in nude mice. *Nutr Cancer.* 1997;29(1):48-54. PMID : 9383784.

Connolly JM, Rose DP. Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Lett.* 1998 Oct 23;132(1-2):107-12. PMID: 10397460.

Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, Hong S, Pravda EA, Majchrzak S, Carper D, Hellstrom A, Kang JX, Chew EY, Salem N Jr, Serhan CN, Smith LE. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):868-73. Epub 2007 Jun 24. PMID : 17589522.

Cook HW, Spence MW. Triacylglycerol as a precursor in phospholipid biosynthesis in cultured neuroblastoma cells: studies with labeled glucose, fatty acid, and triacylglycerol. *Can J Biochem Cell Biol.* 1985 Sep;63(9):919-26. PMID: 4075230.

Corey EJ, Shih C, Cashman JR. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(12):3581-4. PMID : 6304720.

Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 1987 May;22(5):299-304. PMID: 3600206.

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide

dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Nov 1;89(21):10405-9. PMID : 1332049.

Crawford M, Galli C, Visioli F, Renaud S, Simopoulos AP, Spector AA. Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann Nutr Metab*. 2000 ;44(5-6):263-5. PMID : 11146334.

Cunnane SC, Ryan MA, Craig KS, Brookes S, Koletzko B, Demmelmair H, Singer J, Kyle DJ. Synthesis of linoleate and alpha-linolenate by chain elongation in the rat. *Lipids*. 1995 Aug;30(8):781-3. PMID : 7475996.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 1994 Sep 9;265(5178):1582-4. PMID: 7521539.

Dannenber AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 10;23(2):254-66. PMID : 15637389.

Das UN, Madhavi N, Sravan Kumar G, Padma M, Sangeetha P. Can tumour cell drug resistance be reversed by essential fatty acids and their metabolites? *Prostaglan Leukotrienes Essen Fatty Acids*. 1998 Jan;58(1):39-54. PMID : 9482165.

Das UN. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit*. 2002 Apr;8(4):RA79-92. PMID : 11951081.

Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1993 Apr;264(4 Pt 1):C961-7. PMID : 8386454.

de Urquiza AM, Liu S, Sjöberg M, Zetterström RH, Griffiths W, Sjövall J, Perlmann T. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*. 2000 Dec 15;290(5499):2140-4. PMID: 11118147.

Deby C, Pincemail J. Toxicity of oxygen, free radicals and defense mechanisms. *Presse Med*. 1986 Sep 25;15(31):1468-74. PMID: 3024143.

DeGraffenried LA, Friedrichs WE, Fulcher L, Fernandes G, Silva JM, Peralba JM, Hidalgo M. Eicosapentaenoic acid restores tamoxifen sensitivity in breast cancer cells with high Akt activity. *Ann Oncol*. 2003 Jul;14(7):1051-6. PMID : 12853346.

Delton-Vandenbroucke I, Véricel E, Januel C, Carreras M, Lecomte M, Lagarde M. Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free Radic Biol Med*. 2001 Apr 15;30(8):895-904. PMID : 11295532.

Ding WQ, Lind SE. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Mol Canc Ther*. 2007 Apr;6(4):1467-74. PMID : 17431126.

Ding WQ, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Mol Canc Ther*. 2004 Sep;3(9):1109-17. PMID : 15367705.

Dudek AZ, Nesmelova I, Mayo K, Verfaillie CM, Pitchford S, Slungaard A. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4687-94. Epub 2003 Feb 13. PMID: 12586630.

Duguet M, Riou JF. De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et

anticancéreux. *Médecine Sciences*. 1994. 10 : 962-72.

Duthie SJ, Grant MH. The role of reductive and oxidative metabolism in the toxicity of mitoxantrone, adriamycin and menadione in human liver derived Hep G2 hepatoma cells. *Br J Cancer*. 1989 Oct;60(4):566-71. PMID: 2553092.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999 ;237:97-132. PMID: 9893348.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1;20(21):4368-80. PMID: 12409337.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 1994 Oct;107(4):1183-8. PMID : 7926468.

El Hage F, Abouzahr-Rifai S, Meslin F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Immune response and cancer. *Bull Cancer*. 2008 Jan 1;95(1):57-67. PMID: 18230571.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10. PMID : 1757079.

Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem*.1983 Jun 1;133(1):51-69. PMID : 6852035.

Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*. 2000 Mar 17;448(2):121-38. PMID: 10725467.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991 ;11(1):81-128. PMID: 1937131.

Fairchild CR, Ivy SP, Kao-Shan CS, Whang-Peng J, Rosen N, Israel MA, Melera PW, Cowan KH, Goldsmith ME. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1987 Oct 1;47(19):5141-8. PMID: 2441861.

Feron O. Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Oct;25(10):536-42. PMID: 15380938.

Ferrero JM. 1999. <http://www.medespace.com/cancero/doc/sein.html>

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May;226(1):497-509. PMID : 13428781.

Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):23-33. PMID: 11487011.

Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Apr;6(4):273-86. PMID: 17396134.

Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*. 2006 Mar 10;312(5):594-607. Epub 2005 Dec 22. PMID: 16376330

Folkman J. Transplacental carcinogenesis by stilbestrol. *New Eng J Med*. 1971 Aug 12;285(7):404-5. PMID: 5556579.

Fritsche KL, Johnston PV. Effect of dietary alpha-linolenic acid on growth, metastasis, fatty acid profile and prostaglandin production of two murine mammary adenocarcinomas. *J Nutr*. 1990 Dec;120(12):1601-9. PMID : 1979807.

Fujimoto J, Aoki I, Toyoki H, Khatun S, Sato E, Tamaya T. Expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Biomed Sci*. 2003 May-Jun;10(3):320-7. PMID: 12711859.

Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag*. 2005 ;1(4):277-90. PMID: 17315600.

Gee MS, Saunders HM, Lee JC, Sanzo JF, Jenkins WT, Evans SM, Trinchieri G, Sehgal CM, Feldman MD, Lee WM. Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular therapy associated with vascular anatomic alterations. *Cancer Res*. 2001 Apr 1;61(7):2974-82. PMID : 11306476.

Gengrinovich S, Greenberg SM, Cohen T, Gitay-Goren H, Rockwell P, Maione TE, Levi BZ, Neufeld G. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):15059-65. PMID: 7797488.

Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouysségur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):781-94. PMID : 15369676.

Gerald D, Yaniv M, Mechta-Grigoriou M. Stress oxydatif et angiogenèse ; rôle majeur d'AP-1. *Médecine Sciences*. 2005. Vol 21, 233 : 235.

Gérard-Monnier D, Chaudiere J. Metabolism and antioxidant function of glutathionne. *Pathol Biol (Paris)*. 1996 Jan;44(1):77-85. PMID : 8734304.

Gerber B, Müller H, Reimer T, Krause A, Friese K. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 May;79(2):265-76. PMID: 12825861.

Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 2003 Oct;314(1):15-23. Epub 2003 Jul 22. PMID: 12883993.

Germain E, Bonnet P, Aubourg L, Grangeponde MC, Chajès V, Bougnoux P. Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacol Res*. 2003 Feb;47(2):111-7. PMID : 12543058.

Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer*. 1998 Feb 9;75(4):578-83. PMID: 9466659.

Germain E, Lavandier F, Chajès V, Schubnel V, Bonnet P, Lhuillery C, Bougnoux P. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and oxidants increase rat mammary tumor sensitivity to epirubicin without change in cardiac toxicity. *Lipids*. 1999 ;34 Suppl:S203. PMID : 10419150.

Germain E, Lavandier F, Chajès V, Schubnel V, Bonnet P, Lhuillery C, Bougnoux P. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and oxidants increase rat mammary tumor sensitivity to epirubicin without change in cardiac toxicity. 1999 ;34 Suppl:S203. PMID : 10419150.

Glass CK, Lipkin SM, Devary OV, Rosenfeld MG. Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell*. 1989 Nov 17;59(4):697-708. PMID : 2555064.

Gogos CA, Ginopoulos P, Salsa B, Apostolidou E, Zoumbos NC, Kalfarentzos F. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: a randomized control trial. *Cancer*. 1998 Jan 15;82(2):395-402. PMID : 9445198.

Goodstine SL, Zheng T, Holford TR, Ward BA, Carter D, Owens PH, Mayne ST. Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. *J Nutr*. 2003 May;133(5):1409-14. PMID : 12730430.

Gothié E, Pouyssegur J. HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *Médecine Sciences*. 2002. Vol 18, 70 : 78.

Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer*. 2003 Mar 10;104(1):121-9. PMID : 12532428.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. *Circ Res*. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. 2000 Mar 17;86(5):494-501. PMID : 10720409.

Grimaldi PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Prog Lipid Res*. 2001 Jul;40(4):269-81. PMID: 11412892.

Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr*. 2002 Jan;87 Suppl 1:S59-67. PMID : 11895155.

Grossmann A, Wendel A. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur J Biochem*. 1983 Oct 3;135(3):549-52. PMID: 6413205.

Guide to the care and use of experimental animals », canadian council on animal care, volume 1.

Gunstone FD. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Aspen Publihers. 1996. ISBN : 0751402532.

Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):7799-803. PMID: 7644496.

Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2002 Mar 15;62(6):1676-81. PMID : 11912139.

Hall JM, Friedman L, Guenther C, Lee MK, Weber JL, Black DM, King MC. Closing in on a breast cancer gene on chromosome 17q. *Am J Hum Genet*. 1992 Jun;50(6):1235-42. PMID : 1598904.

Hamid R, Singh J, Reddy BS, Cohen LA. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int*

J Oncol. 1999 Mar;14(3):523-8. PMID : 10024686.

Han ZB, Ren H, Zhao H, Chi Y, Chen K, Zhou B, Liu YJ, Zhang L, Xu B, Liu B, Yang R, Han ZC. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). *Carcinogenesis*. 2008 Oct;29(10):1853-61. PMID: 18339685.

Hardman WE, Avula CP, Fernandes G, Cameron IL. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):2041-9. PMID : 11448922.

Hardman WE, Barnes CJ, Knight CW, Cameron IL. Effects of iron supplementation and ET-18-OCH3 on MDA-MB 231 breast carcinomas in nude mice consuming a fish oil diet. *Br J Cancer*. 1997 ;76(3):347-54. PMID : 9252202.

Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Dietary fish oil sensitizes A549 lung xenografts to doxorubicin chemotherapy. *Cancer Lett*. 2000 Apr 14;151(2):145-51. PMID : 10738108.

Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81(3):440-8. PMID : 10507768.

Hardman WE, Munoz J Jr, Cameron IL. Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. *Cancer Cell Internat*. 2002 Jul 17;2(1):10. PMID : 12296973.

Hashimoto M, Hossain MS, Shimada T, Yamasaki H, Fujii Y, Shido O. Effects of docosahexaenoic acid on annular lipid fluidity of the rat bile canalicular plasma membrane. *J Lipid Res*. 2001 Jul;42(7):1160-8. PMID: 11441145.

Hasler CM, Bennink MR, Trosko JE. Inhibition of gap junction-mediated intercellular communication by alpha-linolenate. *Am J Physiol*. 1991 Jul;261(1 Pt 1):C161-8. PMID : 1677533.

Henk M. Verheul, Martijn P. Lolkema, David Z. Qian, Yvonne H. Hilkes, Eleni Liapi, Roberto Pili, Emile E. Voest. Uptake of bevacizumab by platelets blocks the biological activity of platelet-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *AACR Meeting Abstracts*. 2006 . Abstract number 5708.

Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE. Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res*. 2003 Oct;314(1):131-44. Epub 2003 Sep 10. PMID : 13680353.

Holm LE, Nordevang E, Hjalmar ML, Lidbrink E, Callmer E, Nilsson B. Treatment failure and dietary habits in women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Jan 6;85(1):32-6. PMID : 8416253.

Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*. 2003 Apr 25;278(17):14677-87. PMID: 12590139.

Horia E, Watkins BA. Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007 Apr;28(4):809-15. PMID : 17052999.

[http://acces.inrp.fr/acces/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemamm aire/glande\\_mamm\\_cancerisation](http://acces.inrp.fr/acces/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemamm aire/glande_mamm_cancerisation) et de Gray H. *Anatomy of the human body*. bartleby.com.

<http://ccm.ucdavis.edu/bcancercd/contents.html> (Septembre - 2008).

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 3;350(23):2335-42. PMID: 15175435.

Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, Gross L, Stevens A, Pastorek J, Murray PG, Perunovic B, Anwar MS, Billingham L, James ND, Spooner D, Poole CJ, Rea DW, Palmer DH. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2007 Jan 15;96(1):104-9. PMID : 17213826.

IARC. N-methyl-n-nitrosourea. Monographies du Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), 1978.

Ikushima S, Fujiwara F, Todo S, Imashuku S. Effects of polyunsaturated fatty acids on vincristine-resistance in human neuroblastoma cells. *Anticancer Res.* 1991 May-Jun;11(3):1215-20. PMID : 1888152.

Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement G. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1227-33. PMID: 17962514.

ITERG 2002. Informations générales sur les corps gras. <http://www.iterg.com/IMG/pdf/infogenecorpsgras.pdf>

Ivanov A, Cragg MS, Erenpreisa J, Emzinsh D, Lukman H, Illidge TM. Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.*, 2003 Oct 15;116(Pt 20):4095-106. PMID : 12953071.

Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, Kim SJ, Ando A, Miyoshi Y, Maeda E, Noguchi S, Kato K. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 20;23(3):422-31. PMID : 15659489.

Jain RK. Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nat Rev.* 2008 Apr;8(4):309-16. PMID : 18337733.

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93. PMID: 12778167.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005 Jan 7;307(5706):58-62. PMID: 15637262.

Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg.* 2003 Jul;73(7):517-22. PMID : 12864828.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004 Jan-Feb;54(1):8-29. PMID : 14974761.

Jeyarajah DR, Kielar M, Penfield J, Lu CY. Docosahexaenoic acid, a component of fish oil, inhibits nitric oxide production in vitro. *J Surg Res.* 1999 May 15;83(2):147-50. PMID: 10329109.

Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.*

1998 Apr;27(3):179-209. PMID : 9649932.

Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Apr;13(2):155-64. PMID: 11891418.

Jung YD, Ahmad SA, Akagi Y, Takahashi Y, Liu W, Reinmuth N, Shaheen RM, Fan F, Ellis LM. Role of the tumor microenvironment in mediating response to anti-angiogenic therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2000 ;19(1-2):147-57. PMID: 11191054.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2003 Jun;3(6):422-33. PMID: 12778132.

Karmali RA, Chao CC, Basu A, Modak M. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on mammary H-ras expression and PGE2 levels in DMBA-treated rats. *Anticancer Res.* 1989 Jul-Aug;9(4):1169-74. PMID : 2510583.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11. PMID : 1933891.

Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer.* 2003 1;97(3 Suppl):825-33. PMID: 12548582.

Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Aug 15;88(16):7381-5. PMID : 1651504.

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov 15;90(22):10705-9. PMID: 8248162.

Khair-El-Din T, Sicher SC, Vazquez MA, Chung GW, Stallworth KA, Kitamura K, Miller RT, Lu CY. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. *J Exp Med.* 1996 Mar 1;183(3):1241-6. PMID : 8642266.

Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Osaki A, Toge T. The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer. *Oncol Rep.* 2002 Jan-Feb;9(1):3-9. PMID : 11748447.

Kisker O, Becker CM, Prox D, Fannon M, D'Amato R, Flynn E, Fogler WE, Sim BK, Allred EN, Pirie-Shepherd SR, Folkman J. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res.* 2001 Oct 15;61(20):7669-74. PMID: 11606410.

Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* 1997 Jan 1;57(1):81-6. PMID : 8988045.

Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(8):R15-24. PMID: 10772661.

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992 Aug 27;358(6389):771-4. PMID : 1324435.

Kohlmeier L, Kohlmeier M. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure

assessment. *Environ Health Perspect.* 1995 Apr;103 Suppl 3:99-106. PMID : 7635122.

Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):519-27. PMID : 15229477.

Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, Morimoto S. Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene.* 1997 Dec 4;15(23):2841-8. PMID : 9419975.

Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Jun;13(3):273-83. PMID : 12045397.

Kronblad A, Jirström K, Rydén L, Nordenskjöld B, Landberg G. Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *Int J Cancer.* 2006 May 15;118(10):2609-16. PMID : 16381002.

Kushlan DM, Faulkner DJ. A novel per lactone from the Caribbean sponge *Plakortis angulospiculatus*. *J Nat Prod.* 1991 Sep-Oct;54(5):1451-4. PMID : 1800643.

Lands WE, Libelt B, Morris A, Kramer NC, Prewitt TE, Bowen P, Schmeisser D, Davidson MH, Burns JH. Maintenance of lower proportions of (n - 6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n - 3) fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Dec 10;1180(2):147-62. PMID : 1463766.

Larsson JC, Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2004 Jun;79(6):935-45. PMID : 15159222.

Lee SK, Choi HS, Song MR, Lee MO, Lee JW. Estrogen receptor, a common interaction partner for a subset of nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 1998 Aug;12(8):1184-92. PMID : 9717844.

Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci.* 1992 Oct;17(10):427-33. PMID: 1333659.

Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell.* 1992 Jan 24;68(2):377-95. PMID : 1310259.

Leonardi F, Attorri L, Benedetto RD, Biase AD, Sanchez M, Tregno FP, Nardini M, Salvati S. Docosahexaenoic acid supplementation induces dose and time dependent oxidative changes in C6 glioma cells. *Free Radic Res.* 2007 Jul;41(7):748-56. PMID : 17577735.

Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001 Jul;2(7):612-9. PMID : 11429545.

Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech.* 2003 Jan 1;60(1):107-14. PMID: 12500267.

Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol Med* 1993 Feb;14(2):201-7. PMID : 8425722.

Liu QY, Tan BK. Effects of cis-unsaturated fatty acids on doxorubicin sensitivity in P388/DOX resistant and P388 parental cell lines. *Life Sci.* 2000 ;67(10):1207-18. PMID : 10954054.

Liu W, Davis DW, Ramirez K, McConkey DJ, Ellis LM. Endothelial cell apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2001 Apr 1;92(1):26-30. PMID: 11279602.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. PMID : 11846609.

Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, Hernández G, Rodríguez A, López-Rivas A, Redondo JM. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):10883-92. PMID : 11779855.

Lund EK, Harvey LJ, Ladha S, Clark DC, Johnson IT. Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers. *Ann Nutr Metab.* 1999 ;43(5):290-300. PMID: 10749029.

Maillard V, Hoinard C, Steghens JP, Jourdan ML, Pinault M, Bougnoux P, Chajès V. Interaction of dietary beta-carotene and alpha-linolenic acid: effect on promotion of experimental mammary tumours. *IARC Sci Publ.* 2002 ;156:403-4. PMID: 12484221.

Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1995 Nov;376(11):651-60. PMID : 8962674.

Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann Rheum Dis.* 1986 Oct;45(10):847-51. PMID : 3789819.

Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta.* 1982 Nov 24;126(1):41-51. PMID : 7172448.

Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982 Dec;79(24):7634-8. PMID : 6961438.

Marshall LA, Johnston PV. Modulation of tissue prostaglandin synthesizing capacity by increased ratios of dietary alpha-linolenic acid to linoleic acid. *Lipids.* 1982 Dec;17(12):905-13. PMID : 6298554.

McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):713-25.. PMID: 12778170.

McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL Jr. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:261-95. PMID : 16011468.

McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochem Biophys Acta.* 2008 Apr;1785(2):96-132. PMID : 18068131.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000 Sep 9;321(7261):624-8. PMID: 10977847.

Menéndez JA, del Mar Barbacid M, Montero S, Sevilla E, Escrich E, Solanas M,

Cortés-Funes H, Colomer R. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. 2001 Feb;37(3):402-13. PMID : 11239764.

Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. Eur J Cancer Prev. 2005 Jun;14(3):263-70. PMID : 15901996.

Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Ropero S, Colomer R, Lupu R. HER2 (erbB-2)-targeted effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3), in breast cancer cells: the "fat features" of the "Mediterranean diet" as an "anti-HER2 cocktail". Clin Transl Oncol. 2006 Nov;8(11):812-20. PMID : 17134970.

Meyer SA, Ewan RC, Beitz DC. Effect of selenium on the subcellular distribution of glutathione peroxidase in rat liver, epididymal fat pad and seminal vesicle. J Nutr. 1983 Feb;113(2):394-400. PMID : 6822910.

Moore NG, Wang-Johanning F, Chang PL, Johanning GL. Omega-3 fatty acids decrease protein kinase expression in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2001 Jun;67(3):279-83. PMID : 11561774.

Muindi J, Sinha BK, Gianni L, Myers C. Thiol-dependent DNA damage produced by anthracycline-iron complexes. The structure-activity relationships and molecular mechanisms. Mol Pharmacol. 1985 Mar;27(3):356-65. PMID: 2983184.

Muir CS. Epidemiology of cancer in ethnic groups. Br J Cancer Suppl. 1996 Sep;29:S12-6. PMID: 8782793.

Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. Circulation. 1998 Jan 6-13;97(1):99-107. PMID : 9443437.

Murray R. (2002b). Transport et stockage des lipides. Université DB, editor. Biochimie de HARPER. 25ème Edition ed. Laval: Les presses de l'Université de Laval. ISBN : 2804141187.

Nabholtz JM, Reese DM, Lindsay MA, Riva A. Combination chemotherapy for metastatic breast cancer. Exp Rev Anticancer Ther. 2002 Apr;2(2):169-80. PMID : 12113239.

Nakagawa H, Yamamoto D, Kiyozuka Y, Tsuta K, Uemura Y, Hioki K, Tsutsui Y, Tsubura A. Effects of genistein and synergistic action in combination with eicosapentaenoic acid on the growth of breast cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol. 2000 Aug;126(8):448-54. PMID : 10961387.

Namer M. Springer Edition. 2003. Cancer du sein - compte-rendu du cours supérieur francophone de cancérologie. ISBN 2-287-00664-8.

Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J, Almog N. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. J Natl Cancer Inst. 2006 Mar 1;98(5):316-25. PMID: 16507828.

Negre-Salvayre A. Oléagineux, Corps Gras, Lipides (ISSN : 1258-8210). Volume 12, Numéro 5, 433-8, Septembre-Décembre 2005.

Nesmelova IV, Sham Y, Dudek AZ, van Eijk LI, Wu G, Slungaard A, Mortari F, Griffioen AW, Mayo KH. Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine

heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *J Biol Chem.* 2005 Feb 11;280(6):4948-58. PMID: 15531763.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006 Jan 17;366(1):2-16. PMID : 16377102.

O'Brien PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* 1991 ;80(1):1-41. PMID : 1913977.

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J.* 2008 Feb 1;409(3):635-49. PMID: 18177271.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997 Jan 24;88(2):277-85. PMID: 9008168

Oberley LW, Oberley TD. The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis. *J Theor. Biol.* 1984 Feb 7;106(3):403-22. PMID : 6717035.

Ogilvie GK, Fettman MJ, Mallinckrodt CH, Walton JA, Hansen RA, Davenport DJ, Gross KL, Richardson KL, Rogers Q, Hand MS. Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study. *Cancer.* 2000 Apr 15;88(8):1916-28. PMID : 10760770.

Olsson H. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Nov 30;74(5):345-50. PMID: 11162943.

Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K. Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res.* 2002 Nov 15;91(10):923-30. PMID: 12433837.

Osumi T, Hashimoto T. Acyl-CoA oxidase of rat liver: a new enzyme for fatty acid oxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978 Jul 28;83(2):479-85. PMID : 697834.

Palozza P, Calviello G, Bartoli GM. Prooxidant activity of beta-carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes. *Free Radic Biol Med.* 1995 Dec;19(6):887-92. PMID : 8582664.

Pardini RS. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem Biol Interact.* 2006 Aug 25;162(2):89-105. PMID : 16846596.

- Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res.* 2002 Jul 26;91(2):143-50. PMID : 12142347.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108. PMID : 15761078.
- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001 Sep;2(9):533-43. PMID : 11905707
- Parks D, Bolinger R, Mann K. Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res.* 1997 Mar 15;25(6):1289-95. PMID : 9092641.
- Petersen ES, Kelley EE, Modest EJ, Burns CP. Membrane lipid modification and sensitivity of leukemic cells to the thioether lipid analogue BM 41.440. *Cancer Res.* 1992 Nov 15;52(22):6263-9. PMID : 1423272.
- Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Jul;51(1):55-67. PMID: 15207254.
- Plumb JA, Luo W, Kerr DJ. Effect of polyunsaturated fatty acids on the drug sensitivity of human tumour cell lines resistant to either cisplatin or doxorubicin. *Br J Cancer.* 1993 Apr;67(4):728-33. PMID : 8385976.
- Pouysségur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem.* 2006 Oct-Nov;387(10-11):1337-46. PMID : 17081104.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677-84. PMID: 12778166.
- Radominska-Pandya A, Chen G. Photoaffinity labeling of human retinoid X receptor beta (RXRbeta) with 9-cis-retinoic acid: identification of phytanic acid, docosahexaenoic acid, and lithocholic acid as ligands for RXRbeta. *Biochemistry.* 2002 Apr 16;41(15):4883-90. PMID: 11939783.
- Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E, Montemurro S, Valerio P, Ribatti D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Curr Med Chem.* 2006 ;13(16):1845-57. PMID: 16842197.
- Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell.* 1989 Feb 10;56(3):345-55. PMID: 2464438.
- Remontet L, Estève J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, Colonna M, Halna JM, Hedelin G, Macé-Lesec'h J, Peng J, Buemi A, Velten M, Jouglu E, Arveux P, Le Bodic L, Michel E, Sauvage M, Schwartz C, Faivre J. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2003 Feb;51(1 Pt 1):3-30. PMID : 12684578.
- Renaud R, Gairard B. Screening for breast cancer. Is mass screening possible in France? *Rev Prat.* 1992 Feb 15;42(4):467-8. PMID : 1604167.
- Reszka K, Hartley JA, Kolodziejczyk P, Lown JW. Interaction of the peroxidase-derived metabolite of mitoxantrone with nucleic acids. Evidence for covalent binding of <sup>14</sup>C-labeled drug. *Biochem pharmacol.* 1998 Dec 1;38(23):4253-60. PMID : 2597197.
- Ringbom T, Huss U, Stenholm A, Flock S, Skattebøl L, Perera P, Bohlin L. Cox-2

inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *J Nat Prod.* 2001 Jun;64(6):745-9. PMID : 11421736.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997. PMID: 9109485.

Rose DP, Connolly JM. Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *Int J Oncol.* 1999 Nov;15(5):1011-5. PMID: 10536186.

Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.* 1999 Sep;83(3):217-44. PMID : 10576293.

Rose DP, Connolly JM. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer* ;37(2):119-27. 2000. PMID: 11142082.

Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol.* 2003 Jul;196(1):19-41. PMID: 12767038.

Sandau KB, Fandrey J, Brüne B. Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide. *Blood.* 2001 Feb 15;97(4):1009-15. PMID : 11159530.

Sasaki S, Horacsek M, Kesteloot H. An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality. *Prev Med.* 1993 Mar;22(2):187-202. PMID : 8483858.

Schley PD, Brindley DN, Field CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr.* 2007 Mar;137(3):548-53. PMID : 17311938.

Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Jul;92(2):187-95. PMID : 15986129.

Schønberg SA, Rudra PK, Nøding R, Skorpen F, Bjerve KS, Krokan HE. Evidence that changes in Se-glutathione peroxidase levels affect the sensitivity of human tumour cell lines to n-3 fatty acids. *Carcinogenesis.* 1997. PMID : 9363997.

Schwab JM, Serhan CN. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Aug;6(4):414-20. PMID: 16750421.

Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Montestruque S. The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys.* 1983 Jun;223(2):441-52. PMID: 6859870.

Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther.* 1990;47(1):61-71. PMID : 2195557.

Shao Y, Pardini L, Pardini RS. Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids.* 1995 Nov;30(11):1035-45. PMID : 8569432.

Shao Y, Pardini L, Pardini RS. Enhancement of the antineoplastic effect of mitomycin C by dietary fat. *Cancer Res.* 1994 Dec 15;54(24):6452-7. PMID : 7987842.

Shao Y, Pardini L, Pardini RS. Intervention of transplantable human mammary carcinoma MX-1 chemotherapy with dietary menhaden oil in athymic mice: increased therapeutic effects and decreased toxicity of cyclophosphamide. *Nutr Cancer.* 1997;28(1):63-73. PMID : 9200152.

Siegfried JA, Kennedy KA, Sartorelli AC, Tritton TR. The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin. Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem*. 1983 Jan 10;258(1):339-43. PMID : 6848505.

Simonsen N, van't Veer P, Strain JJ, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Navajas JF, Martin BC, Thamm M, Kardinaal AF, Kok FJ, Kohlmeier L. Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. *Am J Epidemiol*. 1998 Feb 15;147(4):342-52. PMID : 9508101.

Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 1997 Aug 15;57(16):3465-70. PMID : 9270014.

Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fish oil inhibits the expression of farnesyl protein transferase and colon tumor development in rodents. *Carcinogenesis*. 1998 Jun;19(6):985-9. PMID : 9667735

Smith IE. Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies. *Cancer Treat Rev*. 1983 Jun;10(2):103-15. PMID: 6347376.

Sneddon AA, Wu HC, Farquharson A, Grant I, Arthur JR, Rotondo D, Choe SN, Wahle KW. Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis*. 2003 Nov;171(1):57-65. PMID : 14642406.

Song MR, Lee SK, Seo YW, Choi HS, Lee JW, Lee MO. Differential modulation of transcriptional activity of oestrogen receptors by direct protein-protein interactions with retinoid receptors. *Biochem J*. 1998 Dec 15;336 ( Pt 3):711-7. PMID : 9841885.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51(5):1409-16. PMID: 4357757.

Su KP, Huang SY, Chiu CC, Shen WW. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003 Aug;13(4):267-71. PMID: 12888186.

Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK, Shen J, Sledge GW Jr. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3369-72. PMID : 11309294.

Szymczak M, Murray M, Petrovic N. Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3514-21. PMID : 18216296.

Szymczak M, Murray M, Petrovic N. Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3514-21. PMID : 18216296.

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):41254-8. PMID : 12185074.

Tanaka T, Dancheck BL, Trifiletti LC, Birnkrant RE, Taylor BJ, Garfield SH,

Thorgeirsson U, De Luca LM. Altered localization of retinoid X receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(9):3972-82. PMID : 15082790.

Tang DG, Chen YQ, Honn KV. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 28;93(11):5241-6. PMID: 8643560.

Tanghetti E, Ria R, Dell'Era P, Urbinati C, Rusnati M, Ennas MG, Presta M. Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF2): recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts. *Oncogene.* 2002 May 30;21(24):3889-97. PMID: 12032827.

Teicher BA, Holden SA, Ara G, Sotomayor EA, Huang ZD, Chen YN, Brem H. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer.* 1994 Jun 15;57(6):920-5. PMID: 7515861.

Tevar R, Jho DH, Babcock T, Helton WS, Espat NJ. Omega-3 fatty acid supplementation reduces tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in a model of progressive non-metastasizing malignancy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2002 Sep-Oct;26(5):285-9. PMID : 12216707.

Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem.* 1990 Jan 5;265(1):454-61. PMID : 2294113.

Timmer-Bosscha H, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH, Muskiet FA, Martini IA, Uges DR, de Vries EG. Influence of docosahexaenoic acid on cisplatin resistance in a human small cell lung carcinoma cell line. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Jul 19;81(14):1069-75. PMID : 2544740.

Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3731-6. PMID : 15172975.

Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, Berra E. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer.* 2007. PMID : 17245699.

Triton TR, Yee G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science.* 1982 Jul 16;217(4556):248-50. PMID : 7089561.

Tsuji M, Murota SI, Morita I. Docosapentaenoic acid (22:5, n-3) suppressed tube-forming activity in endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 May;68(5):337-42. PMID : 12711251.

Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995 Nov 3;83(3):493-501. PMID: 8521479.

Tsunomori M, Fujimoto Y, Muta E, Nishida H, Sakuma S, Fujita T. 15-Hydroperoxyeicosapentaenoic acid inhibits arachidonic acid metabolism in rabbit platelets more potently than eicosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1996 May 20;1300(3):171-6. PMID : 8679681.

Ueno NT, Yu D, Hung MC. Chemosensitization of HER-2/neu-overexpressing human breast cancer cells to paclitaxel (Taxol) by adenovirus type 5 E1A. *Oncogene.* 1997 Aug 18;15(8):953-60. PMID : 9285690.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 1995 ;252:38-53. PMID : 7476373.

Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Mar 29;839(1):62-70. PMID : 3978121.

Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet.* 1999 Jul 10;354(9173):141-8. PMID : 10408502.

Van Bladeren PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact.* 2000 Dec 1;129(1-2):61-76. PMID : 11154735.

Vassilatis DK, Despommier D, Misek DE, Polvere RI, Gold AM, Van der Ploeg LH. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Biol Chem.* 1992 Sep 15;267(26):18459-65. PMID : 1382055.

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res.* 1991 Jun 15;51(12):3316-22. PMID : 2040005.

Venkatraman JT, Angkeow P, Satsangi N, Fernandes G. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. *J Am Coll Nutr.* 1998 Dec;17(6):586-94. PMID : 9853538.

Vile GF, Winterbourn CC. Microsomal lipid peroxidation induced by adriamycin, epirubicin, daunorubicin and mitoxantrone: a comparative study. *Cancer Chemoth Pharmacol.* 1989;24(2):105-8. PMID : 2543512.

Volpert OV, Lawler J, Bouck NP. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6343-8. PMID: 9600967.

Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci.* 2002 Sep;27(9):467. PMID: 12217522.

Wang Z, Butt K, Wang L, Liu H. The effect of seal oil on paclitaxel induced cytotoxicity and apoptosis in breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Nutr Cancer.* 2007;58(2):230-8. PMID : 17640170.

Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Nov 9;1036(2):88-94. PMID : 2223835.

World Health Organisation. CI (2003). KP Stewart B, editors. (ed.), world cancer report. Lyon: IARC press, pp. 11-9

Wu Y, Zhang X, Bardag-Gorce F, Robel RC, Aguilo J, Chen L, Zeng Y, Hwang K, French SW, Lu SC, Wan YJ. Retinoid X receptor alpha regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. *Mol Pharmacol.* 2004 Mar;65(3):550-7. PMID : 14978233.

Wynder EL, Rose DP, Cohen LA. Diet and breast cancer in causation and therapy. *Cancer.* 1986 Oct 15;58(8 Suppl):1804-13. PMID : 3756804.

Yang CS, Brady JF, Hong JY. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. *FASEB J.* 1992 Jan 6;6(2):737-44. PMID : 1537464.

Yang SP, Morita I, Murota SI. Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cell. *J Cell Physiol.* 1998

Aug;176(2):342-9. PMID : 9648921.

Yu D, Liu B, Jing T, Sun D, Price JE, Singletary SE, Ibrahim N, Hortobagyi GN, Hung MC. Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene*. 1998 Apr 23;16(16):2087-94. PMID : 9572489.

Zcharia E, Zilka R, Yaar A, Yacoby-Zeevi O, Zetser A, Metzger S, Sarid R, Naggi A, Casu B, Ilan N, Vlodaysky I, Abramovitch R. Heparanase accelerates wound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models. *FASEB J*. 2005 Feb;19(2):211-21. PMID: 15677344.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002 Aug 1;33(3):337-49. PMID: 12126755.

Zijlstra JG, de Vries EG, Muskiet FA, Martini IA, Timmer-Bosscha H, Mulder NH. Influence of docosahexaenoic acid in vitro on intracellular adriamycin concentration in lymphocytes and human adriamycin-sensitive and -resistant small-cell lung cancer cell lines, and on cytotoxicity in the tumor cell lines. *Int J Cancer*. 1987 Dec 15;40(6):850-6. PMID : 2826341.



**Sophie VIBET**

**Augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux par les acides gras polyinsaturés n-3 : rôle du statut oxydant et de la vascularisation tumorale.**



## Résumé

Cette thèse a eu pour but d'étudier l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux par les acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n-3). Nous avons montré que cet effet est lié à une augmentation du captage cellulaire et à une modification de la distribution et de la métabolisation intracellulaire de la mitoxantrone. La modification de la métabolisation intracellulaire de l'agent anticancéreux par les AGPI n-3 impliquant la voie du stress oxydant, l'étude de cette voie a montré que l'effet sensibilisant des AGPI n-3 aux anthracyclines était associé à une augmentation de la peroxydation lipidique, conséquence de la diminution de la glutathion peroxydase, enzyme antioxydante importante. Les AGPI n-3 peuvent également augmenter la sensibilité de tumeurs mammaires de rats aux taxanes. La modification de la répartition des compartiments vasculaires (micro-, et macro-vascularisation) par les AGPI n-3 semble être impliquée dans cet effet. Les AGPI n-3 augmentent donc l'efficacité des agents anticancéreux et cet effet implique la voie du stress oxydant et la vascularisation tumorale.

## Abstract

The aim of this thesis was to investigate the mechanisms of mammary tumor sensitization to anticancer drugs by omega 3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA). We showed that the increase in tumor cell sensitivity to mitoxantrone was associated with an enhancement in mitoxantrone uptake and a modification of the mitoxantrone distribution and metabolization within the cells. As we found that these last results involved oxidative stress, we examined the relation between chemosensitization by n-3 PUFA and tumor cells oxidative status. We found that n-3 PUFA decreased the activity of an anti-oxidant enzyme, the glutathione peroxidase, leading to an enhancement in lipid peroxidation. Finally, we showed in vivo that alterations of the vascular compartment organization (micro-, medium- and macro-vascularization) may occur for the effect of n-3 PUFA increasing taxanes efficacy. This thesis brought a major contribution to better understand the mechanisms involved in the chemosensitization by n-3 PUFA, such as tumor oxidative stress and tumor vascularization, and pave the way for new preclinical clinical studies dealing with the enhancement of anticancer therapy by n-3 PUFA.