

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

Unité INSERM U1069 Nutrition Croissance et Cancer

THÈSE présentée par :

Lucie CHAUVIN

soutenue le : 11 décembre 2015

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

Discipline / Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des tumeurs mammaires au docétaxel par les acides gras polyinsaturés n-3

THÈSE dirigée par :

Mme MAHEO Karine

Professeur des Universités, Université F. Rabelais Tours

Et co-encadrée par :

Mme GOUPILLE Caroline

Attaché de recherche, CHU Bretonneau, Université F.Rabelais Tours

RAPPORTEURS :

Mme BENEDETTI Hélène

Directeur de Recherche, Université d'Orléans

M. RIALLAND Mickaël

Maître de Conférence-HDR, Université de Bourgogne

JURY :

Mme BENEDETTI Hélène

Directeur de Recherche, Université d'Orléans

M. BOUGNOUX Philippe

Professeur des Universités, Université F. Rabelais Tours

Mme CARRE Manon

Maître de Conférence, Université Aix-Marseille

Mme GOUPILLE Caroline

Attaché de recherche, CHU Bretonneau, Université F.Rabelais Tours

Mme MAHEO Karine

Professeur des Universités, Université F. Rabelais Tours

M. RIALLAND Mickaël

Maître de Conférence-HDR, Université de Bourgogne

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Hélène B  n  detti et le Dr Mickaël Rialland pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, et pour leur lecture attentive du manuscrit. Je souhaite également remercier le Dr Manon Carré et le Pr Philippe Bougnoux qui me font l'honneur d'évaluer ce travail en tant qu'examinateurs.

Au Pr Karine Mahéo et au Dr Caroline Goupille, mes deux directrices de thèse, un grand merci. J'ai appris plein de choses à vos côtés. C'était chouette de travailler avec vous, et je suis émue au moment d'écrire ces lignes. Heureusement que je me suis promis de faire court et simple ;)

Je tiens également à remercier le Pr Stephan Chevalier, directeur du laboratoire N2C, tous les membres de l'équipe et la dream team de thésards pour le soutien et la bonne ambiance.

A Marie, merci pour tout (...). Plus de parenthèse qui tienne pour la prochaine étape, promis !

Papa, Maman, Fa !!! Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir.

Aux copains de toujours, Sophie, Aurore, Laurent & François, sans vous tout serait moins bien !

L'unique page de « libre expression » et je manque d'inspiration. Je ne réalise pas que je termine... Comme dirait Karo, il va falloir que je fasse le deuil de ma thèse. En tout cas, j'ai passé 4 années passionnantes et enrichissantes, tant sur le plan personnel que professionnel. Merci à toutes les personnes qui y ont contribué, c'est court mais le cœur y est.

Vivement la prochaine.

Résumé

La résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie constitue une cause majeure d'échec des traitements anticancéreux. Des études précliniques montrent que les acides gras polyinsaturés oméga-3 à longues chaînes (AGPIIn-3LC), apportés par l'alimentation, améliorent l'efficacité des chimiothérapies sans majorer les effets secondaires. Les AGPIIn-3LC s'incorporent dans les cellules cancéreuses et stromales. Cette thèse a eu pour but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires au docétaxel. Nous avons montré que le docétaxel induit un mécanisme de résistance via l'activation des voies de signalisation PKC/ERK et Akt impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires. La modification de l'environnement lipidique membranaire par la supplémentation en AGPIIn-3LC inhibe ces voies de signalisation et augmente l'efficacité du docétaxel dans des lignées tumorales mammaires et dans un modèle préclinique de tumeurs mammaires autochtones chez le rongeur. De plus, dans ce modèle de tumeurs mammaires, nous avons identifié une autre cible moléculaire régulée par les AGPIIn-3LC : l'épiréguline, membre de la famille EGF. Les AGPIIn-3LC bloquent l'induction de l'épiréguline par le VEGF dans les cellules endothéliales et induisent un remodelage de la vascularisation tumorale. Outre un effet direct des AGPIIn-3LC sur les cellules tumorales, les AGPIIn-3LC agissent sur le microenvironnement tumoral. Ces travaux de thèse apportent des arguments supplémentaires supportant l'utilisation des AGPIIn-3LC comme molécules adjuvantes pour lutter contre la résistance des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux.

Mots clés : acides gras polyinsaturés oméga 3 à longues chaînes, acide docosahéxanoïque, cancer du sein, chimiosensibilisation, docétaxel, voies de signalisation.

Abstract

Chemotherapy-resistant tumor cells are a major cause of cancer treatment failure. Preclinical studies show that polyunsaturated omega-3 long chain fatty acids (AGPIIn-3LC), provided by food, improve the efficacy of chemotherapy without increasing side effects. AGPIIn-3LCs are incorporated in cancer and stromal cells. This thesis aimed to identify molecular mechanisms involved in the increased sensitivity of mammary tumor cells to docetaxel. We have shown that docetaxel induces a resistance mechanism via activation of PKC/ERK and Akt pathways involved in cell proliferation and survival. Modification of the membrane lipid environment by AGPIIn-3LCs supplementation inhibits these signaling pathways and increases the efficacy of docetaxel in mammary tumor cell lines and in a preclinical rodent model of native mammary tumors. Moreover, in this mammary tumor model we have found another molecular target regulated by AGPIIn-3LCs: epiregulin, a member of the EGF family. AGPIIn-3LCs inhibit epiregulin-VEGF induced in endothelial cells and induce a remodeling of tumor vasculature. Furthermore, AGPIIn-3LCs act on the tumor microenvironment directly. This thesis work provides additional arguments for the use of AGPIIn-3LCs as adjuvant molecules to reduce the resistance of breast tumors to anticancer agents.

Key words: Polyunsaturated omega-3 long chain fatty acids, docosahexanoic acid, breast cancer, chemosensitization, docetaxel, signaling pathway.

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction	4
Partie I. Lipides et voies de signalisation.....	5
Chapitre 1. Lipides membranaires et seconds messagers lipidiques	6
1. Les lipides membranaires	6
A. Membrane plasmique	6
B. Diversité du répertoire lipidique	9
2. Seconds messagers lipidiques issus des glycérophospholipides	10
A. Signalisation associée à la production de PIPs.....	10
B. Signalisation associée à la production de DAG	12
C. Signalisation associée à la production de PA.....	15
D. Fin du signal d'activation : métabolisation du DAG et du PA.....	18
E. Interconnexions	21
Chapitre 2. Les PKCs, famille de kinases sensible aux lipides.....	24
1. Les isoformes de PKCs	24
2. Activation et régulation de l'activité des PKCs	25
A. Maturation des PKCs par des phosphorylations	26
B. Translocation membranaire des PKCs	28
C. Co-facteurs lipidiques et régulation spatio-temporelle des PKCs.....	29
D. Localisation subcellulaire par interaction protéine-protéine	31
E. Régulation négative des PKCs.	32
3. PKCs et cancer du sein.....	33
A. Fonctions spécifiques aux isoformes α , β , ϵ et δ	33
B. Les PKCs en clinique	35
C. Un rôle suppresseur de tumeur ?	36
Chapitre 3. Signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt.....	38
1. Vue d'ensemble de la voie MAPK/ERK1/2	39
A. Description de la cascade d'activation de la voie MAPK/ERK1/2.....	39
B. Inactivation du signal MAPK/ERK1/2	42
2. Vue d'ensemble de la signalisation PI3K/Akt	43
A. Description de la cascade d'activation de la voie PI3K/Akt.....	43

B.	Rétrocontrôles négatifs de la voie PI3K/Akt.....	45
3.	ERK1/2 et Akt dans la prolifération et la survie cellulaire	46
A.	Convergence des voies Akt et ERK1/2 dans les signaux de survie	46
B.	Progression dans le cycle cellulaire	47
4.	Régulation spatio-temporelle et spécificité du signal	49
A.	Durée et force du signal ERK1/2	49
B.	Localisation subcellulaire des composants de la voie ERK1/2.....	51
C.	Interconnexions entre voies de signalisation.....	55
5.	Signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK1/2 dans le cancer du sein.....	56
A.	Signalisation PI3K/Akt	56
B.	Signalisation Raf-MEK1/2-ERK1/2.	57
C.	Implications thérapeutiques.....	58
Partie II.	Taxanes et chimiorésistance.....	59
Chapitre 1.	Cancer du sein et docétaxel en clinique	59
1.	Généralités sur le cancer du sein et sa classification.....	59
2.	Les taxanes dans le traitement du cancer du sein.....	62
3.	Les limitations à l'utilisation des taxanes	63
4.	Taxanes de 3ème génération	63
Chapitre 2.	Mécanismes d'action des taxanes	66
1.	Les taxanes, des agents ciblant les microtubules	66
A.	Structure et dynamique des microtubules	66
B.	Les taxanes, des agents tubulo-affins	67
2.	Mécanismes d'action anti-tumorale des taxanes.....	69
A.	Perturbation du cycle cellulaire et conséquences cellulaires	69
B.	Mécanismes moléculaires de l'action cytotoxique.....	71
3.	Effets anti-angiogéniques du docétaxel.....	72
Chapitre 3.	Chimiorésistance aux taxanes	74
1.	Phénotype MDR et pompe à efflux.....	74
2.	Altération des microtubules	75
A.	Altération de la β -tubuline.....	76
B.	Expression des MAPs.....	76
3.	Perturbation des voies de signalisation	77
A.	La surexpression de HER2.....	77
B.	Signalisation PI3K/Akt	78

C. Signalisation MEK-ERK1/2.....	79
4. Identification d'une signature moléculaire prédictive de la chimiorésistance aux taxanes?	80
Partie III. AGPI et chimiosensibilisation.....	83
Chapitre 1. Effets des AGPIIn-3LC	86
1. Métabolisme enzymatique des AGPI.....	86
2. Etude des AGPIIn-3LC sur la croissance tumorale et l'apoptose	89
A. Mécanismes d'action.....	89
B. Perturbation de la signalisation intracellulaire et conséquences biologiques ..	90
3. Etude des AGPIIn-3LC sur la vascularisation tumorale	91
Chapitre 2. Chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC	93
1. Données expérimentales in vitro	94
2. Données précliniques	95
3. Intervention nutritionnelle chez l'homme	97
Chapitre 3. Mécanismes impliqués dans la chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC	99
1. Accumulation intracellulaire des agents anticancéreux	99
2. Modification du métabolisme des agents anticancéreux.....	100
3. Stress oxydant	100
4. Signalisation intracellulaire.....	101
5. Vascularisation tumorale.....	102
 Contexte et objectifs généraux	 105
 Matériels et méthodes	 109
Chapitre 1. Culture cellulaire	109
1. Lignées cancéreuses mammaires	109
2. Culture primaire d'HUVECs : modèle in vitro pour l'étude de l'angiogénèse.....	109
3. Purification du DHA pour l'utilisation en culture cellulaire.....	110
4. Transfection de siRNA.....	110
5. Test de chimiosensibilité au docétaxel.....	111
6. Activité enzymatique et incorporation de BrDu	112
Chapitre 2. Etude de la signalisation intracellulaire par Western blot.....	112
1. Conditions de culture cellulaire.....	112

2. Lyse cellulaire et extraction protéique	113
3. Western blot	114
Chapitre 3. Quantification de l'acide phosphatidique.....	115
1. Extraction des lipides totaux	116
2. Quantification des classes de phospholipides	116
Chapitre 4. Mesure de l'expression génique.....	118
1. Extraction des ARN totaux	118
2. Transcription inverse des ARN en ADN complémentaire.....	118
3. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR).....	118
A. Choix et validation des amorces de PCR	119
B. Méthode et analyse.....	119

Chimiosensibilisation des cellules tumorales mammaires au docétaxel par les AGPIn-3LC

Chapitre 1. Démarche scientifique.....	121
Chapitre 2. Résultats	123
Chapitre 3. Résultats complémentaires.....	133
1. Chimiosensibilisation au docétaxel <i>in vitro</i>	133
A. Effets biologiques de la chimiosensibilisation.....	134
2. Etude des voies de signalisation.....	137
A. Etude de la signalisation PKC/ERK1/2.....	138
B. Expression des phosphatases spécifiques de ERK1/2 (DUSPs/MKPs).....	141
C. Etude de la signalisation PI3K/Akt	144
3. Inhibiteurs pharmacologiques	146
A. Inhibiteurs pharmacologiques des PKCs.....	146
B. Inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 et d'Akt	147
Chapitre 4. Discussion et perspectives.....	150

L'épiréguline, membre de la famille EGF, une nouvelle cible moléculaire des AGPIn-3LC

Chapitre 1. Contexte et démarche scientifique	159
Chapitre 2. Résultats	163
1. Modèle <i>in vivo</i> de tumeurs mammaires.....	163

2. Modèle <i>in vitro</i> : régulation de l'expression de l'épiréguine et de l'amphiréguine dans les cellules endothéliales.....	168
3. Modèles <i>in vitro</i> : régulation de l'épiréguine et de l'amphiréguine dans les cellules cancéreuses mammaires	170
Chapitre 3. Discussion et perspectives.....	173
Perspectives générales et conclusion.....	179
Bibliographie.....	183
Travaux universitaires	218
Sites web consultés.....	218

Liste des publications et des communications

Publications intégrées à la thèse

Chauvin L., Goupille C., Blanc C., Pinault M., Domingo I., Guimaraes C., Bougnoux P., Chevalier S., Mahéo K. **Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating PKC ϵ - δ /ERK and Ak.** *Article soumis à Biochemica and Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids.*

Goupille C., Chauvin L., Vibet S., Kornfeld S., Domingo I., Chevalier S., Bougnoux P., Mahéo K. **Remodelage of vascular architecture in n-3 LCPUFA supplemented mammary tumors increase taxane efficacy : epieregulin, a new target of n-3 LCPUFA.** *En préparation.*

Communication orale

Chauvin L., Mahéo K., Blanc C., Bougnoux P., Chevalier S., Goupille C: Inhibition de la voie ERK par les acides gras polyinsaturés n-3: une nouvelle stratégie pour lutter contre la résistance aux taxanes? 2 et 3 Avril 2013. 7^e Journées du Cancéropôle Grand Ouest, Session jeunes chercheurs. Sables d'Olonne.

Communications affichées

Chauvin L., Mahéo K., Domingo I., Bougnoux P., Chevalier S., et Goupille C. L'épiréguline et l'amphiréguline : de nouvelles cibles pour diminuer la résistance des tumeurs mammaires à la chimiothérapie ? 2 Décembre 2011, Journée de la Recherche Tours-Poitiers.

Chauvin L., Mahéo K., Domingo I., Pinet A., Chevalier S., et Goupille C. Le DHA augmente l'efficacité du docétaxel dans les cellules tumorales mammaires en contrecarrant un mécanisme de chimiorésistance associé à la voie ERK. 11 et 12 Octobre 2012, Seillac, 25^e Colloque Biotechnocentre.

Chauvin L., Mahéo K., Domingo I., Chevalier S., et Gouille C. Inhibition de la voie PKC/ERK par les acides gras polyinsaturés n-3 : une nouvelle stratégie pour lutter contre la résistance aux taxanes ? 11 et 12 Octobre 2013, Seillac. 26^e Colloque Biotechnocentre.

Liste des tableaux

Tableau 1. Essais cliniques de phase II testant des inhibiteurs de PKCs.....	35
Tableau 2. Chimiosensibilisation des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC dans des modèles in vivo.....	96
Tableau 3. Principales caractéristiques des lignées cancéreuses mammaires utilisées.....	109
Tableau 4. Principaux anticorps primaires utilisés.....	115
Tableau 5. Séquences des amorces utilisées en qPCR.....	120

Liste des figures

Figure 1. Lipides impliqués dans l'organisation de la membrane plasmique	7
Figure 2. Représentation schématique du concept de radeaux lipidiques.....	8
Figure 3. Génération des espèces moléculaires de PIPs à partir du PI.....	11
Figure 4. Activité PLC sur le PI(4,5)P2 : production de DAG et d'IP3	13
Figure 5. Protéines activées en réponse à une production de DAG	14
Figure 6. Production de PA par action de la PLD sur la phosphatidylcholine.....	15
Figure 7. Cibles activées ou inhibées par l'acide phosphatidique en lien avec le statut de phosphorylations des protéines de signalisation.	17
Figure 8. Modèle de compartimentalisation des DGKs.	19
Figure 9. Fin du signal DAG et PA et interconversion des seconds messagers lipidiques.....	21
Figure 10. Interconnexions entre les signalisations DAG, PA et PIPs.	22
Figure 11. Vue générale de la famille des protéines kinases C.....	25
Figure 12. Modèle représentant la maturation, l'activation et l'inactivation des PKCs conventionnelles.....	27
Figure 13. Schématisation de la translocation membranaire des PKCs.....	29
Figure 14. La persistance de l'activité locale des PKCs suit la persistance du DAG.	30
Figure 15. Représentation schématique de la voie MAPK/ ERK1/2.....	41
Figure 16. Représentation schématique de la voie PI3K/Akt.	44
Figure 17. Transition G1/S et coopération entre ERK et Akt.	48
Figure 18. Conséquences biologiques de la durée et de l'intensité du signal ERK1/2.	50
Figure 19. Distribution intracellulaire de ERK1/2.....	53
Figure 20. Interconnexions entre les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/Akt	55
Figure 21. Schéma d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire et les différents types cellulaires.....	60
Figure 22. Définitions clinico-pathologiques de substitution.	61
Figure 23. Structures chimiques du paclitaxel, du docétaxel et de leurs dérivés.....	64
Figure 24. Dynamique des microtubules et taxane.	68
Figure 25. Conséquences cellulaires de la perturbation du cycle cellulaire par les agents tubulo-affins.	70
Figure 26. Structures et sources alimentaires des principaux AGPI n-3.....	84
Figure 27. Résumé de la synthèse des eicosanoïdes et des docosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, de l'EPA et du DHA.	87

Figure 28. Le DHA et l'EPA potentialisent l'efficacité des chimiothérapies sur des lignées cancéreuses mammaires.	94
Figure 29. Chronologie de l'expérimentation animale.....	106
Figure 30. Protocole de chimiosensibilisation.	111
Figure 31. Quantification des phospholipides.....	117
Figure 32. Chimiosensibilisation au docétaxel et régulation de ERK1/2 par le DHA sur un panel de lignées cancéreuses mammaires.	124
Figure 33. Cinétique d'activation de ERK1/2 par le docétaxel et distribution subcellulaire de P-ERK1/2	125
Figure 34. L'activation de ERK1/2 par le docétaxel est dépendante de la signalisation PA/DAG/PKC ϵ - δ	126
Figure 35. Effet du DHA sur la signalisation PA/DAG/ PKC ϵ - δ	128
Figure 36. Implication des PKC ϵ / δ dans la chimiosensibilisation du DHA au docétaxel....	129
Figure 37. L'induction de la phosphorylation d'Akt (ser473) par le docétaxel est bloquée par le DHA et l'enzastaurine	130
Figure 38. La régression tumorale sous docétaxel, potentialisée par le régime nutritionnel AGPIn-3, est associée au niveau d'activation de ERK1/2 régulé par les AGPIn-3.....	131
Figure 39. Comparaison de l'effet chimiosensibilisant de plusieurs acides gras à longues chaînes de carbone.	133
Figure 40. Effet chimiosensibilisant du DHA en présence d' α -tocophérol, molécule anti-oxydante.	134
Figure 41. Evaluation de l'apoptose, de l'incorporation de BrDU et de la viabilité cellulaire au cours du protocole de chimiosensibilisation.	136
Figure 42. Chimiosensibilisation des MDA-MB-231 au docétaxel en fonction du nombre de traitements DHA.	137
Figure 43. Effet du docétaxel et du DHA sur l'activation de ERK1/2 et des PKCs après un traitement aigu.....	138
Figure 44. Expression des ARNm des PKC ϵ / δ dans les tumeurs mammaires de l'étude expérimentale chez les rats.....	139
Figure 45. Expression membranaire des PKC ϵ et δ	140
Figure 46. Activité Ras et phosphorylation de MEK dans les tumeurs mammaires in vivo.	141
Figure 47. Expression des DUSPs/MKPs en réponse à un traitement aigu de docétaxel.....	142
Figure 48. Expression des ARM de DUSP1, DUSP4 et DUSP6 dans le modèle cellulaire MDA-MB-231 après un traitement chronique.....	143

Figure 49. Expression de DUSP1, DUSP4 et DUSP6 dans le modèle de tumeurs mammaires après 6 semaines de chimiothérapie.	143
Figure 50. Activation de la phosphorylation d'Akt ser473 par le docétaxel dans les cellules MDA-MB-231.....	144
Figure 51. Statut de phosphorylation d'Akt après un traitement chronique avec du docétaxel dans les cellules MDA-MB-231.....	145
Figure 52. Statut de phosphorylation d'Akt dans le modèle de tumeurs mammaires de l'expérimentation animale chez le rat.	145
Figure 53. Chimiosensibilisation des cellules tumorales MDA-MB231 et MDA-MB-468 par un inhibiteur de PKC, le GF-109203X.....	146
Figure 54. Effet du PD98059, inhibiteur de MEK, sur l'activation de ERK1/2 et d'Akt dans les cellules MDA-MB-231.	147
Figure 55. Effet de l'inhibiteur d'Akt MK2206 sur la phosphorylation de ERK1/2 et d'Akt.	148
Figure 56. Effet de l'inhibiteur VIII d'Akt sur la sensibilisation des cellules MDA-MB-231 au docétaxel.....	148
Figure 57. Effet de la combinaison PD98059 et inhibiteur VIII d'Akt sur la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au docétaxel.	149
Figure 58. Effet du docétaxel sur la signalisation PA/DAG/PKC/ERK1/2.	151
Figure 59. Effet du DHA sur la signalisation PA/DAG/PKC/ERK1/2.....	152
Figure 60. Modèle de normalisation vasculaire par une thérapie antiangiogénique anti-VEGFR2.....	159
Figure 61. Ligands et récepteurs de la famille EGF.....	161
Figure 62. Le régime alimentaire enrichi en AGPIn-3LC induit un remodelage de la vascularisation tumorale en faveur de la micro-circulation.	164
Figure 63. La micro-circulation est prépondérante dans les tumeurs AGPIn-3LC au cours de la chimiothérapie.	165
Figure 64. Corrélation entre la micro-circulation avant la chimiothérapie et la taille tumorale après 6 semaines de chimiothérapie.	166
Figure 65. Régulation de l'expression de l'épiréguline dans les tumeurs mammaires de rats	167
Figure 66. Régulation de l'expression de l'amphiréguline dans les tumeurs mammaires de rat	168

Figure 67. Expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les cellules endothéliales HUVECs.....	169
Figure 68. Le DHA et la neutralisation de l'épiréguline bloque la prolifération cellulaire des HUVECs induite par le VEGF.	169
Figure 69. Expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans la lignée cellulaire MDA-MB-231.	170
Figure 70. Test de chimiosensibilisation des cellules tumorales MDA-MB231 au docétaxel en présence d'anticorps dirigés contre l'épiréguline, l'amphiréguline et l'EGFR.	171
Figure 71. Modèle d'action de l'épiréguline sur les cellules endothéliales.	175

Liste des encadrés

Encadré 1. Points clés du chapitre « lipide membranaire et seconds messagers lipidiques »..	23
Encadré 2. Points clés du chapitre « PKC, famille de kinases sensible aux lipides ».....	37
Encadré 3. Points clés du chapitre « Signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt ».....	58
Encadré 4. Points clés du chapitre « Cancer du sein et docétaxel en clinique ».....	65
Encadré 5. Points clés du chapitre « Mécanismes d'action des taxanes »	73
Encadré 6. Points clés du chapitre « Chimiorésistance aux taxanes ».....	82
Encadré 7. Angiogénèse tumorale.....	91
Encadré 8. Points clés du chapitre « Effets des AGPIIn-3LC ».....	92
Encadré 9. Points clés du chapitre « Chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC »	98
Encadré 10. Points clés du chapitre « Mécanismes impliqués dans la chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC »	103

Liste des abréviations

AA, Acide arachidonique

ADN, Acide désoxyribonucléique

ARN(m), Acide ribonucléique (messenger)

cAMP, Cyclic adenosine monophosphate

AG, Acide gras

AGPI, Acide gras polyinsaturé

AGPIIn-3LC : Acide gras polyinsaturé à longue chaîne

AKAP, A-kinase anchor protein

AP-1, Activator protein 1

AREG, Amphiréguline

ARF, Adenosine diphosphate ribosylation factor

Bad, Bcl-2 associated death promoter

Bcl-2, B cell lymphoma 2

Bcl-xL, B cell lymphoma-extra large

CKI, Inhibiteur de Cdk

Cdk, Cyclin-dependent kinase

CK, cytokératine

COX, Cyclooxygénase

CREB, cAMP response element-binding protein

DAG, Diacylglycérol

DEF, Docking domain for ERK

DHA, Acide docosahéxanoïque

DGK, Diacylglycérol kinase

DUSP, Dual-specificity phosphatase

EGF, Epidermal growth factor

EGFR, Récepteur à l'EGF

EIF4E, Eukaryotic initiation factor 4

EPA, Acide eicosapentaénoïque

EREG, Epiréguline

ER, Récepteur aux oestrogènes

ERK, Extracellular-regulated kinase

FDA, Food and drug administration

FGF, Fibroblast growth factor

FOXO, Facteurs de transcription de la famille Forkhead

FRET, Transfert d'énergie par résonance Förster

FT, Facteur de transcription

GEF, Guanine exchange factor

GDP, Guanine diphosphate

GPCR, Récepteur couplé aux protéines G
GPI, Glycosylphosphatidylinositol
Grb2/10, Growth factor receptor-bound protein 2/10
GSK3, Glycogen synthase kinase 3
GTP, Guanine triphosphate
GAP, GTPase activating protein
Hsc70, Heat shock cognate protein 70
HER2, Human epidermal growth factor receptor 2
Hprt1, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HSP, Heat shock protein
HUVEC, Human umbilical vein endothelial cell
IEG, Immediate early gene
IQGAP, Ras GTPase-activating like protein
IKB, Inhibitor of kappa B
IP3, Inositol-3 phosphate
IRS1, Insulin receptor substrate
KO, Knockout
KSR, Kinase suppressor of Ras
LOX, Lipoxygénase
LPA, Lysophosphatidic acid
LPC, Lysophosphatidylcholine
LPP, Lipide phosphate phosphatase
JAK3, Janus kinase 3
JNK/SAPK, c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase
KD, Kinase domain
MAP, Microtubule associated protein
MAPK, Mitogen activated protein kinase
MAPKAKP, MAPK-activated protein kinase
Mcl-1, Myeloid cell leukemia
MDR, Multi-drug resistance
MEK, Mitogen-activated protein kinase kinase
MEKK1, MEK kinase 1
MKP, MAPK phosphatases
MMP, Métalloprotéinase matricielle
mTORC1/C2, Mammalian target of rapamycin complex1/2
MTT, bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NCT, Number clinical trial
NES, Nuclear export signal
NFκB, Nuclear factor-kappa B
NLS, Nuclear localization signal

NO, monoxide d'azote
P, phosphorylation
P70S6K, p70 S6 kinase
P90RSK, p90 ribosomal S6 kinase
PA, Acide phosphatidique
PAK, p21 activated kinase
PAP, Acide phosphatidique phosphatase
PB1, Phox and bem 1
PC, Phosphatidylcholine
PC-PLC, Phosphatidylcholine-phospholipase C
PDGF, Platelet-derived growth factor
PDK1, Phosphoinositide-dependent kinase-1
P-gp, Permeability glycoprotein
PE, Phosphatidylethanolamine
PHLPP, PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PI, Phosphatidylinositol
PI-PLC, Phosphatidylinositol phospholipase C
PI3K/PI5K, Phosphatidyl 3/5 kinase
PIP, Phosphoinositides phosphates
PH Plekstrin homology
PKA, Protéine kinase A
(c, n, a) PKC, Protéine kinase C (conventionnelle, nouvelle, atypique)
PKD, Protéine kinase D
PGE2, Prostaglandine E2
PL, Phospholipide
PLC, Phospholipase C
PLD, Phospholipase D
PP1, Protéine phosphatase 1
PP2A, Protéine phosphatase 2A
PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor
PR, Récepteur à la progestérone
PTEN, Phosphatase and tensin homolog
qPCR, Réaction en chaîne de polymérisation quantitative
RACK, Receptor for activated C-kinase
Raf, Rapidly accelerated fibrosarcoma
Rap1, Ras-related protein 1
RasGRP, Ras guanyl nucleotide-releasing protein
Rb, Retinoblastoma
RD, Regulatory domain
RE, Reticulum endoplasmique

ROS, Reactive oxygen species
Rp13A, Ribosomal protein L13A
RTK, Récepteur à activité tyrosine kinase
S, Sérine
SAC, Spindle assembly checkpoint
Ser, Sérine
SH2, Src homology 2 domain
siRNA: small interferent RNA
SOS, Son of sevenless
SM, Sphingomyéline
Src, Sarcoma kinase
SVF, Serum de veau foetal
T, Thréonine
TGF α , Transforming growth factor alpha
Thr, Thréonine
TLC, Thin layer chromatography
TNF α , Tumor necrosis factor alpha
TNM, Tumor, Node, Metastase
TSC1/TSC2, Tuberous sclerosis 1/2
TPL2, Tumor progression locus 2
Tyr, Tyrosine
VDAC1, Voltage-dependent anion channel 1
VEGF, Vascular endothelial growth factor
WB, Western blot
WT, Wild type

Avant-propos

Avec 1.7 million de nouveaux cas dans le monde en 2012, le cancer du sein représente 12% des diagnostics de cancer. Il s'agit de la 5ème cause de décès par cancer toute population confondue (Globocan, 2012). En France, 50 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Une femme sur huit sera concernée par un adénocarcinome du sein au cours de sa vie (Fondation pour la Recherche Médicale).

Pour lutter contre ce problème majeur de santé publique, la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie constituent les grands axes thérapeutiques. Au cours de ces dix dernières années, les études de profilage génétique ont prouvé la grande hétérogénéité de cette pathologie. Les thérapies ciblées visant des phénotypes tumoraux particuliers (tels que la surexpression du HER2) ne profitent qu'à une population spécifique et restreinte. De ce fait, la thérapeutique du cancer du sein inclut systématiquement une chimiothérapie. La mortalité associée au cancer du sein résulte principalement d'une résistance aux traitements et/ou de rechutes métastatiques. En effet, l'efficacité des chimiothérapies est non seulement limitée par la dose administrée, en raison des effets toxiques engendrés sur les tissus non tumoraux, mais aussi par l'existence ou l'apparition de résistance. Ainsi, améliorer l'efficacité des agents cytotoxiques, sans majorer leurs effets secondaires, constitue un objectif prioritaire dans le traitement du cancer du sein afin d'améliorer la survie et de préserver la qualité de vie des patientes.

Parmi les stratégies permettant d'augmenter l'efficacité des agents anticancéreux, l'utilisation de lipides d'origine marine, l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentanoïque (EPA), représente une approche originale. L'existence d'un lien entre l'efficacité de la chimiothérapie et l'apport alimentaire lipidique a été montrée pour la première fois par le Pr P.Bougnoux dans une étude regroupant 56 femmes atteintes de cancer du sein localement avancé, traitées par chimiothérapies néo-adjuvantes. L'analyse de la composition lipidique du tissu adipeux mammaire a permis de mettre en évidence que l'efficacité de la chimiothérapie était meilleure chez les patientes présentant un fort taux d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes de la série n-3 (AGPI n-3), et plus particulièrement de DHA dans leur tissu adipeux mammaire (Bougnoux *et al*, 1999).

Le tissu adipeux est un des éléments majoritaires du tissu mammaire et sa composition est directement liée aux apports alimentaires lipidiques. Le DHA et l'EPA sont des AGPI n-

3LC majoritairement apportés par l'alimentation (Plourde & Cunnane, 2007). Les phospholipides des cellules tumorales présentant un renouvellement très rapide, la composition en acides gras des phospholipides membranaires des tumeurs est influencée par le métabolisme tumoral mais aussi par la disponibilité des acides gras de l'hôte, notamment pour les AGPI (Spector, 1967; Chajes *et al*, 1995). Ces aspects se révélèrent particulièrement pertinents pour évaluer le potentiel d'une supplémentation alimentaire en AGPI n-3LC sur l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Depuis, le concept d'une supplémentation nutritionnelle pour améliorer la réponse tumorale aux chimiothérapies a été confirmé par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez le petit animal (Hajjaji & Bougnoux, 2012). Deux études cliniques de phase II menées sur des patientes atteintes de cancer du sein métastatique et chez des patients souffrant de cancer pulmonaire avancé (Bougnoux *et al*, 2009; Murphy *et al*, 2011) montrent un effet chimiosensibilisant des AGPI n-3LC sur les chimiothérapies, et ce sans majorer les effets secondaires.

Les acides gras, de par leur incorporation dans les phospholipides membranaires, ont des rôles structurants et fonctionnels. Après une supplémentation nutritionnelle, les AGPI n-3LC, au même titre que les autres acides gras, sont incorporés dans les phospholipides membranaires et leur distribution tissulaire est ubiquitaire (Arterburn *et al*, 2006). *In vitro*, la quantité de ces acides gras peut être augmentée dans les phospholipides des cellules tumorales, simplement par ajout de DHA ou d'EPA dans le milieu de culture (Burns & North, 1986; Mahéo *et al*, 2005; Gu *et al*, 2013). Chez le petit animal, un régime nutritionnel enrichi en huile à forte teneur en AGPI n-3LC mène à leur augmentation significative dans le tissu tumoral (Rose *et al*, 1996; Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012). La modification de la composition des phospholipides influence de nombreux processus intracellulaires comme l'expression génique et la transduction des signaux intracellulaires, dont les dérégulations sont associées à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements (Escribá *et al*, 2015; McCubrey *et al*, 2006).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'effet chimiosensibilisant des AGPI n-3LC les mieux documentés sont associés à la peroxydation lipidique (Germain *et al*, 1998; Vibet *et al*, 2008). Les AGPI n-3LC, du fait de leurs nombreuses insaturations, sont des cibles supplémentaires de l'action des thérapies anticancéreuses qui génèrent un stress oxydant (e.g. radiations ionisantes et les chimiothérapies à base d'anthracycline). Outre un effet direct sur les cellules tumorales, le DHA en s'incorporant dans les cellules du stroma peut également

agir sur le microenvironnement tumoral. Ainsi, une supplémentation nutritionnelle en AGPI n-3 influence le développement du réseau vasculaire tumoral (Colas *et al.*, 2006; Szymczak *et al.*, 2008; Kornfeld *et al.*, 2012). Cette modification vasculaire contribuerait aussi à l'efficacité de la chimiothérapie en augmentant le passage de l'agent thérapeutique du réseau vasculaire vers la tumeur (Kornfeld *et al.*, 2012).

Le docétaxel, appartenant à la famille des taxanes, est un agent de chimiothérapie couramment utilisé en clinique, seul ou en association, dans le traitement des cancers du sein localement avancés ou métastatiques. Alors qu'une certaine activité antiangiogénique lui est associée, les effets majeurs du docétaxel s'expriment par son effet cytotoxique (Hernández-Vargas *et al.*, 2007; Mahéo *et al.*, 2012). Au laboratoire, un effet sensibilisant des AGPI n-3 au docétaxel a été mis en évidence dans un modèle de tumeurs mammaires autochtones chez des rats (Thèse de Doctorat de Sophie Vibet, Université de Tours, 2008). Les mécanismes sensibilisants des AGPI n-3 avec cette thérapeutique restaient à définir.

Les taxanes perturbent de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Alors que certaines sont associées à son effet cytotoxique, d'autres semblent impliquées dans des mécanismes de chimiorésistance (McGrogan *et al.*, 2008). L'objectif de mes travaux de thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires au docétaxel par les AGPI n-3. L'axe principal de mes recherches s'est concentré sur l'effet du DHA sur la signalisation intracellulaire dans les cellules tumorales mammaires au cours d'un traitement par le docétaxel. En effet, en s'incorporant dans les lipides membranaires, les AGPI n-3 sont décrits pour influencer la signalisation intracellulaire et moduler des grandes fonctions cellulaires telles que la prolifération et l'apoptose (Chénais & Blanckaert, 2012).

Par ailleurs, l'effet sensibilisant des tumeurs au docétaxel par les AGPI n-3 dans le modèle animal développé au laboratoire a été associé à une modification de la vascularisation tumorale avant et pendant la chimiothérapie docétaxel (Vibet, 2008, Thèse de Doctorat ; Kornfeld *et al.*, 2012). Un deuxième axe de recherche a été d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le remodelage de l'architecture vasculaire induit par les AGPI n-3 et précédemment mis en évidence au cours d'un traitement par le docétaxel.

Introduction

Partie I. Lipides et voies de signalisation

Les fonctions cellulaires sont hautement contrôlées. La signalisation intracellulaire, système complexe composé de multiples voies de transduction interconnectées, permet aux cellules eucaryotes de produire et de coordonner une réponse adaptée à un stimulus et à leur microenvironnement.

Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation, dans l'adhésion et la migration, dans la survie et la mort, peuvent servir de support à des altérations oncogéniques. En effet, la dérégulation oncogénique des voies de signalisation permet l'acquisition et le maintien des caractéristiques tumorales (e.g. prolifération incontrôlée, évitement de la mort cellulaire programmée, migration) (Hanahan & Weinberg, 2000).

Les fonctions cellulaires sont contrôlées par des protéines de signalisation, localisées à proximité ou dans la membrane plasmique, qui sont hautement dépendantes de l'environnement lipidique. En effet, la membrane plasmique est plus qu'une simple bicouche lipidique qui possède un rôle structurant. Elle correspond à une plateforme composée de nanodomains dynamiques qui intègrent les signaux extérieurs par le biais de protéines membranaires. Les lipides membranaires eux-mêmes, ainsi que les seconds messagers lipidiques issus de leur modification ou de leur hydrolyse, régulent directement la localisation et l'activité spatio-temporelle de nombreuses protéines de signalisation. Dans ce contexte, les fonctions membranaires ne dépendent pas exclusivement des protéines qui y sont associées mais aussi de la composition des lipides et des interactions lipides-protéines. L'importance de la composition et de la dynamique membranaire dans la régulation de la signalisation cellulaire a été soulignée dans les années 1990, par l'étude de protéines associées à la membrane comme les protéines kinases C et les protéines G (Yeagle, 1989; Escriba *et al*, 1995). Aujourd'hui, des altérations dans le métabolisme et la composition lipidique commencent à être associées au processus oncogénique et à la survie des patients (Kim *et al*, 2015; Escribá *et al*, 2015). Ceci souligne l'intérêt des approches fondées sur des thérapies lipidiques en oncologie, et qui visent à modifier la composition lipidique, par exemple via une supplémentation nutritionnelle ou via le ciblage du métabolisme.

Cette première partie de l'introduction est composée de trois chapitres. Le premier chapitre sera consacré aux lipides membranaires et à leurs fonctions dans la signalisation intracellulaire. Le deuxième chapitre sera, lui, dédié à une famille de kinases sensibles aux signaux lipidiques, les protéines kinases C. Enfin, les deux grandes voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt, dont certains composants sont également sensibles aux lipides, seront abordées dans le dernier chapitre.

Chapitre 1. Lipides membranaires et seconds messagers lipidiques

1. Les lipides membranaires

A. Membrane plasmique

Les lipides de la membrane plasmique représentent environ 20% des lipides membranaires totaux (van Meer & de Kroon, 2011). Les membranes eucaryotes sont majoritairement composées de glycérophospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI) et acide phosphatidique (PA). Les groupements hydroxyles du glycérol sont classiquement estérifiés par un acide gras (AG) saturé en sn-1 et insaturé en sn-2. Un acide phosphorique en sn-3 relié ou non à un groupement supplémentaire confère au PL son identité (**figure 1A**). Les sphingolipides constituent une autre grande classe de PLs avec un squelette sphingosine relié à un acide gras en sn-2 (**figure 1B**). Les sphingolipides retrouvés majoritairement dans les membranes eucaryotes sont des sphingomyélines (SM) avec un groupement phosphocholine. La membrane plasmique contient également du cholestérol et des glycolipides (**figure 1C, 1D, 1F**). Les PLs anioniques (PS, PA, PIs) sont majoritairement situés dans le feuillet interne de la membrane plasmique (van Meer et al, 2008).

Nanodomains membranaires. Le terme de nanodomaine correspond à une compartimentalisation latérale au sein de la membrane plasmique, vue comme une « mer de molécules lipidiques désorganisées » (Karp, 2010; Day & Kenworthy, 2009). La formation dynamique de nanodomains lipidiques, ou « nanocluster » de lipides, est acceptée par la

communauté scientifique. Ils semblent jouer un rôle clé dans la signalisation en régulant des interactions protéiques (e.g. Ras) (Zhou *et al.*, 2014, 2015).

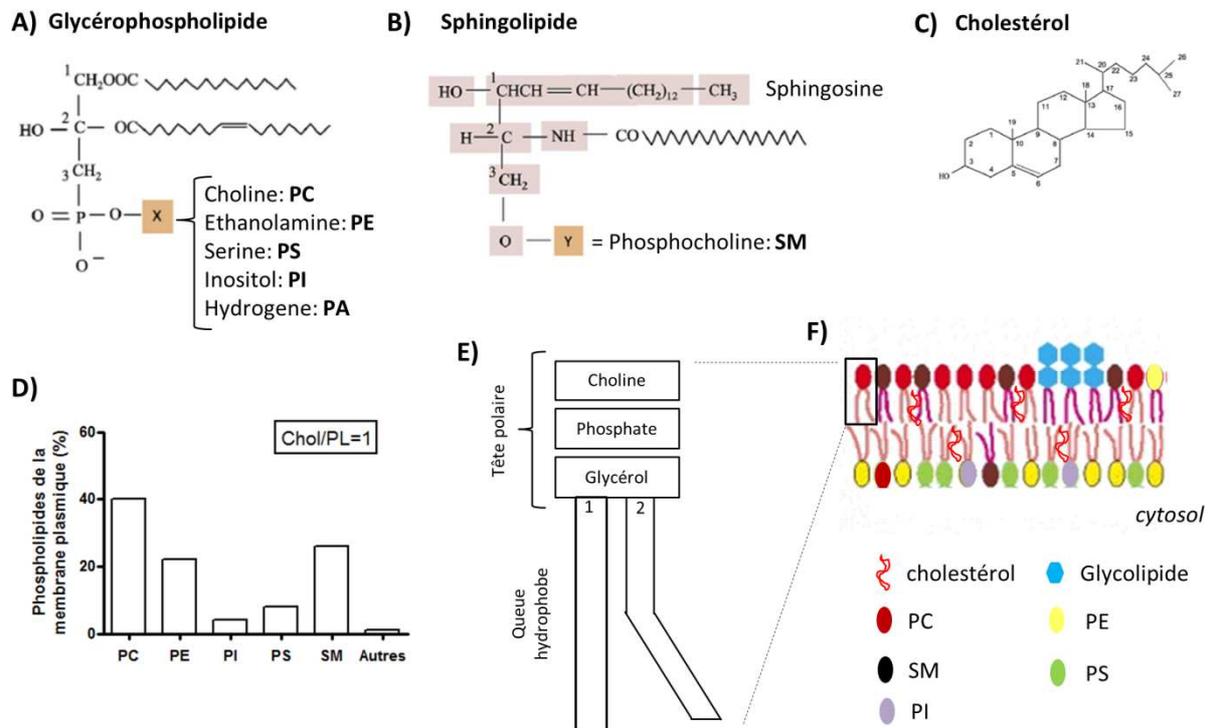


Figure 1. Lipides impliqués dans l'organisation de la membrane plasmique

A_ Structure des glycérophospholipides. En fonction de la nature du groupement X, on distingue la PC, la PE, la PS, le PI et le PA. **B_** Structure des sphingolipides. Le squelette sphingosine est représenté en rose. En fonction de la nature du groupement Y, on distingue les sphingomyélines et les glycosphingolipides. **C_** Structure du cholestérol. **D_** Composition de la membrane plasmique en PLs (% des PLs totaux). Le ratio molaire du cholestérol par rapport aux PLs totaux est encadré. **E_** Représentation schématisée de la PC. La queue hydrophobe correspond aux chaînes d'acides gras saturés et insaturés respectivement en sn-1 et en sn-2. **F_** Représentation schématisée de la membrane plasmique. Les quatre PLs structuraux majeurs sont la PC, la PE, la SM et la PS. Alors que PS, PE et PI sont principalement situés dans le feuillet interne, SM et PC sont majoritairement situés dans le feuillet externe. Les glycolipides sont situés dans le feuillet externe de la double couche lipidique. A, B, C, modifiés d'après Arish *et al.*, 2015 ; D, modifié d'après Van Meer *et al.* 2008 ; E, F modifiés d'après Alberts *et al.* 2002 PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidylethanolamine, PS : phosphatidylserine, PI : phosphatidylinositol, PA : acide phosphatidique, SM : sphingomyéline, Chol : cholestérol, PL : phospholipide.

Le concept d'un type particulier de nanodomaine, appelé « radeau lipidique », repose sur l'observation d'un regroupement entre cholestérol et sphingomyéline dans des membranes artificielles, créées à partir de lipides extraits de cellules de rein d'origine canine (Brown & Rose, 1992; Simons & Ikonen, 1997). En raison des propriétés physiques de ces composants (SM préférentiellement enrichie en acides gras à longues chaînes saturés et propriété rigidifiante du cholestérol), ces nanodomains semblent « flotter » dans un environnement

lipidique plus fluide, d'où le terme de radeau lipidique. Aujourd'hui, la communauté scientifique est divisée sur leur existence. Cette controverse repose principalement sur les techniques biochimiques utilisées pour isoler ces nanodomains : les extractions lipidiques réalisées dans des conditions détergentes, ou non, pourraient altérer la composition et les interactions entre lipides et protéines, rendant compliquée l'interprétation des résultats (Leslie, 2011; Karp, 2010).

Les radeaux lipidiques sont vus, par les biologistes, comme des centres d'organisation et des plateformes de signalisation qui facilitent la transduction des signaux extérieurs vers les voies de signalisation intracellulaires. De nombreuses protéines membranaires y sont associées : i) des protéines arborant un ancrage GPI (glycosylphosphatidylinositol) et des modifications post-traductionnelles (e.g. palmitoylation, myristoylation comme Ras et Src), ii) des protéines interagissant avec le cholestérol (e.g. caveoline-1), iii) des récepteurs transmembranaires (e. g. EGFR « Epidermal growth factor receptor », HER2 « Human epidermal growth factor receptor 2 ») (**figure 2**) (Alberts *et al.*, 2002; Babina *et al.*, 2011).

Les radeaux lipidiques sont caractérisés par la présence de la protéine flotilline (**figure 2A**). Une sous-population de radeaux lipidiques, appelée cavéole, est caractérisée par la présence de la protéine cavéoline. Les domaines cavéolaires présentent une courbure caractéristique liée à la forte concentration en cholestérol et à la cavéoline (**figure 2B**). Les radeaux lipidiques et les cavéoles auraient des rôles similaires dans la signalisation.

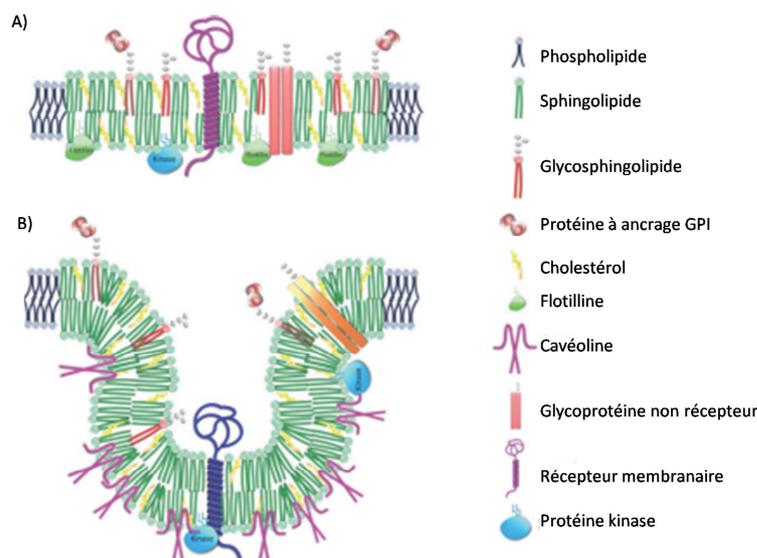


Figure 2. Représentation schématique du concept de radeaux lipidiques.

A_Radeau lipidique non cavéolaire caractérisé par la présence de flotilline. **B**_Cavéole. Les cavéolines se lient aux sphingolipides et au cholestérol et participent à la formation d'un sous-type de radeaux lipidiques caractérisé par une invagination membranaire. Modifié d'après (Babina *et al.* 2011). *NB* : Les radeaux lipidiques sont enrichis en sphingolipide et non composés exclusivement de sphingolipides comme représenté sur la figure. GPI :glycosyl-phosphatidylinositol.

Dans les cellules cancéreuses, la composition protéique et/ou lipidique de ces nanodomains est souvent altérée (Li *et al.*, 2006; Staubach & Hanisch, 2011). Les signalisations associées à ces plateformes sont souvent dérégulées, ce qui peut contribuer à la croissance tumorale et à d'autres caractéristiques tumorales agressives comme la migration et l'invasion cellulaires (Patra, 2008).

B. Diversité du répertoire lipidique

Alors qu'un type de PL suffit à former une bicouche lipidique stable, il existe plus de 1000 espèces moléculaires de PLs (Stahelin, 2009). La diversité du répertoire lipidique en termes de composition et de répartition est étroitement liée à la physiologie cellulaire.

La variation des PLs et de leur composition en acides gras provoque des changements physico-chimiques et peut modifier i) l'activité des protéines transmembranaires, ii) le recrutement et l'activité des protéines de signalisation cytosoliques, iii) la formation des nanodomains membranaires et, iv) la fluidité membranaire (qui augmente avec l'insaturation des chaînes d'acides gras et diminue avec la teneur en cholestérol) (Alberts *et al.*, 2002; Dowhan, 2002). La fluidité membranaire est une propriété essentielle de la membrane plasmique, qui permet la diffusion latérale des protéines et affecte l'activité des protéines transmembranaires et/ou associées à la membrane.

La répartition asymétrique des PLs est également importante pour les fonctions cellulaires. Par exemple, les PLs anioniques (PS, PA, PIs) majoritairement situées dans le feuillet interne de la membrane plasmique sont associées à des fonctions de signalisation intracellulaire. Les seconds messagers lipidiques produits de manière locale, classiquement le diacylglycérol (DAG) et le PI(3,4,5)P3 (phosphatidylinositol 3-,4-,5- phosphate), sont reconnus par des protéines de signalisation qui contiennent des domaines de liaison propres à ces lipides (respectivement, domaine PH « Pleckstrin homolgy » et domaine C1) (Lemmon, 2008). Cependant, une reconnaissance mono-spécifique est l'exception plutôt que la règle. Pour la majorité des effecteurs protéiques répondant à un signal lipidique, la translocation membranaire dépend à la fois d'un lipide spécifique mais aussi d'un environnement lipidique permissif (en terme de charge, de courbure et de fluidité) (Stace & Ktistakis, 2006).

Ainsi, l'organisation spatiale des lipides membranaires, la production locale de seconds messagers lipidiques et la composition en acides gras des PLs influencent fortement la signalisation intracellulaire.

2. Seconds messagers lipidiques issus des glycérophospholipides

Il existe une grande variété de seconds messagers lipidiques. Au vu des travaux de la présente thèse, cette deuxième partie se concentrera sur la signalisation associée aux phosphoinositides phosphates (PIPs) et sur la signalisation associée à la production de diacylglycérol (DAG) et d'acide phosphatidique (PA) via l'hydrolyse de glycérophospholipides.

Classiquement, un stimulus agoniste peut induire la production locale et rapide de seconds messagers lipidiques qui enclenche une réponse cellulaire. La métabolisation des seconds messagers met fin au signal. Les signaux lipidiques engendrent une réponse cellulaire en interagissant avec des protéines effectrices recrutées au niveau membranaire, ce qui régule leurs activités. Cette interaction est dépendante de la concentration du messager lipidique. Ainsi, le changement de concentration d'un lipide, induit par une enzyme en réponse à un signal agoniste, génère une signalisation et une activité cellulaires (Shin & Loewen, 2011). De plus, la composition du messager lipidique en acide gras peut moduler la réponse cellulaire.

Les signalisations lipidiques sont très complexes. En plus des interconnexions propres à la signalisation, les messagers lipidiques peuvent être interconvertibles (Eyster, 2007). Les différents points abordés seront intégrés dans un schéma global de régulation à la fin du paragraphe (p.23).

A. Signalisation associée à la production de PIPs

Les phosphoinositides phosphates participent à la dynamique et au trafic membranaires ainsi qu'à la transduction du signal. Les espèces de PIPs sont réparties différemment dans les endomembranes (membrane plasmique, golgienne et endosomale). Ainsi, les PIPs sont des signaux constitutifs qui participent à définir l'identité des différentes organelles. Les niveaux de PIPs sont hautement régulés et peuvent aussi transduire des signaux « aigus » de signalisation (Di Paolo & De Camilli, 2006).

En effet, l'action de plusieurs phosphoinositides kinases et de phosphatases lipidiques permet une production dynamique et une interconversion rapide des PIPs (Bunney & Katan, 2010). Les PIs membranaires peuvent être phosphorylés en position 3-, 4-, et/ou 5- du sucre inositol, ce qui peut générer jusqu'à sept espèces moléculaires de PIPs (**figure 3**).

Leur rôle de signalisation est dû à des interactions lipides-protéines. Toutes les espèces moléculaires de PIPs sont reconnues par des domaines protéiques (Lemmon, 2008), et, en réponse à leur production locale, des protéines de signalisation peuvent être recrutées et activées à des localisations spécifiques (Di Paolo & De Camilli, 2006).

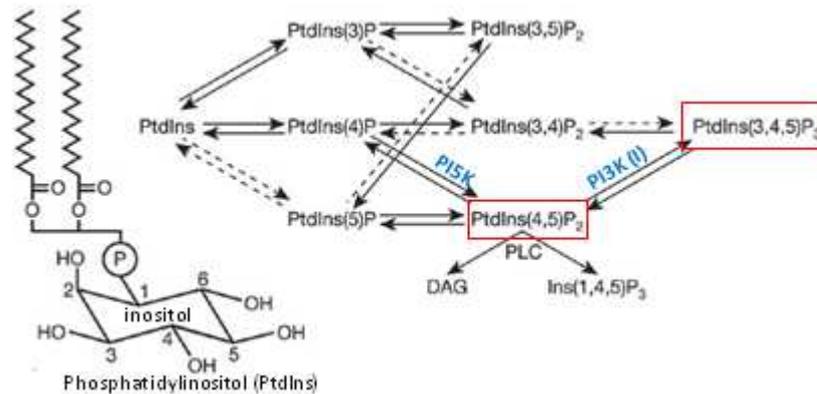


Figure 3. Génération des espèces moléculaires de PIPs à partir du PI

Les réactions indiquées par des pointillés ont été montrées *in vitro* mais leur importance *in vivo* n'est pas claire. Modifié d'après (Di Paolo & De Camilli, 2006). PtdIns : phosphatidyl inositols, PtdInsP : phosphoinositides, DAG : diacylglycérol, PI5K : phosphatidyl-5 kinase, PI3K (I) : phosphatidylinositol-3 kinase classe I.

Les PIPs sont présents en très faible quantité dans les membranes cellulaires et le PI(4,5)P₂ ne représente qu'environ 0.05% des PLs totaux (Lemmon, 2008). Le niveau de PI(4,5)P₂ est principalement régulé par l'activation de la PI5K (phosphatidylinositol-5 kinase) et par sa « consommation » du fait de l'action des PLCs (phospholipases C) et des PI3Ks (phosphatidylinositol-3 kinases) (Di Paolo & De Camilli, 2006) (**figure 3**). Cette double utilisation du PI(4,5)P₂ par des voies de signalisation différentes le place comme une molécule carrefour.

Le PI(3,4,5)P₃ est un second messager reconnu comme particulièrement important pour la transduction du signal. Il est généré par l'action des PI3Ks de classe I, qui phosphorylent le PI(4,5)P₂, et induit le recrutement membranaire des kinases Akt et PDK1 (« phosphoinositide-dependent kinase 1 »). Le recrutement membranaire de ces deux kinases engendre l'activation de la signalisation Akt qui est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses. La production de PI(3,4,5)P₃ en réponse à l'activation de PI3K ainsi que la voie de signalisation Akt seront détaillées dans le troisième chapitre.

B. Signalisation associée à la production de DAG

Deux grands « pools » de DAG intracellulaires sont à différencier. Il existe au niveau des endomembranes (réticulum endoplasmique/Golgi) une production continue de DAG générée par diverses enzymes métaboliques. Ce pool est impliqué dans l'homéostasie lipidique et la synthèse *de novo* des PLs (Eichmann & Lass, 2015).

En revanche, la production locale et transitoire de DAG est associée à des fonctions de signalisation. Au niveau de la membrane plasmique, les phospholipases C (PLC) catalysent la production rapide d'un pool de DAG, en réponse à une stimulation agoniste. Cette stimulation agoniste est aussi associée à la production plus tardive et plus soutenue de DAG au niveau d'endomembranes (Golgi/RE) (Sato *et al*, 2006). Ces productions de DAG membranaires sont associées à des fonctions directes de signalisation intracellulaire (Gallegos & Newton, 2008).

Production de diacylglycérol (DAG). Les phospholipases C (PLC) génèrent du DAG par l'hydrolyse de glycérophospholipides (PC et PI(4,5)P₂), en libérant leur tête polaire (**figure 4**). Une activité PLC spécifique aux PCs (PC-PLCs) existe dans les cellules eucaryotes mais le gène correspondant n'a pas encore été cloné (Ueda *et al*, 2014). A l'opposé, les PLCs capables d'hydrolyser le PI(4,5)P₂ (PI-PLCs) en DAG et en inositol-3 phosphate (IP₃) sont très étudiées. Il existe 14 gènes codant pour des PI-PLCs regroupés en 6 sous-familles en fonction de leurs mécanismes d'activation (Kadamur & Ross, 2013). Chaque sous-famille de PLC exerce à la fois des fonctions uniques et redondantes et montre une distribution subcellulaire spécifique. Classiquement, les PLCs sont activées après stimulation de récepteurs couplés à des protéines G (GPCRs) et de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) (**figure 4**). Cependant, chaque isoforme de PLCs répond à sa propre gamme d'activateurs, qui comprend des protéines G couplées aux GPCRs, des protéines tyrosine kinases, des petites protéines G, le calcium et des phospholipides (Kadamur & Ross, 2013).

L'hydrolyse du PI(4,5)P₂ par la PLC génère du DAG, mais aussi de l'inositol-3 phosphate (IP₃) (**figure 4**). L'IP₃ active un récepteur du réticulum endoplasmique, ce qui provoque une libération de calcium intracellulaire. Le calcium est un effecteur clé qui participe à l'activation et à la régulation de nombreuses protéines. Il participe à l'activation de certaines protéines kinases C (PKCs) et de nombreuses autres protéines de signalisation contenant un domaine C2 interagissant avec le calcium et les lipides membranaires (Kadamur & Ross, 2013).

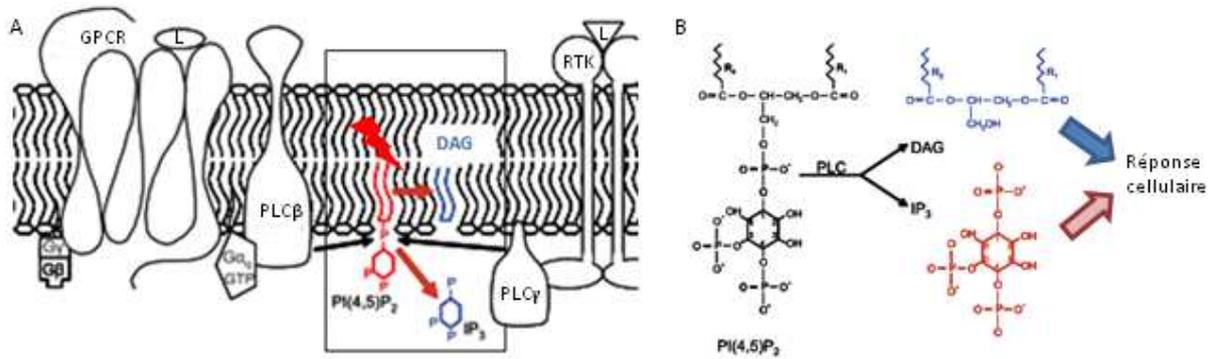


Figure 4. Activité PLC sur le PI(4,5)P₂ : production de DAG et d'IP₃

A. Représentation schématique de l'activation des PLCs au niveau de la membrane plasmique. B. Représentation chimique du PI(4,5)P₂ et de ses métabolites après l'action de la PLC. Modifié d'après (Eyster *et al.* 2007). PLC : phospholipase C, DAG : diacylglycérol, IP₃: inositol-3 phosphate, RTK: récepteur à activité tyrosine kinase, L : ligand.

Réponse cellulaire associée à la production de DAG. La production de DAG induit une réponse cellulaire en recrutant et en activant des protéines de signalisation contenant un domaine C1. Classiquement, les PKCs sont considérées comme les principaux effecteurs de la réponse au DAG. En effet, ce signal lipidique est le médiateur essentiel de l'ancrage membranaire des PKCs et de leur activation subséquente. Le deuxième chapitre de cette partie sera entièrement consacré aux PKCs.

La divergence et la complexité de la signalisation DAG ont été révélées par l'identification d'autres protéines contenant un domaine C1, et répondant également à la production de DAG (Yang & Kazanietz, 2003) (**figure 5**):

- i) Les PKDs (protéine kinase D) sont vues comme des effecteurs en aval des PKCs, et ont été impliquées dans la régulation de la signalisation ERK.
- ii) Les chimaerines de la famille des « GTPase activating protein » activent des protéines G de type Rac/Rho impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine.
- iii) Les RasGRPs (« Ras guanyl nucleotide-releasing protein ») sont des GEF (« guanine exchange factor) activant les protéines G de la famille Ras et Rap.
- iv) Les DGKs (« diacylglycérol kinase ») sont impliquées dans la métabolisation du DAG (leur action sera détaillée dans le paragraphe D).

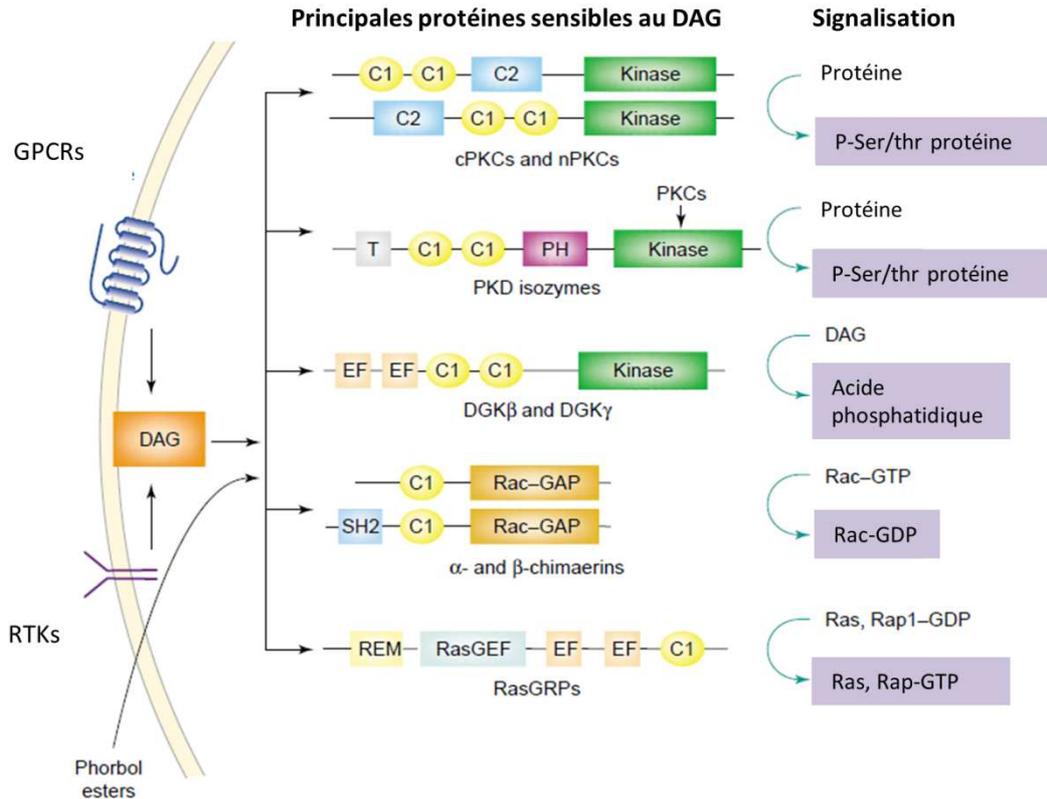


Figure 5. Protéines activées en réponse à une production de DAG

La stimulation de récepteurs membranaires générant du DAG membranaire mène à l'activation de plusieurs familles de protéines possédant un domaine C1. Les phorbols esters miment l'action du DAG. Modifié d'après (Yang & Kazanietz, 2003). Thr : thréonine, Ser : serine, c/nPKC : protéine kinase C conventionnelle ou nouvelle, PKD : protéine kinase D, DGK : diacylglycérol kinase, RasGRP : Ras guanyl nucleotide-releasing protein, P : phosphorylation.

La spécificité de la signalisation DAG est assurée par les protéines répondant à ce signal via le domaine C1 et par le signal DAG lui-même.

En effet, tous les domaines C1 ne sont pas structurellement identiques. Cela se traduit par des différences d'affinité au DAG et/ou à d'autres co-facteurs lipidiques, et contribue à orienter la spécificité d'activation des protéines contenant un domaine C1 (Steinberg, 2008). L'exemple de l'activation des différentes isoformes de PKC sera détaillé dans le deuxième chapitre.

D'autre part, la cinétique et la localisation de la production du DAG (membrane plasmique/endomembranes) ainsi que les espèces moléculaires de DAG générées sont des paramètres qui contribuent aussi à la spécificité de la réponse cellulaire (Almena & Mérida, 2011). Par exemple, l'activation d'une voie de signalisation initiée au niveau du Golgi, par la production locale de DAG, n'aurait pas la même conséquence biologique que l'activation de cette même voie à la membrane plasmique (Bivona *et al*, 2003; Mayinger, 2011). De plus, la

composition en AG du DAG, qui peut varier en fonction du type de PLs hydrolysés et de la qualité de l'apport nutritionnel, module l'affinité du domaine C1 des protéines de signalisation (Madani *et al*, 2001, 2004; Lung *et al*, 2009). Ainsi, une supplémentation nutritionnelle modifiant la composition en AG des PLs peut avoir un impact sur la signalisation DAG.

C. Signalisation associée à la production de PA

La concentration membranaire en PA est maintenue à de faibles niveaux (environ 1% des lipides totaux). Cela est dû à son rôle clé d'intermédiaire dans le métabolisme lipidique : sa conversion continue en d'autres espèces lipidiques s'équilibre avec sa synthèse *de novo*. Ce pool de PA est associé au métabolisme et à l'homéostasie lipidique (Shin & Loewen, 2011).

En revanche, la production locale de PA via l'hydrolyse de la PC, dépendante de l'activation de phospholipases D (PLDs), est associée à des fonctions de signalisation. Une production de PA peut aussi être obtenue par phosphorylation du DAG par les DAG kinases (DGKs) et être associée à des fonctions de signalisation (Wang *et al*, 2006a). Ce mode de production sera rediscuté dans le paragraphe D.

Production d'acide phosphatidique (PA). La fraction de PA associée à la signalisation est produite localement par l'activation de phospholipases D. Les PLDs catalysent préférentiellement l'hydrolyse des PCs libérant du PA et de la choline (Bruntz *et al*, 2014) (**figure 6**). La choline libérée n'aurait pas de fonction de signalisation propre (Wang *et al*, 2006a) mais représente un substrat essentiel pour la synthèse *de novo* de la PC et de la SM. Cette voie métabolique est initiée par des choline kinases et jouerait un rôle important dans la progression, la survie et la prolifération tumorales (Glunde *et al*, 2011).

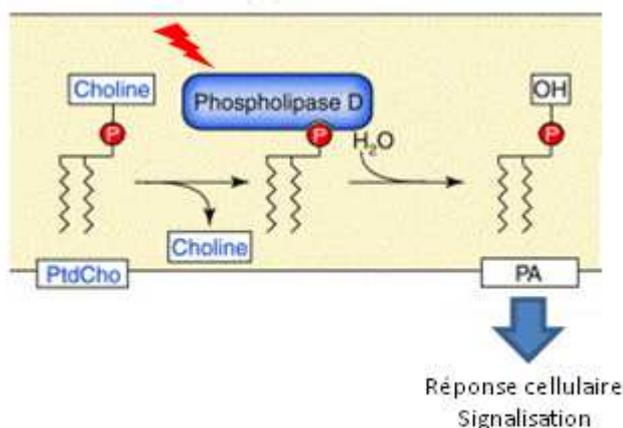


Figure 6. Production de PA par action de la PLD sur la phosphatidylcholine

Modifié d'après (Munnik, 2001).
PtdCho : phosphatidylcholine, PA : acide phosphatidique.

Par opposition aux phospholipases C présentées dans le paragraphe précédent, l'activation des PLDs semble plus liée à la signalisation en aval des récepteurs RTKs et GPRCs activés qu'aux récepteurs eux-mêmes. Les mécanismes d'activation des PLDs semblent diverses, et tous ne sont pas encore élucidés. En effet, les PLDs interagissent avec un grand nombre de partenaires (PIs, kinases, phosphatases, GTPases, protéines structurales, phospholipases) (Jang *et al*, 2012). Cependant, le PI(4,5)P2 est reconnu comme un co-facteur lipidique essentiel à la localisation et à l'activité des PLDs (Oude Weernink *et al*, 2007).

Il existe deux isoformes de PLDs. La PLD1 possède une faible activité basale. L'exemple d'activation de la PLD1 le mieux décrit implique les protéines kinases C conventionnelles (cPKCs) et les GTPases des familles ARF et Rho (Oude Weernink *et al*, 2007). La PLD2 présente une plus forte activité basale et ne répondrait que faiblement à une stimulation PKC et ARF par rapport à la PLD1 (Oude Weernink *et al*, 2007). Plus récemment, il a été montré que l'activité de la PLD2 dépendrait aussi de son profil de phosphorylations. Trois sites importants ont été identifiés : un site activateur (EGFR), un site inhibiteur (JAK3, « Janus kinase 3 ») et un site régulateur (Src) (Henkels *et al*, 2010).

De manière intéressante par rapport aux travaux de la présente thèse, il existerait un lien entre les microtubules et l'activité PLD (Dhonukshe *et al*, 2003; Chae *et al*, 2005; Cho *et al*, 2008a). Ce point sera abordé plus précisément dans la discussion.

Réponse cellulaire à la production de PA. Aucun domaine protéique de liaison spécifique au PA n'a encore été identifié. Plutôt qu'une reconnaissance structurale spécifique, des interactions électrostatiques et hydrophobes combinées à un environnement lipidique permissif permettraient l'interaction entre le PA et ses effecteurs ainsi que leur translocation membranaire (Stace & Ktistakis, 2006; Shin & Loewen, 2011). Le PA, chargé négativement, permet le recrutement de protéines qui ont des régions riches en acide aminés basiques (Stace & Ktistakis, 2006).

Le PA est un second messenger lipidique stratégiquement placé à l'intersection de plusieurs grandes voies de signalisation : PKC, MAPK, mTOR. Il peut interagir avec de très nombreuses protéines (kinases, phosphatases, petites protéines G, phospholipases C) (Bruntz *et al*, 2014). La pertinence biologique des nombreux partenaires du PA, dont la régulation et/ou l'interaction n'ont été démontrées que dans des modèles *ex-vivo* n'est pas toujours évidente. De manière consistante, le PA a été décrit comme provoquant le recrutement et/ou l'activité de plusieurs protéines kinases (**figure 7A**). En contraste avec l'activation de kinases,

le PA a aussi été décrit comme diminuant l'activité de phosphatases (**figure 7B**). Ainsi, la figure 7 propose un modèle dans lequel le PA participe à la régulation des événements de phosphorylations.

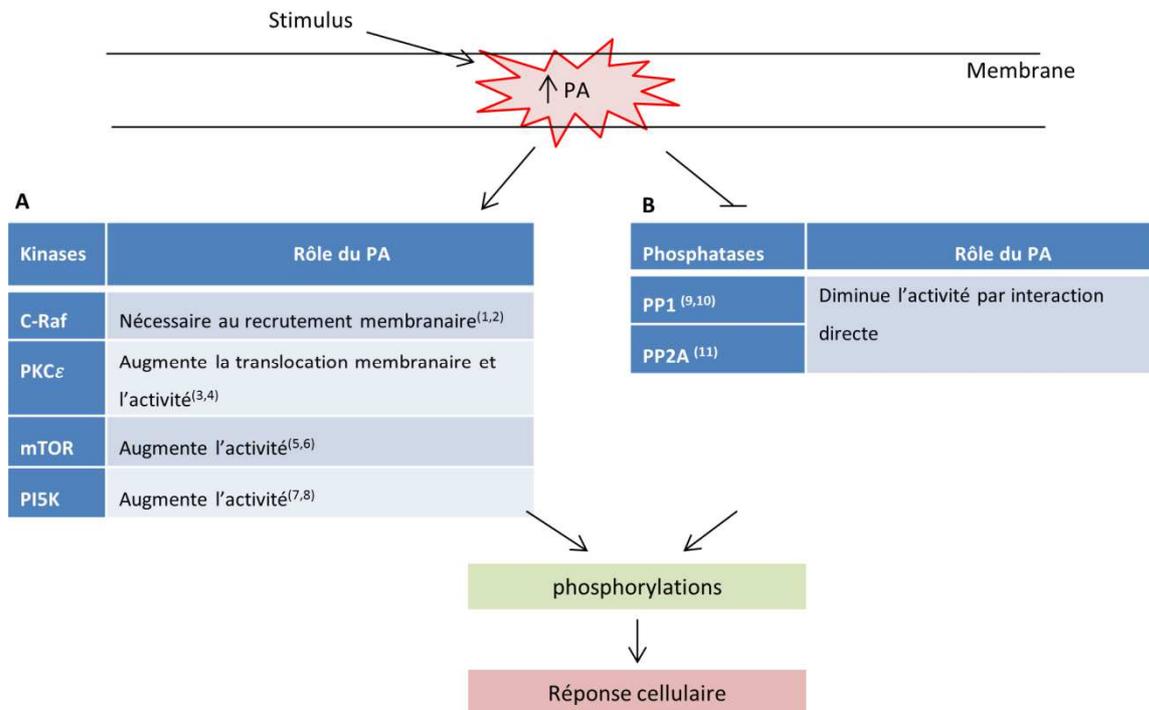


Figure 7. Cibles activées ou inhibées par l'acide phosphatidique en lien avec le statut de phosphorylations des protéines de signalisation.

A Exemples de kinases régulées par le PA. Liste non exhaustive de protéines kinases dont la localisation et/ou l'activité sont modifiées par le PA. Ne sont listées que des données consistantes étudiées dans deux modèles différents. 1 : (Ghosh *et al*, 1996) ; 2 : (Rizzo *et al*, 2000), 3 : (Lopez-andreo *et al*, 2003) ; 4 : (Corbalan-garcia *et al*, 2003) ; 5 : (Fang *et al*, 2001) ; 6 : (Veverka *et al*, 2008) ; 7 : (Moritz *et al*, 1992) ; 8 : (Jenkins *et al*, 1994). **B** Phosphatases régulées par le PA. 9 : (Jones, 2002), 10 : (Jones *et al*, 2005a), 11 : (Gao *et al*, 2013). Adapté d'après (Wang *et al*, 2006a). PKC: protéine kinase C ; mTOR: mammalian target of rapamycin ; PI5K: phosphoinositide 5 kinase, PP1 : protéine phosphatase 1, PP2A : protéine phosphatase 2A, Raf: Rapidly accelerated fibrosarcoma.

PA et prolifération cellulaire. Le rôle de l'axe PLD/PA dans la régulation de la prolifération cellulaire induite par des facteurs de croissance et des oncogènes est bien établi et supporté par de nombreuses études sur des modèles de fibroblastes et de lignées cancéreuses humaines.

La production de PA est impliquée dans l'activation de Ras (Zhao *et al*, 2007), le recrutement membranaire de C-Raf (Rizzo *et al*, 2000) et dans l'activation du module MAPK/ERK1/2 (« Mitogen activated protein kinase » / « Extracellular signal-regulated kinases ») (Rizzo *et al*, 1999). L'importance de l'axe PLD/PA dans l'activité oncogénique de

Ras a été démontrée dans un modèle de xélogreffe sur des souris immunodéprimées (Buchanan et al, 2005). L'expression d'un dominant négatif de PLD1 dans des fibroblastes de rat exprimant un mutant de H-Ras constitutivement actif bloque la capacité des cellules à former des tumeurs. Une administration continue de PA restaure la capacité de ces cellules à former des tumeurs et augmente la croissance tumorale des fibroblastes H-Ras/PLD1 WT (« wild type »). Enfin, dans plusieurs modèles de lignées cancéreuses mammaires, la production de PA participe à la prolifération cellulaire en réponse à l'EGF (« Epidermal growth factor ») (Zhang *et al*, 2014).

Par ailleurs, la production de PA est nécessaire à l'activation mitogénique de mTOR (« mammalian Target of rapamycin ») et de ses substrats, mais ne semble pas affecter l'activité PI3K (Fang *et al*, 2001). Dans plusieurs lignées cancéreuses, une production PA serait requise pour la formation et la stabilisation des deux complexes mTOR. (Toschi *et al*, 2009).

PA et survie cellulaire. Le PA participe aussi à la survie cellulaire. L'activité PLD protégerait les cellules de la mort cellulaire en régulant positivement l'expression de gènes anti-apoptotiques et/ou en régulant négativement l'expression de gènes pro-apoptotiques (Bruntz *et al*, 2014). Par exemple, il a été montré que la surexpression de la PLD et un traitement exogène avec du PA augmentent la transcription de Bcl-2, gène anti-apoptotique (Choi & Han, 2012). La régulation des voies de signalisation MAPK et mTOR serait impliquée dans l'effet pro-survie du PA, bien que les mécanismes moléculaires exacts restent à déterminer (Bruntz *et al*, 2014).

D. Fin du signal d'activation : métabolisation du DAG et du PA

Les signalisations DAG et PA sont directement interconnectées. Les DAG kinases (DGK) mettent fin au signal DAG via sa métabolisation en PA. Inversement, le PA est rapidement converti en DAG par l'action d'une PA phosphatase (PAP). Les DGKs et les PAPs sont les deux principales voies pour métaboliser les pools de DAG et de PA associés à la signalisation intracellulaire.

Métabolisation du DAG. Les DGKs métabolisent le DAG en PA. A ce jour, 10 isoformes de DGK kinases ont été identifiées. Les études de « knockout » sur des souris montrent des phénotypes propres à chaque DGK ciblée (Cai *et al*, 2012), ce qui suggère des

fonctions distinctes. Les DGKs possèdent un domaine C1 (voir figure 6) et sont activées en réponse à la production de DAG pour mettre fin au signal en métabolisant le DAG en PA. Cependant, ce mécanisme d'activation « simpliste » ne reflète pas la complexité des fonctions associées aux DGKs. En effet, le PA est un métabolite bioactif. Cai *et al.* propose un modèle selon lequel l'activité DGK, soit termine le signal DAG (**figure 8A**), soit active la signalisation PA (**figure 8B**), et ce, en fonction de la localisation subcellulaire des DGKs et de son partenaire d'interaction (Cai *et al.*, 2012). Ainsi, les DGKs interagissant avec des protéines régulées par le DAG termineraient le signal d'activation (**figure 8A**). Inversement, les DGKs interagissant avec des protéines régulées par le PA et les activeraient (**figure 8B**) (Cai *et al.*, 2012). D'une manière générale, les fonctions de signalisation des DGKs sont encore largement à explorer.

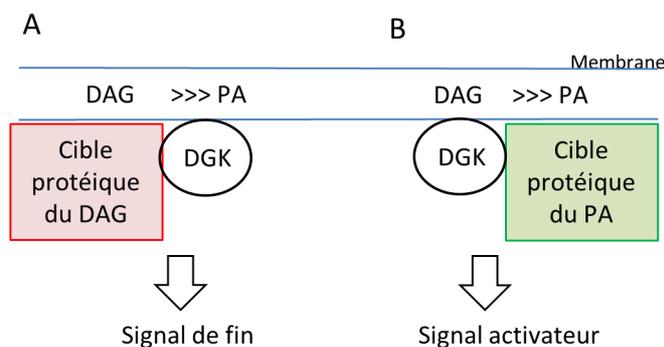


Figure 8. Modèle de compartimentalisation des DGKs.

A_ La DGK interagit et inhibe une protéine de signalisation répondant au DAG. B_ La DGK interagit avec une protéine de signalisation et augmente son activité en générant du PA. D'après (Cai *et al.*, 2012). DAG : diacylglycérol, PA : acide phosphatidique, DGK : diacylglycérol kinase.

La fin du signal DAG peut aussi faire intervenir une autre famille d'enzyme, les DAG lipases, localisées à la membrane plasmique. Ces lipases peuvent hydrolyser le DAG produit en réponse à une stimulation PLC pour produire des monoacylglycérols et un acide gras libre (Eichmann & Lass, 2015).

Métabolisation du PA. Le PA peut être métabolisé en DAG par l'action de PAP. Il peut aussi être métabolisé en acide lysophosphatidique plus un acide gras libre, par l'action de phospholipase A2 qui hydrolysent spécifiquement les glycérophospholipides en sn-2 (Wang *et al.*, 2006a).

Deux activités PAPs sont distinguées. La PAPI (ou lipine) est cytosolique et transloque à la membrane après un signal de déphosphorylation activateur. Par opposition, la PAP2 (ou lipide phosphate phosphatase, LPP) est transmembranaire et n'est pas spécifique au PA (Wang *et al.*, 2006a). D'une manière générale, les PAPs sont associées au maintien de

l'homéostasie lipidique et ne sont que très peu étudiées dans le contexte de la signalisation intracellulaire.

Interprétation cellulaire de l'interconversion entre DAG et PA. Physiologiquement, les seconds messagers produits en réponse à une stimulation doivent être dégradés rapidement et spécifiquement, or le DAG et le PA sont métabolisés respectivement en PA et en DAG. Comment la cellule interprète-t-elle ces deux signaux *a priori* activateurs ? Deux grandes hypothèses émergent de la littérature. La spécificité de la signalisation serait assurée par les différentes espèces moléculaires à l'origine des messagers lipidiques et par la régulation spatio-temporelle des différents signaux.

La composition en acide gras du PI(4,5)P₂ et celle de la PC, respectivement substrats des lipases PLC et PLD, diffère. Les PI contiennent majoritairement un AG polyinsaturé en sn-2 (typiquement de l'acide arachidonique pour 30 à 80 % des espèces moléculaires de PI) alors que les PC contiennent majoritairement des AG saturés ou mono-insaturés (Hodgkin *et al*, 1998; D'Souza & Epanand, 2014). Par conséquent, l'activation de la voie PLD aboutirait à la métabolisation du PA en une molécule de DAG différente de celle générée par la voie PLC (**figure 9**). Un raisonnement identique peut être tenu pour la métabolisation du DAG. Plusieurs données montrant que la composition en AG du DAG et du PA influence différemment les voies de signalisation appuient cette hypothèse (Hodgkin *et al*, 1998; Siddiqui & Yang, 1995; Madani *et al*, 2004, 2001). Par exemple, les études menées par Madani *et al*. montrent que différentes espèces moléculaires de DAG n'exercent pas les mêmes effets activateurs sur les PKCs ou sur RasGRP et la signalisation MAPK en aval (Madani *et al*, 2001, 2004).

La deuxième hypothèse pouvant expliquer la spécificité de la réponse cellulaire dans ce contexte est la régulation spatio-temporelle de la production du signal et la localisation des effecteurs (Carrasco & Mérida, 2007; Wang *et al*, 2006a). En effet, la différence de localisation subcellulaire des différentes enzymes impliquées dans la production et dans la métabolisation des signaux peut aussi contribuer à la spécificité du signal.

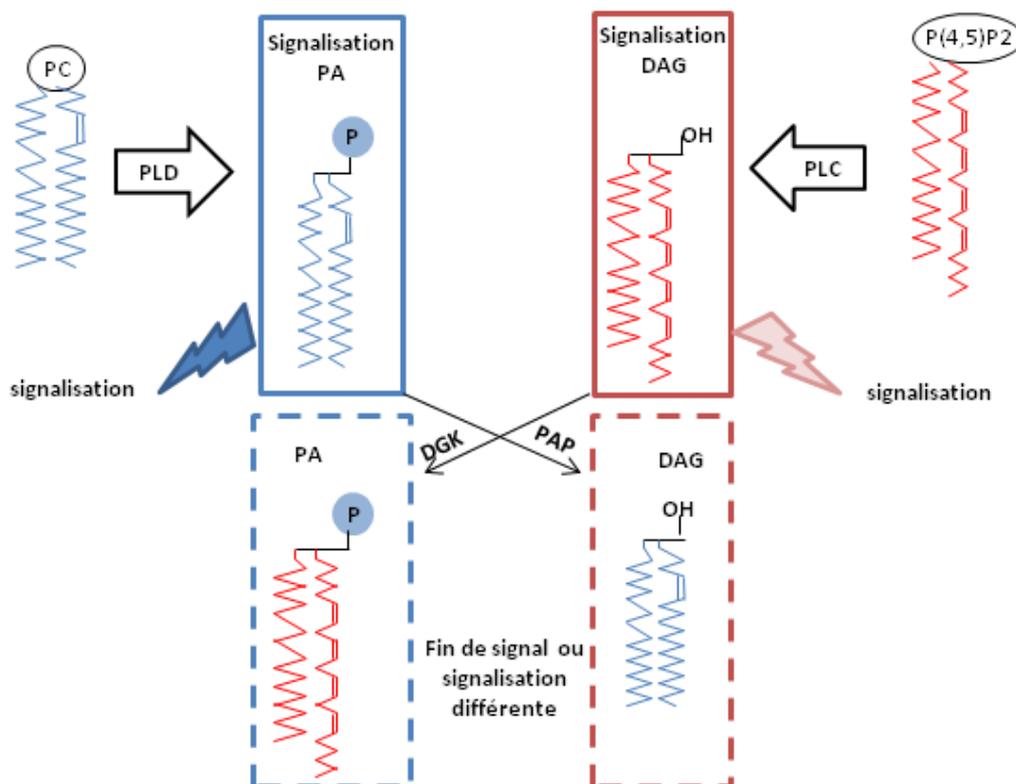


Figure 9. Fin du signal DAG et PA et interconversion des seconds messagers lipidiques

La PC contient majoritairement des acides gras saturés et/ou monoinsaturés. Le PI(4,5)P2 contient préférentiellement un acide gras polyinsaturé en sn-2. PC : phosphatidylcholine, PLD : phospholipase D, PA : acide phosphatidique, PI(4,5)P2 : phosphatidyl 4, 5-phosphoinositol, PLC : phospholipase C, IP3 : inositol 3 phosphate, DAG : diacylglycérol, DGK : diacylglycérol kinase, PAP : acide phosphatidique phosphatase.

E. Interconnexions

Ce paragraphe a pour but d'illustrer les interconnexions lipidiques en apportant une vue globale des interactions possibles (**figure 10**). La signalisation lipidique classique est encadrée dans la figure 10. Le PIP3 et le DAG sont deux messagers lipidiques bien identifiés pour lesquels il existe des domaines protéiques spécialisés. L'axe PA/PLD apparaît être interconnecté avec cette signalisation lipidique. De plus, aujourd'hui, le PA apparaît avoir des rôles conséquents dans la signalisation intracellulaire et l'oncogénèse (Wang *et al*, 2006a; Peng & Frohman, 2012).

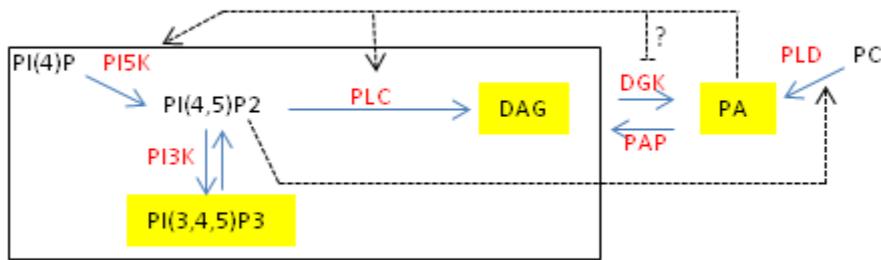


Figure 10. Interconnexions entre les signalisations DAG, PA et PIPs.

Les enzymes catalysant la production des seconds messagers lipidiques sont représentées en rouge. Les seconds messagers lipidiques (DAG, PIPs, PA, surlignés en jaune) sont impliqués dans l'activation des grandes voies de signalisation mTOR/Akt, PKC, et Raf/ERK.. PLC : phospholipase C, PIP : phosphoinositol phosphate, DAG : diacylglycérol, PA : acide phosphatidique, PC : phosphatidylcholine, PLD : phospholipase D, PKC : protéine kinase C, DGK : diacylglycérol kinase, PAP : acide phosphatidique phosphatase.

Le PA active la PI5K, responsable de la production de PI(4,5)P2 (Foster & Xu, 2003; Moritz *et al*, 1992) et le PI(4,5)P2 est nécessaire à l'activité PLD. Ainsi, la synthèse du PI(4,5)P2 peut être considérée comme une boucle de régulation positive maintenant l'activité PLD (Eyster, 2007).

Par ailleurs, le PA peut participer à l'activation de certaines isoformes de PLC. Il a été montré que la PLC β 1 interagit directement avec le PA (Litosch, 2000) et que les PLDs sont impliquées dans l'activation de PLC en réponse à une stimulation agoniste de GPCRs (Litosch *et al*, 2009).

Il semble exister un équilibre entre les voies DGKs et PAPs. Par exemple, en cas d'inhibition des PLDs, la voie DGK pourrait servir de « voie de secours » pour la production de PA (Foster *et al*, 2014). En effet, il a été montré que l'inhibition des PLD1/2 provoque une augmentation de PA (Antonescu *et al*, 2010).

Encadré 1. Points clés du chapitre « lipide membranaire et seconds messagers lipidiques »

- ✓ La production rapide, locale et transitoire de messagers lipidiques est associée à des fonctions de signalisation intracellulaire.
- ✓ La composition en acide gras des PLs influence la signalisation initiée par les messagers lipidiques.
- ✓ Le DAG est produit par des PLCs via l'hydrolyse de PI (PI-PLC) ou via l'hydrolyse de PC (PC-PLC).
- ✓ Le PA, produit via l'hydrolyse de PC par les PLDs, est impliqué dans l'activation des signalisations MAPK/ERK1/2 et mTOR.
- ✓ Le PA et le DAG sont interconvertibles.

Chapitre 2. Les PKCs, famille de kinases sensible aux lipides

Les PKCs sont une grande famille de kinases impliquées dans la régulation de multiples voies de signalisation. De nombreuses études montrent l'importance des PKCs dans les fonctions cellulaires associées au phénotype tumoral comme la prolifération, la survie, la différenciation, la migration, l'invasion et la néo-angiogénèse (Garg *et al*, 2013a; Lipp & Reither, 2011). La majorité d'entre elles dépendent d'un second messager lipidique pour leur activation ce qui situe leur champ d'activation à proximité de la membrane plasmique bien que leur localisation n'y soit pas restreinte.

1. Les isoformes de PKCs

Cette grande famille d'enzymes est subdivisée en trois groupes en fonction de leurs domaines protéiques régulateurs : les PKCs classiques ou conventionnelles (cPKCs), les nouvelles PKCs (nPKCs) et les atypiques (aPKCs) (**figure 11**). Le principal signal d'activation des cPKCs et des nPKCs est le DAG, un second messager lipidique produit de manière transitoire, classiquement après l'activation de récepteurs associés aux PLCs (voir chapitre 1, point 2). L'action du DAG peut être mimée par des phorbol esters qui interagissent également avec le domaine C1 (Garg *et al*, 2013a).

Les cPKCs comprennent la PKC α , les PKC β (I et II) et la PKC γ . L'activation des cPKCs est aussi dépendante du calcium qui interagit avec le domaine C2. Les nPKCs (PKC ϵ , PKC δ , PKC η et PKC θ) sont activées de manière semblable aux cPKCs mais indépendamment du calcium. En outre, des PLs membranaires anioniques (PS, PA, PIs) interviennent également dans l'activation des cPKCs et des nPKCs (Newton, 2010) (**figure 11_Activation**). L'activation des cPKCs et des nPKCs sera détaillée dans le deuxième paragraphe.

Les aPKCs (PKC ι , PKC ζ) ne répondent pas aux mêmes signaux d'activation : elles sont insensibles au DAG et au calcium intracellulaire. En effet, cette sous-famille ne partage qu'une homologie de séquence du domaine kinase avec les autres PKCs. La PS et d'autres PLs anioniques peuvent interagir avec les aPKCs mais leur activation reste majoritairement dépendante d'interactions protéine-protéine, via leur domaine PB1 (« Phox and bem 1 ») et de phosphorylation (Parker *et al*, 2014). Ce chapitre se concentrera sur les c et les nPKCs, les aPKCs étant structurellement et fonctionnellement très distinctes.

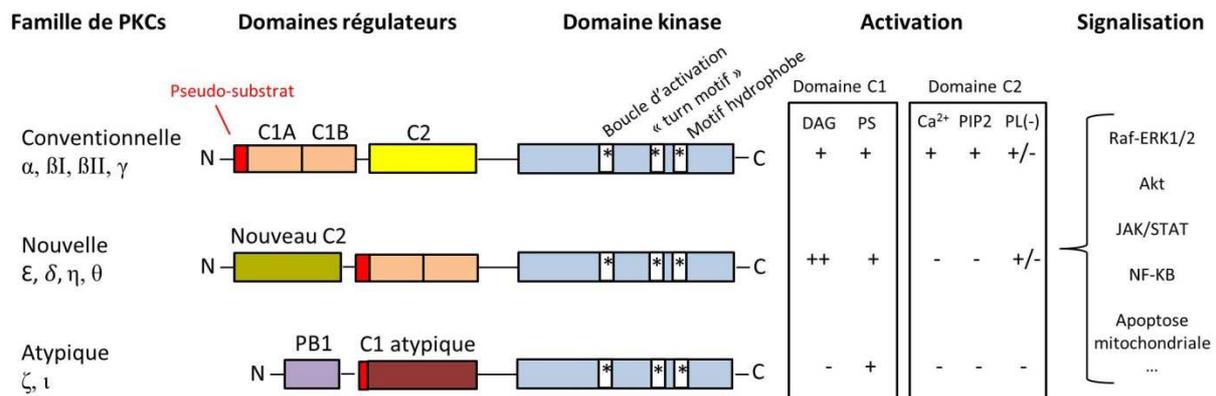


Figure 11. Vue générale de la famille des protéines kinases C.

En fonction des familles (conventionnelle, nouvelle et atypique), les PKCs peuvent être activées par des phospholipides membranaires, le DAG et le calcium. Les domaines régulateurs « pseudosubstrat » sont représentés en rouge. Les astérisques (*) dans le domaine kinase représentent des sites de phosphorylation conservés au niveau de régions spécifiques. Les PKCs interagissent avec de nombreuses voies de signalisation. Modifié d'après Garg *et al.*, 2013 et Antal & Newton, 2014. DAG : diacylglycérol, PS : phosphatidylsérine, PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PL(-) : phospholipides anioniques.

La majorité des PKCs sont exprimées de manière ubiquitaire et les cellules co-expriment plusieurs isoformes. Les PKCs régulent l'activité d'une grande variété de protéines effectrices en phosphorylant des résidus sérines et thréonines (**figure 11_Signalisation**). Dresser une carte de signalisation consensuelle montrant l'étendue des protéines et des voies régulées par les PKCs n'est pas réalisable car chaque isoforme possède des fonctions distinctes en fonction du type cellulaire étudié. Cela complique l'étude des PKCs et de leurs dérégulations associées au cancer. En effet, la contribution individuelle de chaque PKC dans telle ou telle fonction reste mal définie et largement dépendante du contexte cellulaire (Garg *et al.*, 2013; Mochly-Rosen *et al.*, 2012).

2. Activation et régulation de l'activité des PKCs

Les PKCs sont classiquement activées par un processus coordonné de plusieurs étapes : i) la maturation par phosphorylation module la stabilité et la capacité catalytique des PKCs, ii) les interactions lipidiques et la production de DAG (dépendantes ou indépendantes calcium) provoquent la translocation membranaire et un changement de conformation à l'origine de l'activité catalytique des PKCs et iii) les interactions avec des protéines d'ancrages, isoformes spécifiques, permettent une localisation différentielle aux membranes (plasmique ou endomembranes) et donc un accès à des substrats particuliers. Par ailleurs, ces mécanismes coordonnés permettent la régulation précise de l'activité PKC en contrôlant

l'amplitude, la durée et la localisation de la signalisation. L'ensemble de ces processus mène donc à une signature d'activation unique pour chaque isoforme de PKC et dépendante du contexte cellulaire (Steinberg, 2008; Antal & Newton, 2014). D'autres mécanismes d'activation plus atypiques et dépendants des isoformes de PKC ont été décrits. Par exemple, la protéolyse de la PKC δ régulée par des caspases est impliquée dans des réponses pro-apoptotiques (Steinberg, 2008).

A. Maturation des PKCs par des phosphorylations

L'étape de maturation est un processus essentiel pour rendre les PKCs catalytiquement compétentes et les protéger de la dégradation (Newton, 2010). Cette étape nécessite la présence des protéines chaperonnes HSP90 (« Heat shock protein ») et Cdc37 (Gould *et al*, 2009). La maturation requiert trois phosphorylations ordonnées au niveau de trois sites (boucle d'activation, « turn motif » et motif hydrophobe) dans le domaine kinase des PKCs (**figure 11_Domaine kinase**).

Le premier événement de phosphorylation, permettant d'initier la maturation des PKCs, se situe au niveau de la boucle d'activation de l'enzyme. Cette phosphorylation est attribuée à PDK1. La perturbation de cette étape rend les PKCs très sensibles à la dégradation (Newton, 2010). Concernant les cPKCs, l'action de PDK1 est considérée comme constitutive et indépendante de PI3K (Sonnenburg *et al*, 2001). Pour les nPKCs, l'action de PDK1 apparaît plutôt comme régulée (Cenni *et al*, 2002) : alors qu'une stimulation mitogénique n'a pas d'effet sur la phosphorylation des cPKCs régulée par PDK1, elle induit la phosphorylation des nPKCs. De manière atypique, la phosphorylation de la PKC δ par PDK1 serait dépendante de l'activité PI3K (Le Good *et al*, 1998). Cet événement n'aurait pas de lien avec son activité catalytique mais permettrait d'orienter la sélectivité de substrats activés par la PKC δ (Steinberg, 2008).

La maturation complète des PKCs requiert deux autres phosphorylations au niveau c-terminal de la protéine (« turn motif » et motif hydrophobe). Longtemps attribué à des mécanismes d'autophosphorylation, mTORC2 pourrait être impliqué de manière directe ou indirecte dans ces événements (Facchinetti *et al*, 2008; Ikenoue *et al*, 2008). Les mécanismes impliqués dans cette deuxième vague de phosphorylation restent discutés (Steinberg, 2008; Newton, 2010).

Résumé. Les PKCs immatures sont dans une conformation ouverte, inactive et associées à la membrane plasmique via des interactions faibles (Sonnenburg *et al*, 2001; Antal *et al*, 2014) (**figure 12A**). Le premier évènement de phosphorylation réalisé par PDK-1 déclenche les deux autres. La phosphorylation du site « turn » est particulièrement importante pour la compétence catalytique de l'enzyme alors que les deux autres participent à sa stabilisation globale. Les PKCs ainsi matures sont relâchées dans le cytosol où elles adoptent une conformation fermée d'auto-inhibition avec le domaine pseudosubstrat bloquant le site catalytique de l'enzyme (**figure 12B**). Suite à la production de seconds messagers lipidiques tels que le DAG, la translocation membranaire sera le signal déclencheur de l'activité catalytique (Antal *et al*, 2014).

Le laboratoire de Newton a montré que le changement de conformation lié à la maturation de l'enzyme masque le domaine C1 des cPKCs. Cela limiterait l'activation des cPKCs en absence de second messager. Ainsi, en plus de stabiliser et de rendre les PKCs catalytiquement compétentes, le processus de maturation module la dynamique de recrutement des PKCs de façon à ce que les enzymes soient activées uniquement par une production locale de DAG membranaire (Antal & Newton, 2014).

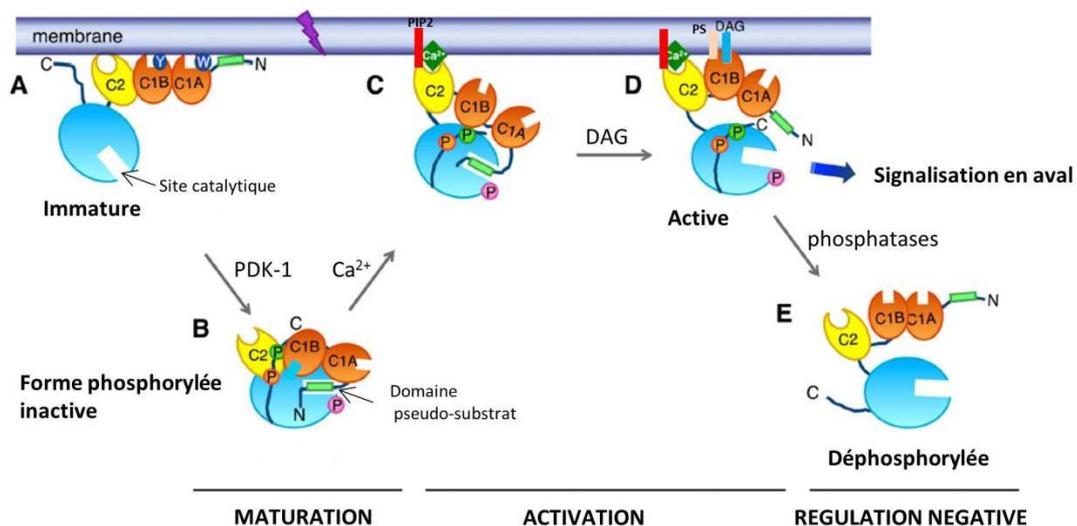


Figure 12. Modèle représentant la maturation, l'activation et l'inactivation des PKCs conventionnelles.

A_ Les PKCs non matures et catalytiquement inactives sont associées à la membrane plasmique via des interactions faibles entre membrane, queue C-terminale, domaine C2, domaine C1B (résidu tyr), domaine C1B (résidu trp) et domaine pseudosubstrat. **B_** Les PKCs matures sont relâchées dans le cytosol. Elles adoptent une conformation fermée dans laquelle les domaines C1 sont masqués. Le domaine interne « pseudosubstrat » est lié au site catalytique de l'enzyme et inhibe son activité. **C_** En réponse à une stimulation induisant la production de PIP₂, le domaine C2 dépendant du calcium cible les cPKCs à la membrane plasmique. **D_** L'interaction du domaine C1 avec le DAG engendre un changement de conformation, libère le domaine pseudosubstrat et active les cPKCs. **E_** La déphosphorylation des cPKCs les rend très sensibles à la dégradation. Modifié d'après Antal et al. 2014.

B. Translocation membranaire des PKCs

La translocation des PKCs de la fraction cytosolique soluble à différents compartiments subcellulaires est considérée comme un marqueur général de leur activation (Steinberg, 2008; Mochly-Rosen *et al*, 2012). La translocation membranaire des PKCs matures est régulée par la production de DAG et assistée par le calcium pour les cPKCs. L'interaction avec les PLs anioniques (PA, PS, PI, CL) est également importante pour leur activation (**figure 11_Activation**). La littérature comprend de nombreuses études d'interactions *ex-vivo* divergentes : les interactions entre les domaines régulateurs C1/C2 et la membrane ne dépendraient pas, de manière stricte, d'un PL particulier mais résulteraient plus d'un environnement lipidique permissif (Stace & Ktistakis, 2006). Les paragraphes suivants décrivent les interactions précises entre les domaines C1/C2 et les lipides membranaires. *In fine*, l'engagement membranaire coordonné des domaines C1 et C2 déclenche un changement de conformation des PKCs et libère le domaine pseudo-substrat du site catalytique des PKCs ce qui lève son action auto-inhibitrice (**figure 12D**) (Newton, 2010; Steinberg, 2008).

Domaine C2. Classiquement, la fonction du domaine C2 est de faciliter l'interaction entre le domaine C1 et le DAG, principal activateur. Le domaine C2 interagit avec des PLs anioniques.

Dans le cas des cPKCs, la liaison avec le calcium confère au domaine C2 une spécificité pour le PIP2 membranaire. L'interaction calcium-domaine C2 permet de pré-cibler les cPKCs à la membrane (**figure 13**). Ce ciblage initial à la membrane est de faible affinité mais permet au domaine C1 d'interagir avec le DAG et la PS et d'engendrer un réel ancrage membranaire (Steinberg, 2008; Newton, 2010).

Le domaine C2 des nPKCs diffère de celui des cPKCs. L'équipe de Corbalan-Garcia a montré que l'interaction PA est requis pour la translocation membranaire du domaine C2 de la PKC ϵ (Corbalan-garcia *et al*, 2003) et qu'une combinaison PA/DAG est nécessaire pour l'activation de cette isoforme (Lopez-andreo *et al*, 2003). Ces données sont en opposition avec celles du laboratoire de Cho & Stahelin qui rapporte que le domaine C2 de la PKC ϵ n'interagit que très faiblement avec les PLs anioniques et que la délétion du domaine C2 de la protéine ne perturbe pas sa translocation membranaire (Stahelin *et al*, 2005). Le domaine C2 de la PKC δ serait plus affiné pour la PS (Stahelin *et al*, 2004). De manière additionnelle et atypique, le domaine C2 de la PKC δ interagirait aussi avec des résidus tyrosines phosphorylés (identification de CDCP1 « CUB domain-containing protein 1 ») (Benes *et al*, 2005). Ces

auteurs émettent l'hypothèse que l'interaction entre la PKC δ et des protéines phosphorylées membranaires pourrait réguler son activation qui serait donc, aussi dépendante d'une activité kinase.

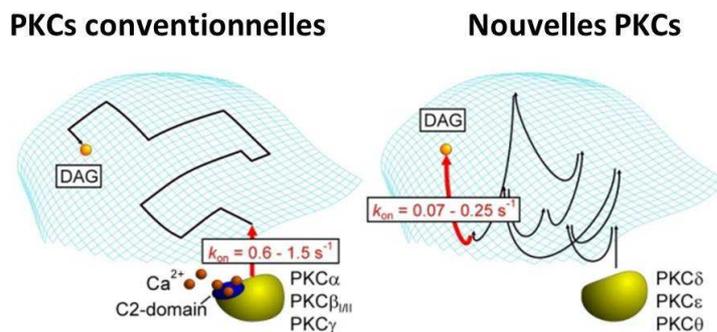


Figure 13. Schématisation de la translocation membranaire des PKCs.

Du fait d'une interaction entre le domaine C2 des cPKCs et le PIP2 grâce au calcium, leur constante d'association avec la membrane plasmique est supérieure à celles des nPKCs. Les cPKCs se déplacent ensuite en deux dimensions pour interagir avec une molécule de DAG. En revanche, les

nPKCs ne sont pas pré-ciblés à la membrane et doivent subir de nombreux événements de collision membranaire avant de frapper une molécule de DAG. Modélisation basée sur des mesures d'imagerie confocale après stimulation agoniste de fibroblastes exprimant des PKCs avec un tag fluorescent. Modifié d'après http://www.uni-leipzig.de/~pharma/main/research/schaefer/PKC_translocation.html/. k_{on} : constante d'association.

Domaine C1. En interagissant avec le DAG, le domaine C1 est le principal médiateur de l'ancrage membranaire des PKCs. Les nPKCs répondent à la production de DAG sans pré-ciblage à la membrane dépendant du calcium, car l'affinité du domaine C1 des nPKCs pour le DAG est deux fois plus importante que celle du domaine C1 des cPKCs (Newton, 2010) (**figure 13**). Le domaine C1 reconnaît également les PLs anioniques, avec une sélectivité marquée pour la PS (Johnson *et al*, 2000). Les PLs anioniques permettraient d'améliorer l'accessibilité du domaine C1 au DAG membranaire (Stahelin *et al*, 2005). Il reste à déterminer à quel degré l'activité PKC pourrait être modifiée par ces co-facteurs lipidiques.

C. Co-facteurs lipidiques et régulation spatio-temporelle des PKCs

Les différences d'affinités intrinsèques et la sélectivité des domaines régulateurs C1 et C2 contrôlent, en partie, le niveau, l'amplitude, la durée et la localisation de la signalisation des PKCs (Gallegos & Newton, 2008).

La régulation de la localisation en fonction de l'affinité des domaines régulateurs pour les facteurs lipidiques est illustrée par le laboratoire de Newton. Alors que la PKC α transloque majoritairement à la membrane plasmique après stimulation agoniste, l'introduction d'une mutation dans le domaine C2 inhibant l'interaction avec le calcium, et par conséquent avec le PIP2, induit un changement de localisation membranaire de la PKC α . Après stimulation agoniste, la PKC α mutée transloque au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (Scott *et*

al, 2013). De la même manière, la grande affinité du domaine C1 des nPKCs pour le DAG module leurs localisations cellulaires. L'appareil de Golgi dont les membranes sont riches en DAG est le site majeur de l'activité des nPKCs (Giorgione *et al*, 2006; Gallegos & Newton, 2008).

La durée et l'amplitude de la signalisation PKC ont été explorées grâce à une technologie basée sur le transfert d'énergie par résonance Förster (FRET). La construction de rapporteurs de l'activité PKC a permis à l'équipe de Newton de visualiser l'activité des PKCs à des localisations spécifiques en temps réel sur des cellules vivantes. Ainsi, une stimulation agoniste déclenche une activité PKC rapide et aiguë au niveau de la membrane plasmique suivie d'une activité soutenue au niveau du Golgi (Gallegos *et al*, 2006). De plus, ils ont montré que la durée de l'activité PKC, à ces deux localisations, est associée à la persistance locale du niveau de DAG membranaire. La métabolisation rapide du DAG à la membrane plasmique engendre une réponse PKC aiguë et transitoire alors que la persistance du DAG à la membrane de l'appareil de Golgi provoque une activité PKC soutenue (**figure 14**).

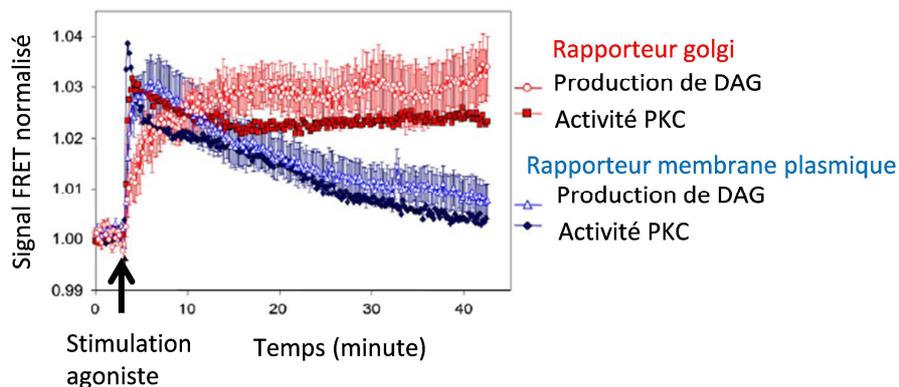


Figure 14. La persistance de l'activité locale des PKCs suit la persistance du DAG.

Des cellules COS-7 sont transfectées avec le rapporteur de l'activité PKC ou les rapporteurs de la production de DAG et traitées avec de l'UTP. L'UTP stimule un récepteur couplé à des protéines G, déclenche une activité phospholipase et une activité PKC. Enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales, les signaux FRET reflétant la production de DAG et l'activité des PKCs ont été regroupés sur un même graphique pour mettre évidence la corrélation temporelle entre DAG et activité PKC. Modifié d'après Gallegos et al. 2006.

L'ensemble des données du laboratoire de Newton suggère que les cPKCs seraient impliquées dans une réponse transitoire et rapide, réponse associée au turnover du DAG à la membrane plasmique. A l'opposé, la réponse des nPKCs serait plus soutenue, à l'image de la production du DAG au niveau de l'appareil de Golgi (Gallegos & Newton, 2008).

D. Localisation subcellulaire par interaction protéine-protéine

Une stimulation agoniste induit la translocation des PKCs dans plusieurs compartiments intracellulaires comme les endosomes, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la mitochondrie, le noyau et des éléments du cytosquelette (Steinberg, 2008; Rosse *et al*, 2010). Les isoformes de PKC transloquent spécifiquement aux différents sites intracellulaires où elles y exercent des effets biologiques distincts (Kazi *et al*, 2009).

Les interactions des PKCs avec des protéines d'ancrage participent à la spécificité de la signalisation en permettant le rapprochement physique entre les PKCs et des substrats spécifiques. L'augmentation de l'expression des PKCs n'est pas systématiquement associée à l'augmentation de la phosphorylation de leurs substrats. Les protéines d'échafaudage joueraient un rôle important dans les fonctions des PKCs (Mochly-Rosen *et al*, 2012; Hoque *et al*, 2014).

L'importance des protéines d'échafaudage/d'ancrage dans la localisation et la spécificité des PKCs a été soulignée pour la première fois dans les années 1990 par le laboratoire de Mochly-Rosen. Plusieurs protéines structurellement différentes ont été identifiées pour leurs capacités à se lier aux PKCs et regroupées sous le terme générique de « RACKs » pour récepteurs de protéines kinases C actives (Mochly-Rosen *et al*, 1991). Il a été proposé que l'interaction avec les RACKs puisse piéger les kinases dans une conformation ouverte et donc contribuer à les maintenir dans un état actif.

Aujourd'hui, la liste des protéines d'échafaudage/d'ancrage interagissant avec les PKCs ne cesse de croître (RACKs, AKAPs « A-kinase anchoring proteins », 14-3-3, HSPs, importines, annexines) et ajoute des niveaux de complexité supplémentaires à la régulation spatio-temporelle de la signalisation PKC (Hoque *et al*, 2014). En effet, des mécanismes additionnels exercés par ces nouvelles protéines d'échafaudages ont été mis en évidence. Premièrement, les interactions seraient spécifiques à chaque isoenzyme et aux différentes conformations de PKCs (actives ou non), dépendantes du stimulus et du type cellulaire. Deuxièmement, certaines protéines d'échafaudages peuvent interagir avec d'autres partenaires que les PKCs et permettraient ainsi de stabiliser des complexes multi-protéiques, de délivrer et de connecter les PKCs à de multiples substrats (Hoque *et al*, 2014).

Localisation nucléaire. Après stimulation agoniste et dans des modèles cellulaires variés, une localisation nucléaire a déjà été observée pour toutes les isoformes de PKCs (Martelli *et al*, 2003). Une localisation péri-nucléaire serait contrôlée par une production

locale de DAG et par des protéines d'échafaudage (e. g. importin- α) (Hoque *et al*, 2014). L'identification de substrats exclusivement nucléaires (e.g. histone H1, ADN topoisomérase I) a levé la controverse sur la localisation intra-nucléaire des PKCs, alors que la présence d'une séquence de localisation nucléaire sur ces kinases n'est pas encore élucidée (Martelli *et al*, 2006). L'activité nucléaire des PKCs serait hautement dépendante de leur statut de phosphorylation. En effet, suite à une stimulation phorbol ester, l'activité PKC nucléaire n'est détectable qu'en présence d'un inhibiteur de phosphatase (Gallegos *et al*, 2006).

Paradoxalement, la relevance biologique de cette localisation est peu étudié et reste très mal comprise. Les PKCs permettrait de réguler l'activité de protéines nucléaires (e.g. ADN topoisomérase, lamine) et de facteurs de transcription (e.g. c-Rel 1) (Martelli *et al*, 2006; Garg *et al*, 2013b). La signalisation PKC nucléaire serait impliquée dans la régulation de l'expression génique contrôlant des grandes fonctions biologiques comme l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Martelli *et al*, 2006).

E. Régulation négative des PKCs.

Classiquement, la signalisation PKC prend fin par la métabolisation du DAG et par l'internalisation et la dégradation des récepteurs dont les activités sont liées aux PLCs. La voie de dégradation des PKCs dépend, en partie, de son activateur. Un traitement prolongé ou répété avec des activateurs irréversibles et non physiologiques des PKCs (e. g. phorbol ester, bryostatine) provoque la dégradation des PKCs actives et phosphorylées de manière dépendante du protéasome (Blumberg, 1980; Lee *et al*, 1997; Leontieva & Black, 2004).

Suite à une stimulation physiologique, les PKCs sont spécifiquement déphosphorylées par l'action de phosphatases. La conformation ouverte des PKCs recrutées à la membrane y est sensible alors que la conformation fermée post-maturation des PKCs est résistante à l'action des phosphatases. L'étude de Gao *et al*. identifie les PHLPPs (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase), déjà connues pour déphosphoryler le résidu serine 473 d'Akt, comme responsable de la déphosphorylation du motif hydrophobe des PKCs. De plus, les auteurs montrent que l'expression de ces phosphatases est inversement corrélé au niveau d'expression des PKCs ce qui suggère que les PHLPPs contrôlent le niveau cellulaire des PKCs (Gao *et al*, 2008).

Après déphosphorylation, les PKCs peuvent être dégradées par la voie classique ubiquitine-protéasome ou par protéolyse de manière indépendante du protéasome (Chen *et al*, 2007).

3. PKCs et cancer du sein

L'hypothèse d'une association positive entre PKCs et cancer du sein est basée sur plusieurs études montrant que: i) l'activité enzymatique des PKC est plus élevée dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus mammaires sains (O'Brian *et al.*, 1989; Gordge *et al.*, 1996), ii) un traitement long-terme avec des phorbol esters induit une régulation négative des PKCs et une inhibition de la croissance cellulaire dans différents modèles cellulaires (Davidson & Kennedy, 1996) et que iii) le statut hormonal des tumeurs, facteur de bon pronostic, est inversement associé à l'expression et/ou à l'activité PKC (Davidson & Kennedy, 1996).

L'exploration des fonctions individuelles des PKCs tend à confirmer l'hypothèse du rôle oncogénique exercé par cette famille de kinases. Cependant, compte tenu des interconnexions entre PKCs, les différentes approches de surexpression ou d'extinction utilisées pour étudier le rôle spécifique d'une isoenzyme doivent être interprétées avec précaution (Steinberg, 2008). Les isoformes α , β , ϵ et δ sont les plus étudiées et les mieux caractérisées dans le contexte du cancer du sein.

A. Fonctions spécifiques aux isoformes α , β , ϵ et δ

PKC α . La littérature s'accorde à attribuer un lien entre l'expression de la PKC α et la progression des cancers mammaires. Tous types histologiques confondus, l'expression de la PKC α est corrélée à un mauvais pronostic et une mauvaise survie dans les cancers du sein (Lønne *et al.*, 2010). La surexpression de cette isoforme dans la lignée cellulaire MCF-7 augmente la prolifération et le potentiel tumorigénique des cellules dans un modèle de xénogreffe (Ways *et al.*, 1995). Le rôle pro-prolifératif de la PKC α dans cette lignée est attribué à l'activation de ERK (Gupta *et al.*, 1996). De plus, la PKC α a récemment été identifiée comme essentielle pour la survie des cellules présentant un phénotype de cellules souches cancéreuses mammaires, après transition épithélio-mésenchymateuse (Tam *et al.*, 2014).

PKC β . Deux études de surexpression ont exploré la fonction des PKCs β I et β II dans des modèles cellulaires différents et concluent à des rôles contradictoires. Dans une lignée dérivée d'un carcinome mammaire murin, la surexpression de la PKC β I provoque une diminution de la croissance tumorale dans un modèle de greffe syngénique (Grossoni *et al.*, 2009). En revanche, la surexpression des isoformes β I et β II dans la lignée cancéreuse

humaine (MCF-7) conduit à une augmentation de la cycline D1 et stimule la croissance tumorale (Li & Weinstein, 2006). Par ailleurs, la PKC β semble être un médiateur essentiel de la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF (Xia *et al*, 1996).

PKC ϵ . L'augmentation de l'expression de la PKC ϵ est associée au grade tumoral, à l'expression de HER2 et à une mauvaise survie (Pan *et al*, 2005). La PKC ϵ exerce des fonctions oncogéniques : sa surexpression induit la transformation de fibroblastes (Cacace *et al*, 1996) et lève l'inhibition de contact des cellules mammaires MCF10-A non tumorale (Dann *et al*, 2014).

Son extinction dans la lignée cancéreuse humaine MDA-MB-231 confère aux cellules un phénotype moins agressif avec une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion (Pan *et al*, 2005). La PKC ϵ peut également protéger les cellules cancéreuses mammaires de l'apoptose. Par exemple, la PKC ϵ participe à l'activation d'Akt via DNA-PK et protège les cellules MCF-7 de l'apoptose induite par le TNF α (« tumor necrosis factor ») (Lu *et al*, 2006).

De plus, cette isoforme est, d'une manière générale, associée à la chimiorésistance. Par exemple, sa surexpression dans un modèle cellulaire de cancer pulmonaire induit une chimiorésistance à la doxorubicine et à l'étoposide (Ding *et al*, 2002). De plus, dans un modèle cellulaire de mélanome, l'inhibition de la PKC ϵ augmente l'apoptose induite par le docétaxel (Mhaidat *et al*, 2007a).

PKC δ La PKC δ exerce des fonctions contradictoires les modèles modèles de cancer mammaire étudiés. Cette isoforme, dont la régulation est quelque peu atypique par rapport aux autres PKCs (maturation et domaine C2), semble avoir des fonctions antagonistes en fonction du stimulus et du contexte cellulaire. L'extinction de la PKC δ conduit à l'apoptose des cellules MDA-MB-231 (Lønne *et al*, 2009). Dans un modèle de lignée mammaire murine, la surexpression de la PKC δ inhibe l'apoptose induite par une privation de sérum (Grossoni *et al*, 2007). Ces données soulignent la fonction pro-survie de la PKC δ alors que cette isoforme a aussi été décrite pour induire l'apoptose (pour revue Kang, 2014).

La PKC δ peut également agir comme un signal prolifératif. Sa surexpression induit la prolifération de cellules mammaires murines via l'activation de ERK1/2 (Grossoni *et al*, 2007). Plus récemment, une étude met en évidence le rôle essentiel de la PKC δ dans la prolifération et la tumorigénèse dépendante de la signalisation HER2 (Allen-Petersen *et al*, 2014).

B. Les PKCs en clinique

Dans le contexte du cancer du sein, plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours (**tableau 1**). Les composés testés sont des inhibiteurs de l'activité PKC: un oligonucléotide anti-sens ciblant spécifiquement la PKC α et l'enzastaurine, un inhibiteur de l'activité kinase des PKCs.

Identification	Drogue	Administration	Patients	Résultats
NCT00003236 (1)	ISIS 3521	Monothérapie	MBCs réfractaires à la chimiothérapie ^a	Non disponibles
NCT00386087 (2)	Enzastaurin	Monothérapie	MBCs après chimiothérapie ^a	Bien toléré, pas d'activité anti-tumorale
NCT00451555 (3)	Enzastaurin	Comb. fulvestrant	MBCs résistants aux anti-aromatase	En cours
NCT00437294 (4)	Enzastaurin	Comb. capecitabine	MBCs ou BCs récurrents après chimiothérapie ^a	Toxicité de grade \geq 3 plus fréquente, pas de bénéfice PFS
NCT00536939 (5)	Enzastaurin	Comb. paclitaxel, bevacizumab	MBCs ou BCs récurrents	Non disponibles

^a : Protocole de chimiothérapie basé sur une anthracycline ou un taxane

Tableau 1. Essais cliniques de phase II testant des inhibiteurs de PKCs.

1_ISIS-3521 (ou aprinocarsen) est un oligonucléotide anti-sens ciblant spécifiquement la PKC α . 2_(Mina *et al*, 2009). 3_Efficacité d'une association fulvestrant plus enzastaurine versus fulvestrant plus placebo. Le fulvestrant est un antagoniste compétitif des récepteurs aux œstrogènes. 4_Efficacité d'une combinaison capecitabine (fluoropyrimidine) plus enzastaurin versus capecitabine plus placebo. L'étude conclue à une combinaison inadéquate (Clemons *et al*, 2010). 5_ Efficacité d'une association paclitaxel, bevacizumab plus enzastaurine versus paclitaxel, bevacizumab plus placebo. D'après <https://clinicaltrials.gov/>. Comb : combinaison, PFS : survie sans progression, MBC : cancer du sein métastatique, BC : cancer du sein.

D'une manière plus générale, les essais cliniques testant l'efficacité d'un agent unique ciblant les PKCs ont été décevants (Mochly-Rosen *et al*, 2012). Deux problèmes majeurs sont soulevés : la pleiotropie des PKCs et le manque de spécificité des agents testés. En effet, à l'origine décrit comme un inhibiteur sélectif des isoformes β , l'enzastaurine inhibe l'activité globale des PKCs aux doses utilisées dans les modèles pré-cliniques et cliniques (Graff *et al*, 2005; Ma & Rosen, 2007). L'étude de Mina *et al*. conclut à la bonne tolérance de l'enzastaurine en tant qu'agent unique et permet donc d'envisager son utilisation en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles (Mina *et al*, 2009). Cependant, la

combinaison enzastarin/capecitabine augmente la fréquence des toxicités non hématologiques de grade $\frac{3}{4}$.

La stratégie combinatoire (cytotoxique/inhibiteur de PKC) pourrait s'avérer intéressante au vue de la contribution de certaines isoformes de PKCs dans les mécanismes de chimiorésistance.

C. Un rôle suppresseur de tumeur ?

Le dogme qui associe les PKCs à un effet pro-tumoral a récemment été mis à mal. Publiée dans « Cell », une étude conduite par le laboratoire de Newton montre de manière surprenante que la majorité des mutations présentes sur les neuf gènes PKCs résulte d'une perte de fonctions et aucune mutation n'est activatrice (Antal *et al*, 2015). 8 % des mutations identifiées sur les gènes PKCs dans les cancers humains ont été analysés. Cette étude suggère que les PKCs fonctionnent, de manière générale, comme suppresseurs de tumeurs. Les auteurs concluent logiquement que les stratégies thérapeutiques devraient se réorienter vers la restauration et non l'inhibition de l'activité PKC.

Des analyses bio-informatiques supplémentaires suggèrent que les mutations provoquant des pertes de fonctions des gènes PKCs ne seraient pas des événements initiateurs mais des co-événements participant à la progression tumorale. Par ailleurs, les auteurs minimisent leurs conclusions pour les cancers mammaires et ovariens. En effet, ces deux types de cancer présentent peu de mutations des gènes PKCs et un fort taux d'amplification de ces gènes ce qui suggère que les mutations perte de fonctions, dans ce contexte, auraient un rôle moins important ou différent (Antal *et al*, 2015).

Encadré 2. Points clés du chapitre « PKC, famille de kinases sensible aux lipides »

- ✓ Les PKCs sont une grande famille de sérine/thréonine kinases ayant un rôle important dans la transduction du signal.
- ✓ La translocation membranaire des PKCs est associée leur activation
- ✓ L'activation des nPKCs est dépendante du DAG et des PL anioniques (PA, PS, PI).
- ✓ Alors que la PKC ϵ est particulièrement associée à des fonctions oncogéniques et à la chimiorésistance, la PKC δ semble exercer des fonctions très dépendantes du contexte cellulaire.

Chapitre 3. Signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt

La coordination et la régulation des voies de signalisation intracellulaires sont des processus clés pour l'homéostasie cellulaire. La durée, l'amplitude et la localisation du signal ainsi que les interconnexions entre voies de signalisation permettent une réponse cellulaire spécifique au signal activateur et/ou au contexte cellulaire.

Si une vision linéaire et cloisonnée des voies de signalisation est plus facile à comprendre et à décrire, cette vue ne reflète en rien la réalité. En effet, l'information transmise initialement au niveau de la membrane plasmique par des interactions lipides-protéines puis par des cascades de phosphorylations via des interactions protéines-protéines est continuellement soumise à régulation. Les multiples composants des voies de signalisation fournissent un support pour l'amplification du signal, des boucles de rétrocontrôles et des interconnexions.

Cette complexité confère un avantage aux cellules cancéreuses dans lesquels les voies de signalisation peuvent être dérégulées à de multiples niveaux et de manière combinatoire. La connaissance des perturbations des voies de signalisation dans les cancers a permis l'émergence de thérapeutiques ciblées (par exemple, le ciblage de HER2). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ciblant des protéines de signalisation au milieu de la voie (e.g. MEK, mTORC1) a révélé la complexité du réseau de transduction du signal qui offre des possibilités d'adaptation. Ainsi, il est fréquent d'observer une bascule sur des voies de signalisation alternatives et l'émergence de clones cellulaires résistants aux thérapies.

La caractérisation génomique des cancers du sein a permis d'identifier des mutations somatiques clés qui convergent vers quelques voies de signalisation dont les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK1/2 (Polyak & Metzger Filho, 2012). La dérégulation de ces voies contribue, entre autre, à la prolifération et à la survie des cellules cancéreuses. De plus, l'activation anormale de ces voies contribue à des mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux (McCubrey *et al*, 2006).

Ce troisième chapitre décrira la vue classique des voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt. Puis, la spécificité du signal sera abordée en intégrant les notions de durée, d'amplitude et de localisation.

1. Vue d'ensemble de la voie MAPK/ERK1/2

Sources : (Plotnikov *et al*, 2011; Cargnello & Roux, 2011)

De nombreux facteurs hydrosolubles, comme les facteurs de croissance de la famille EGF, le PDGF (platelet-derived growth factor), les membres de la famille FGF (fibroblast growth factor), ou encore l'insuline activent la voie MAPK/ERK1/2 après liaison avec leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).

La voie MAPK/ERK1/2 peut aussi être activée, de manière indirecte dépendante ou non des RTKs, par des ligands de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) (Wetzker & Böhmer, 2003). De nombreux autres signaux peuvent activer cette voie comme, par exemple, les intégrines et une désorganisation du cytosquelette, ceci via l'activation de kinases intermédiaires (e.g. Src « sarcoma kinase », PAK « p21 activated kinase ») pouvant interagir avec la voie ERK1/2 (**figure 15C**).

A. Description de la cascade d'activation de la voie MAPK/ERK1/2

Ce paragraphe décrit la voie conventionnelle de l'activation de ERK1/2, initiée par la liaison d'un ligand à un RTK. Cette interaction induit l'activité tyrosine kinase du récepteur et engendre des événements intracellulaires en cascade, principalement des phosphorylations activatrices de protéines kinases qui vont transduire le signal.

La voie la mieux caractérisée fait intervenir Ras, une GTPase appartenant à la famille des petites protéines G monomériques, localisée à la membrane plasmique. Ras se présente soit sous forme active liée au GTP, soit sous une forme inactive liée au GDP. L'activation de Ras est stimulée par les facteurs d'échange de nucléotide guanine, les GEFs (e. g. SOS pour « Son of sevenless », Ras-GRP pour « guanine releasing factor »). Les GEFs contrôlent l'activation de Ras en réponse à l'activation de RTK en amont. Les protéines Ras sont des enzymes capables d'hydrolyser le GTP. Cependant, cette activité relativement faible doit être stimulée par une autre classe de modulateurs, les GAPs (« GTPases-activating protein ») pour que l'hydrolyse soit efficace. Ces dernières vont ainsi prévenir une activation prolongée de Ras (**figure 15A**).

Ras-GTP participe au recrutement et à l'activation des MAPKKK de la famille Raf (A-Raf, B-Raf et C-Raf), kinases à l'origine de l'activation du module MEK1/2-ERK1/2. Le mécanisme d'activation de Raf est très complexe et n'est pas encore complètement élucidé

(Lavoie & Therrien, 2015). En plus du recrutement membranaire par interaction directe avec Ras-GTP, son activation catalytique nécessite des phosphorylations (**figure 15B**). Par exemple, les PKCs sont connus pour phosphoryler Raf (Kolch *et al*, 1993; Ueda *et al*, 1996; Schönwasser *et al*, 1998). Ainsi, une stimulation par des phorbols ester (PMA), puissant activateur des PKCs, active la voie MAPK/ERK1/2 et stimule la synthèse d'ADN (Jiang & Huitu, 1999). Cependant, la régulation de Raf par des phosphorylations activatrices et inhibitrices reste complexe.

Une fois activé, Raf phosphoryle et active les MAPKK, MEK1 et MEK2 (« mitogen extracellular signal-regulated kinase 1/2 »), respectivement sur les résidus ser218/ser222 et ser222/ser226. Dans des conditions de stress cellulaire, MEK1 et MEK2 peuvent être activées par d'autres MAPKKK que Raf comme TPL2 (« tumor progression locus 2 ») et MEKK1 (MEK kinase 1). Notons que malgré leur forte homologie, des études suggèrent que MEK1 et MEK2 contribuent de manière différente à la régulation de l'activation de ERK1/2, ce qui pourrait contribuer à des effets biologiques distincts (Ussar & Voss, 2004; Zhou *et al*, 2010).

ERK1 et ERK2 sont les seuls substrats identifiés de MEK1/2 qui catalysent leur activation par la phosphorylation des résidus thr202/tyr204 (ERK1) et thr185/tyr187 (ERK2). Très récemment, une étude conduite par le laboratoire de Méloche suggère la redondance des fonctions de ERK1 et de ERK2 (Frémin *et al*, 2015).

Après activation, les kinases ERK1/2 catalysent la phosphorylation de très nombreux substrats (e.g. facteurs de transcription, kinases et phosphatases, protéines du cytosquelette). Alors que certains de ces substrats sont localisés dans le cytoplasme ou au niveau d'organites intracellulaires, d'autres sont phosphorylés dans le noyaux après translocation de ERK1/2. ERK1/2 active notamment certains facteurs de transcription comme Ets1/2, c-Myc, c-Jun qui sont impliqués dans l'initiation et la régulation de la prolifération et dans la transformation oncogénique (Shaul & Seger, 2007). En outre, ERK1/2 peut transmettre le signal en phosphorylant et en activant des MAPKAKP (« MAPK-activated protein kinase »), qui, comme leur nom l'indique, sont des kinases activées par ERK1/2. La principale kinase activée par ERK1/2 est p90RSK (« p90 ribosomal S6 kinase ») qui possède sa propre spécificité de substrat cytoplasmique (e.g. IKB α) et nucléaire (e.g. CREB « cAMP response element-binding protein » et c-Fos). Les conséquences biologiques de l'activation de cette voie et l'orientation de la spécificité de la réponse cellulaire seront discutées dans les paragraphes suivants.

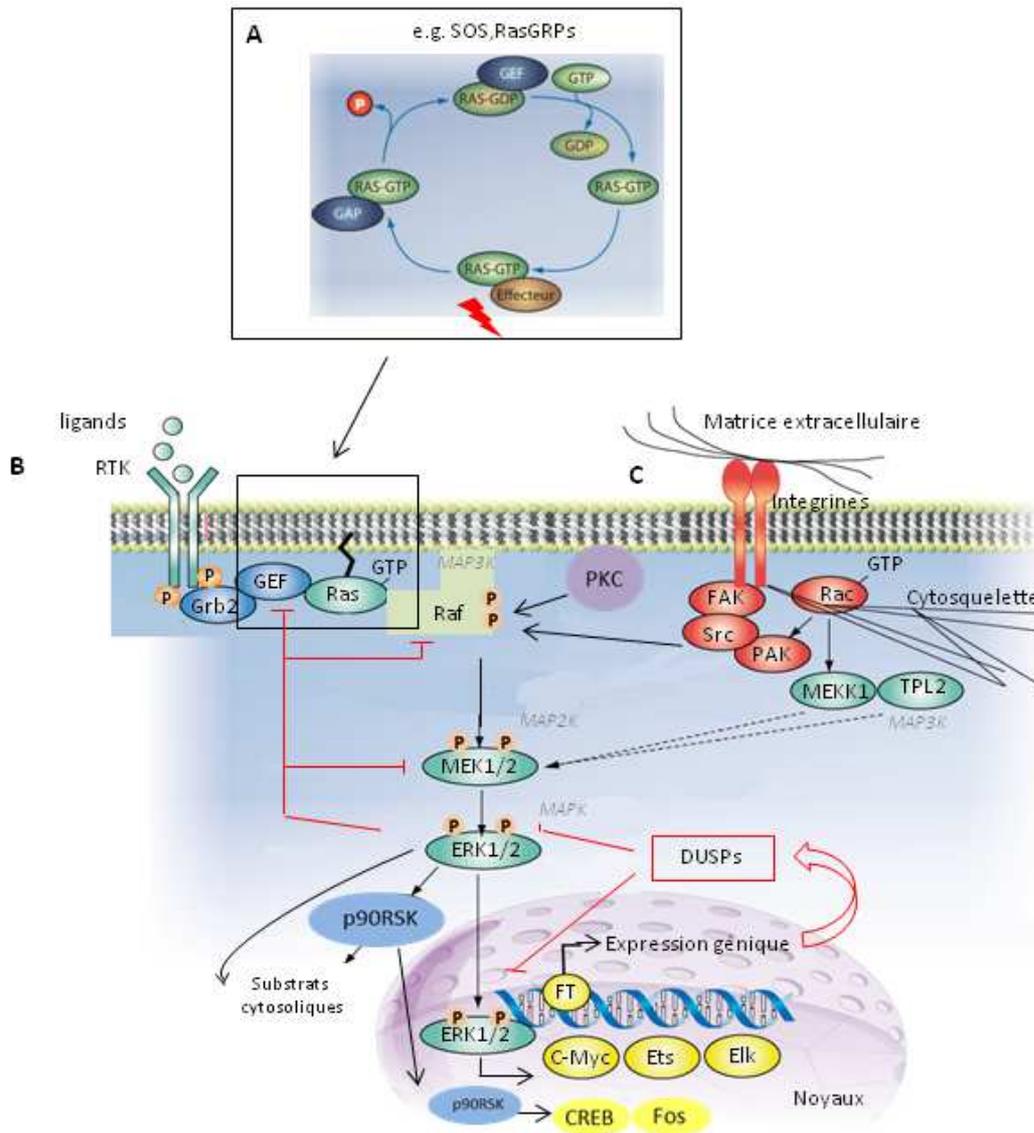


Figure 15. Représentation schématique de la voie MAPK/ ERK1/2.

A_Cycle d'activation des protéines Ras. **B**_Cascade d'activation de la voie MAP kinase ERK1/2. La liaison d'un facteur de croissance sur un récepteur à activité tyrosine kinase provoque son activation : homo- ou hétéro-dimérisation et autophosphorylation de résidus tyrosines dans la partie C-terminale intracellulaire. Ces résidus phosphorylés servent de site d'amarrage pour des protéines adaptatrices comme Grb2. Une cascade de phosphorylations est initiée et aboutit à l'activation de ERK1 et de ERK2. Les cibles de ERK1/2 sont cytoplasmiques et/ou nucléaires. Les rétrocontrôles négatifs sur la voie sont indiqués en rouge. **C**_Signaux parallèles pouvant moduler l'activation de la voie ERK1/2. Modifié d'après (Reiffers & Viens, 2011). RTK : récepteur tyrosine kinase, Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2, SOS : son of sevenless, GEF: guanine exchange facteur, GRP: guanine releasing protein, GDP: guanosine diphosphate, GTP: guanosine triphosphate, Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma, MEK: Mitogen-Extracellular signal-regulated kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, PKC: protéine kinase C, FAK: focal adhesion kinase, Src: sarcoma kinase, PAK: p21 activated kinase, Rac.

B. Inactivation du signal MAPK/ERK1/2

En réponse à l'activation de ERK1/2, les signaux activateurs en amont sont régulés par des rétrocontrôles négatifs. Ces boucles de régulation homéostasiques permettent un fin contrôle de l'amplitude et de la durée d'activation du signal ERK1/2 et contribuent à la spécificité de la réponse cellulaire (voir 4. Régulation spatio-temporelle et spécificité du signal).

Les phosphorylations inhibitrices de MEK1, C-Raf, B-Raf, SOS et certains RTKs par ERK1/2 ou p90RSK traduisent des rétrocontrôles négatifs directs et rapides pour bloquer la propagation du signal (Kamioka *et al*, 2010; Caunt *et al*, 2015) (**figure 15B**). De même, la déphosphorylation de ERK1/2 par des phosphatases présentes de manière constitutive (e.g. PP2A, protéine phosphatase 2) serait un moyen rapide d'inhiber le signal (Alessi *et al*, 1995).

L'expression *de novo* de protéines inhibitrices de la signalisation MAPK/ERK1/2, induite par l'activité nucléaire de ERK1/2 (e.g phosphatases) est un autre mécanisme de rétrocontrôle négatif physiologique. Logiquement, ce mécanisme de régulation serait impliqué dans l'inhibition tardive de la voie puisqu'il exige une néo-synthèse protéique de protéines inhibitrices.

Les DUSPs pour « dual-specificity phosphatases » (ou MKPs pour MAPK phosphatases) font parties des gènes transcrits suite à l'activation de ERK1/2 (**figure 15B**). Ce sont des sérines/thréonines phosphatases membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires qui permettent d'inhiber le signal d'activation dans des compartiments subcellulaires précis. Le rôle précis de chacune des DUSPs *in vivo* n'est pas encore clair. En effet, les mécanismes de co-régulations entre MAPK et DUSPs dépassent la simple activation transcriptionnelle et, en retour, l'inhibition de ERK1/2 par déphosphorylation. Par exemple, ERK1/2 phosphoryle les DUSPs et augmente ainsi leur stabilité et leur activité catalytique (Huang & Tan, 2012). La spécificité des DUSPs pour les différentes MAPKs est controversée, les études *in vivo* et *in vitro* étant discordantes (Huang & Tan, 2012). L'isoforme DUSP6/MKP3 cytosolique serait spécifique de ERK1/2. Les isoformes nucléaires DUSP1/MKP1 et DUSP4/MKP2 déphosphorylerait ERK1/2 mais également les autres MAPKs, JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 (Ducruet *et al*, 2005), apportant une possibilité d'interconnexion avec les autres voies MAPKs.

2. Vue d'ensemble de la signalisation PI3K/Akt

A. Description de la cascade d'activation de la voie PI3K/Akt

Sources : (Castellano & Downward, 2011; Fruman & Rommel, 2014; Engelman, 2009)

Conventionnellement, la cascade de signalisation réalisée par Akt est initiée par la kinase PI3K. Les kinases PI3Ks sont activées en aval d'une interaction ligand/récepteur (RTK, GPCR, récepteur des cytokines, intégrines). Il existe trois grandes classes de PI3Ks (I, II et III) composées de différents sous-groupes. La classe IA est la mieux caractérisée à cause de son implication dans le processus oncogénique (le terme PI3K s'y réferra ci-après). Ce sous-groupe de kinases est composé d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85. (**figure 16**). Trois mécanismes menant à l'activation de PI3K ont été décrits : i) une interaction directe entre la sous-unité régulatrice p85 et un RTK phosphorylé, ii) une interaction indirecte entre p85 et un RTK via des protéines adaptatrices (e. g. Grb2, Insulin receptor substrat-1) et iii) une activation de p110 via Ras. Ces événements d'interaction induisent le relâchement de l'auto-inhibition de PI3K et son activation catalytique.

A partir du PI(4,5)P₂, PI3K catalyse la production de PI(3,4,5)P₃ qui sert de second messager pour le recrutement membranaire des kinases Akt et PDK1 (« phosphoinositide-dependent kinase 1 ») (**figure 16**). Le recrutement membranaire d'Akt (interaction du domaine PH, « pleckstrin homology », avec le PIP₃ membranaire) permet son changement de conformation et facilite les événements de phosphorylations activateurs.

Deux événements de phosphorylations majeurs sont nécessaires à l'activation maximale d'Akt. PDK1 phosphoryle le résidu thréonine 308 d'Akt. La kinase responsable de la phosphorylation du résidu serine 473 a longtemps été inconnue et désignée par le terme générique « PDK2 » (phosphoinositide-dependent kinase-2). En 2005, le complexe multi-protéique mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) est identifié comme responsable de cette phosphorylation (Sarbasov *et al*, 2005). Cependant, le mécanisme d'activation de mTORC2 n'est pas encore complètement élucidé. Il nécessiterait la présence de PIP₃ (Gan *et al*, 2011) et d'acide phosphatidique (PA) (Toschi *et al*, 2009) (**figure 16**).

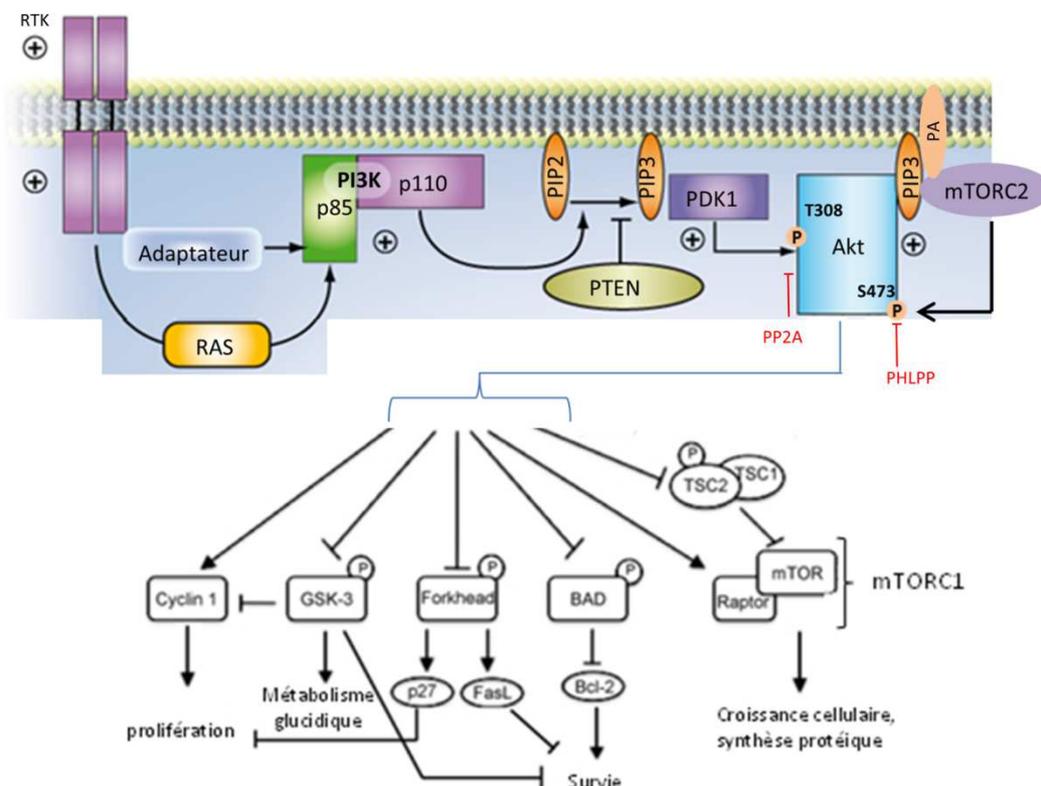


Figure 16. Représentation schématique de la voie PI3K/Akt.

Les PI3Ks sont activées suite à une interaction ligand/récepteur, de manière dépendante ou indépendante de Ras. Le PIP3 permet le recrutement membranaire d'Akt et de PDK1. Akt est activé des phosphorylations dépendantes de PDK1 et du complexe multiprotéique mTORC2. PP2A et PHLPP déphosphorylent les sites de phosphorylations activateurs d'Akt. PTEN déphosphoryle le PIP3 en PIP2 et participe aussi à mettre fin au signal. Les nombreux substrats d'Akt participent à réguler de grands processus cellulaires comme la prolifération, la survie et la croissance cellulaires. Modifié d'après (Castellano & Downward, 2011) et (Reiffers & Viens, 2011). RTK : récepteur tyrosine kinase, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PTEN: phosphatase and tensin homolog, PDK1: phosphoinositide kinase 1, mTORC2/C1: mammalian target of rapamycin complex 2/complex 1, T: threonine, S: serine, GSK3: glycogen synthase kinase 3, TSC1/2:tuberosus sclerosis protein 1/2, PP2A : protéine phosphatase 2A, PHLPP : PH domain and leucin rich repeat protein phosphatase.

Outre ces deux résidus critiques pour l'activation d'Akt, des phosphorylations sur d'autres résidus peuvent modifier le recrutement et/ou l'activité d'Akt (Mahajan & Ma, 2013; Chan *et al*, 2014). Cependant, la manière dont ces phosphorylations additionnelles orchestrent l'activation d'Akt reste obscure. Le profil de phosphorylation d'Akt modulerait sa sélectivité pour tel ou tel substrat (Chan *et al*, 2014).

Akt joue un rôle central de kinase effectrice en activant une multitude de cibles cytoplasmiques et nucléaires, qui, elle-mêmes ont de nombreux substrats. Par exemple, l'activation d'Akt mène à la phosphorylation et l'inactivation de GSK3 (« glycogen synthase

kinase 3 »), de protéines pro-apoptotiques (e.g. Bad) et de facteurs de transcription de la famille Forkhead (e.g. FOXO). La phosphorylation inhibitrice de TSC2 (« tuberous sclerosis 2 ») par Akt mène à l'activation de la signalisation mTORC1. Les conséquences biologiques de l'activation d'Akt ainsi que la redondance et les interconnexions avec la voie MAPK/ERK1/2 seront discutés dans les paragraphes suivants.

Isoformes d'Akt. Il existe trois isoformes d'Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) de séquences hautement similaires et codées par des gènes distincts (Chan *et al*, 2014) Les trois isoformes sont capables de transformer des cellules *in vivo* et semblent donc avoir le même potentiel oncogénique (Mende *et al*, 2001). Akt1 et 2 semblent ubiquitairement exprimés dans un large panel de lignées de cancer du sein. L'expression d'Akt3 paraît restreinte aux lignées présentant un phénotype agressif de type « basal-like » (ou « triple-négatif », e.g. MDA-MB-231) (Iacovides *et al*, 2013), où Akt3 exercerait un rôle spécifique particulièrement important pour la croissance de ce type de tumeur (Rebecca Chin *et al*, 2015).

B. Rétrocontrôles négatifs de la voie PI3K/Akt

Deux grands mécanismes de rétrocontrôles négatifs de la voie PI3K/Akt peuvent être définis : l'action de phosphatases et des boucles de phosphorylation inhibitrice sur les composants de la voie de signalisation.

Régulation négative de la voie PI3K/Akt par déphosphorylation. PTEN (phosphatase and tensin homolog) est considérée comme le principal régulateur négatif de la voie PI3K/Akt en déphosphorylant le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2 (**figure 16**). L'activité de PTEN est modulée par des modifications post-traductionnelles (oxydation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, clivage protéolytique) et par des interactions protéines-protéines. Toutes ces influences peuvent affecter l'activité enzymatique de PTEN directement ou indirectement en modifiant sa conformation, sa stabilité, sa distribution subcellulaire et ses interactions avec les lipides (Song *et al*, 2012). On peut noter que la mutation de cette enzyme, fréquemment retrouvée dans les cancers, contribue au maintien de l'activité de la voie (Saini *et al*, 2013).

De plus, deux phosphatases, PP2A (protéine phosphatase 2A) et PHLPP (« PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase ») déphosphorylent Akt respectivement sur les résidus thr308 et ser473 (Chan *et al*, 2014) (**figure 16**).

Boucles de rétrocontrôle. Mécanistiquement, l'activation de la signalisation mTORC1/p70S6K engendre une régulation négative de la voie PI3K/Akt via la phosphorylation et la dégradation de IRS1 (« insulin receptor substrate») qui interrompt la signalisation entre RTK et PI3K. L'activation de mTORC1/p70S6K diminue aussi l'activité de mTORC2 via la phosphorylation de Rictor (membre du complexe mTORC2) (Fu *et al*, 2013).

3. ERK1/2 et Akt dans la prolifération et la survie cellulaire

La croissance (augmentation de la masse et de la taille cellulaires), la survie et la prolifération sont des fonctions distinctes mais interdépendantes : les cellules ne peuvent pas progresser dans le cycle cellulaire et proliférer sans signaux de survie ni de croissance. Ainsi, les voies de signalisation ERK1/2 et Akt intègrent les signaux et coopèrent pour promouvoir la prolifération cellulaire (Massagué, 2004). Les paragraphes suivants décrivent succinctement les principaux mécanismes impliqués dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire par les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK1/2.

A. Convergence des voies Akt et ERK1/2 dans les signaux de survie

Alors que la voie PI3K/Akt est considérée comme la voie majeure de survie cellulaire, il est aujourd'hui admis que, dans les cellules cancéreuses, les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK1/2 coopèrent pour promouvoir la survie cellulaire. Classiquement, ces signalisations peuvent agir indirectement en modulant l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose et, plus directement, en modulant la stabilité et/ou l'activité de ces protéines par phosphorylation.

Régulation de l'expression génique. Les signalisations Akt et ERK1/2 modulent l'activité de facteurs de transcription et favorise l'expression de protéines anti-apoptotiques et la repression de protéines pro-apoptotiques.

Les facteurs de transcription CREB et NFκB induisent la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL qui favorisent l'intégrité mitochondriale. CREB et NFκB sont activés directement ou indirectement par des phosphorylations dépendantes de p90RSK, substrat direct de ERK1/2 (Balmanno & Cook, 2009; Massagué, 2004). En outre, Akt phosphoryle IκB et promeut la translocation nucléaire de NFκB (Shaw & Cantley, 2006).

Les voies Akt et ERK1/2 coopèrent pour bloquer le facteur de transcription FOXO3A, activant la transcription de gènes pro-apoptotiques (e.g. Bim). Alors que la phosphorylation induite par Akt inhibe sa localisation nucléaire, la phosphorylation induite par ERK1/2 promeut sa dégradation protéasomale (Massagué, 2004; Steelman *et al*, 2011).

Modifications post-traductionnelles. La phosphorylation des protéines impliquées dans le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose (e. g famille Bcl-2) peut perturber leur stabilité, leurs propriétés d'interactions entre elles et/ou leur localisation (Balmanno & Cook, 2009; Mebratu & Tesfaigzi, 2009). Akt est largement connu pour exercer un effet anti-apoptotique direct en ciblant des protéines pro-apoptotiques (e.g. Bad, Bim) par des phosphorylations inhibitrices (Stelman *et al*, 2011). Bim et Bad, facteur pro-apoptotiques peuvent aussi subir des phosphorylations dépendantes de la signalisation ERK1/2. Classiquement ces phosphorylations déclenchent un signal de dégradation et/ou une séquestration cytoplasmique (Balmanno & Cook, 2009; Mebratu & Tesfaigzi, 2009).

Notons que dans certaines conditions, la signalisation ERK1/2 peut également être associée à un effet pro-apoptotique. Ces fonctions pro-apoptotiques ont principalement été mises en évidence dans le système neuronal et en réponse à des dommages à l'ADN (Lu & Xu, 2006).

B. Progression dans le cycle cellulaire

Le signal ERK1/2 est nécessaire pour l'entrée dans le cycle cellulaire et pour la progression jusqu'à la transition G1/S mais, seul, il est insuffisant pour conduire les cellules en phase S. En effet, ce processus nécessite également un signal PI3K/Akt (Jones & Kazlauskas, 2001; Massagué, 2004). Par exemple, la surexpression d'un mutant actif de MEK1 dans des fibroblastes quiescents conduit les cellules en phase S. Cet effet est bloqué par un inhibiteur de PI3K suggérant que l'activation de la voie ERK1/2 induit la synthèse de facteurs de croissance autocrines (Treinies *et al*, 1999).

Une dissection temporelle des signaux nécessaire à l'entrée en phase S de fibroblastes quiescents a été réalisée par Jones et Kazlauskas (Jones & Kazlauskas, 2001). Ils ont montré que l'exposition prolongée à des mitogènes peut être remplacée par deux courtes expositions à des signaux activateurs de la voie ERK1/2 et Akt, et ce, de manière coordonnée dans le temps. L'activation de la voie ERK1/2 (stimulation de 30 min) permet la progression des cellules en

finde phase G1 puis, 8 h après, l'activation de la voie PI3K/Akt est requise pour le passage en phase S (Jones & Kazlauskas, 2001).

Description moléculaire des principaux événements de la progression G1/S (figure 17) (Torii *et al*, 2006; Meloche & Pouysségur, 2007; Massagué, 2004). La signalisation ERK1/2 active la transcription de gènes précoces, dont c-Jun et c-Fos formant l'hétéro-dimère AP-1 et c-Myc. Ces facteurs de transcription concourent à l'expression et à l'accumulation des cyclines D durant la phase G1. La coopération entre le signal ERK1/2 et Akt permet de réguler le niveau de p21 et de p27, inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (Cdk). A une faible concentration, p21 interagit avec le complexe cycline D/cdk4-6 et le stabilise. Un excès de p21 va, en revanche, bloquer la progression du cycle via son action inhibitrice sur le complexe cycline E/cdk2. De manière complémentaire, Akt lève l'effet inhibiteur de GSK3 β sur la cycline D.

D'autres produits de gènes précoces activés par ERK1/2 sont impliqués dans la répression de la transcription de gènes anti-prolifératifs (jusqu'à 175 gènes sont réprimés de manière dépendante de ERK1/2 pendant la phase G1) (Yamamoto *et al*, 2006).

L'ensemble coordonné de ces événements permet de stabiliser le complexe cycline D/cdk-4/6 et d'initier la phosphorylation de la protéine Rb. Cet événement libère le facteur de transcription E2F qui active l'expression de la cycline E nécessaire au passage du point de restriction et à la transition G1/S (**figure 17**).

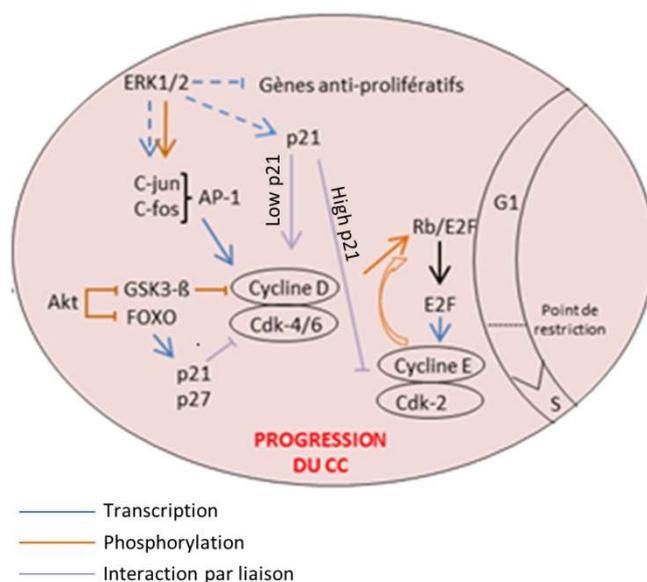


Figure 17. Transition G1/S et coopération entre ERK et Akt.

AP-1 régule la transcription de la cycline D. Les cyclines D forment des complexes avec leurs partenaires catalytiques cdk4 et cdk6 ce qui active leurs activités kinases. La fonction majeure des complexes cyclines D/cdk4-6 est de phosphoryler Rb. La phosphorylation de Rb provoque sa dissociation du facteur de transcription E2F permettant l'expression de gènes clés pour la transition G1/S comme la cycline E. Une deuxième fonction majeure du complexe cycline D/cdk4-6 est de séquestrer p21. L'interaction de p21 avec le complexe cycline D/cdk4-6 le stabilise et empêche l'interaction inhibitrice de p21 avec le complexe cycline E/cdk2. Cette « titration » du niveau de p21 permet de faciliter l'activité de

Cdk2 qui renforce la phosphorylation de Rb et l'activité de E2F nécessaire au passage du point de restriction et à la transition G1/S. Modifié d'après Massagué et al. 2004. Les pointillés représentent des relations indirectes.

ERK: extracellular signal-regulated kinase, FOXO: forkhead box 0, GSK3-β: glycogen synthase kinase 3, AP-1: activator protein 1, Cdk: cyclin dependent kinase, Rb: retinoblastoma.

Transition G2/M et mitose. Les signaux ERK1/2 et Akt ont également été impliqués dans la transition G2/M et dans la mitose des cellules somatiques mais la littérature est controversée. En collaboration avec l'équipe de Puységur, Roberts *et al.* montrent que l'inhibition de MEK retarde, d'une part, l'entrée en mitose et, d'autre part, augmente la durée de la mitose en retardant la transition métaphase/anaphase alors que l'inhibition d'Akt retarde uniquement l'entrée en mitose. Les mécanismes qui ré-activeraient ces signalisations en fin de phase S sont mal compris (Roberts *et al.*, 2002; Chambard *et al.*, 2007). Dans une revue, 6 ans plus tard, la même équipe recommande d'interpréter ces résultats avec précaution en raison des techniques employées. En effet, des expériences de vidéo-microscopie en temps réel ne montrent aucun impact direct de l'inhibition extemporanée de ERK1/2 sur la mitose (Meloche & Pouységur, 2007).

Enfin, l'activité de facteurs de transcription de la famille forkhead (e. g. FOXO), réprimée par le signal Akt, serait requise pour l'achèvement du cycle cellulaire. L'atténuation du signal PI3K/Akt permettrait donc la bonne exécution du cycle cellulaire (transition G2/M, cytokinèse) (Alvarez *et al.*, 2001).

4. Régulation spatio-temporelle et spécificité du signal

Afin d'orienter la cellule vers la réponse biologique appropriée au signal activateur, plusieurs mécanismes apparaissent déterminer la spécificité des voies de signalisation: la durée et l'amplitude de l'activation, la localisation du signal et les interconnexions entre voies de signalisation. Cette partie se concentrera sur la voie MAPK/ERK qui est la voie majeure d'intégration des signaux prolifératifs.

A. Durée et force du signal ERK1/2

Physiologiquement, la stimulation mitogénique de fibroblastes quiescents provoque une activation biphasique de ERK1/2. Après une forte et courte activation, une faible activité kinase persiste jusqu'à la fin de la phase G1. La faible activation prolongée de ERK1/2 est corrélée avec l'expression de la cycline D1 (**figure 18A**).

Une activation transitoire de ERK1/2, sans une faible activité prolongée, ne permet pas l'entrée en phase S (**figure 18B**). Une forte activation prolongée de ERK1/2 provoque l'arrêt

du cycle via l'induction et l'accumulation d'inhibiteurs de cdk (e.g. p21) (**figure 18C**). Ce blocage du cycle engendre une mort cellulaire ou un processus de différenciation en fonction du type cellulaire et du stimulus (Roovers & Assoian, 2000; Meloche & Pouyssegur, 2007). Ainsi, la durée et l'intensité du signal ERK1/2 sont associées à des réponses biologiques différentes. D'autre part, l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par une forte activation prolongée de ERK1/2 peut être levé par l'activation d'Akt (Mirza *et al*, 2004).

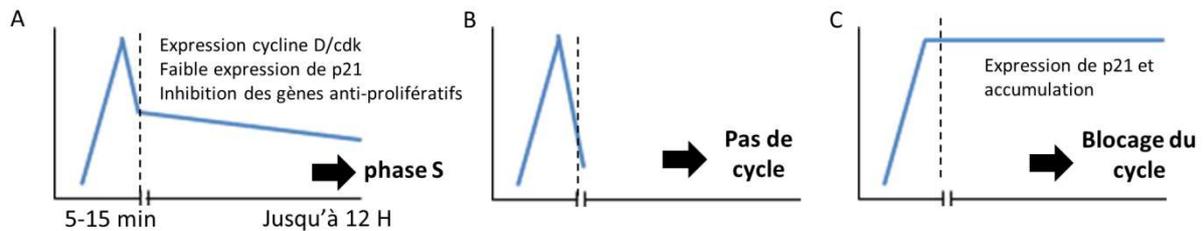


Figure 18. Conséquences biologiques de la durée et de l'intensité du signal ERK1/2.

La durée du signal est donnée à titre indicatif et varie en fonction du type cellulaire. Le répertoire de gènes précoces exprimés en phase G1 est déterminé par la durée d'activation de ERK1/2. Le niveau d'expression de p21 peut être considéré comme un senseur de l'intensité du signal ERK1/2. cdk : cyclin-dépendant kinase.

Comment la cellule interprète-t-elle la durée et l'intensité du signal ? L'étude de Murphy *et al*, en 2002, apporte les premiers éléments de réponse. L'expression des produits des gènes précoces immédiats (e. g. fos, jun, myc) est le résultat direct de l'activation de ERK1/2. Ces protéines fonctionnent comme des capteurs pour interpréter la durée d'activation du signal. Elles interagissent avec ERK1/2 via un domaine DEF (docking domain for ERK1/2). Les phosphorylations stabilisatrices de ces protéines traduites de manière précoce sont nécessaires à leurs activités et dépendantes de l'activité de ERK1/2. L'interprétation de l'intensité du signal n'a pas encore été mise en évidence expérimentalement mais le même type de mécanisme pourrait permettre à la cellule d'interpréter l'intensité du signal ERK1/2 (Murphy & Blenis, 2006).

Les mécanismes permettant de contrôler la durée et l'intensité du signal ERK1/2 sont essentiels pour la physiologie cellulaire. Si certains sont bien définis, il reste difficile de relier tel ou tel mécanisme à une régulation temporelle précise. Considérant que la déphosphorylation de ERK1/2 est suffisante pour son inactivation totale (Alessi *et al*, 1995), de nombreuses phosphatases pourraient être impliquées dans la phase initiale et rapide d'inactivation. Après néo-synthèse, ces phosphatases pourraient être impliquées dans la phase

tardive et plus lente d'inactivation (**figure 18A**). Décrites précédemment, les boucles de rétrocontrôles négatifs par phosphorylation des composants de la voie de signalisation MAPK/ERK (voir 1.Vue d'ensemble de la signalisation MAPK/ERK1/2, paragraphe b) seraient logiquement impliqués dans l'inactivation rapide de ERK1/2.

La cinétique d'activation de ERK1/2 et la présence de mécanismes d'inactivation du signal soulève une question majeure: comment le signal d'activation de ERK1/2 est maintenu dans le temps alors que des phosphatases et des boucles de rétrocontrôle négatifs sont mises en place par la voie elle-même ? Cette question est à l'origine de recherches intensives et plusieurs mécanismes se dégagent de la littérature : i) la densité et le trafic des RTKs (Murphy & Blenis, 2006), ii) la localisation et la régulation de Ras (Yasuda & Kurosaki, 2008; Poltorak *et al*, 2014), iii) Rap1, une protéine G de la famille de Ras (York *et al*, 1998; Sasagawa *et al*, 2005), iv) les différentes isoformes de Raf (Mercer *et al*, 2005; Avraham & Yarden, 2011), v) implication des PKCs (Bhalla, 2002).

B. Localisation subcellulaire des composants de la voie ERK1/2

L'organisation spatiale des kinases et de leurs substrats détermine la nature des signaux transmis et leur destination. La formation de complexes multi-protéiques avec des protéines d'échafaudages et la localisation du signal Ras semblent des moyens importants pour assurer la spécificité de la réponse cellulaire.

En effet, Ras peut être localisé au niveau des endosomes, du RE, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique. ERK1/2 est rapproché de Ras actif par des protéines d'échafaudages spécifiques. En fonction de la localisation du signal Ras, ERK1/2 actif ne phosphoryle pas les mêmes substrats cytoplasmiques (Casar *et al*, 2009).

Les protéines d'échafaudage jouent aussi un rôle majeur dans la spécificité de la réponse cellulaire. D'une part, elles potentialisent la vitesse de transduction du signal et son amplitude (Ebisuya *et al*, 2005). D'autre part, elles orientent les kinases actives vers une localisation subcellulaire appropriée. Cependant, les mécanismes de fonctionnement des protéines d'échafaudage impliquées dans l'activation des kinases et/ou dans la localisation des kinases actives reste à déterminer et leur distinction à clarifier. La dimérisation de ERK1/2 pourrait être un des mécanismes mis en jeu (Casar *et al*, 2008).

Dans des cellules quiescentes, la voie classique situe MEK1/2 et ERK1/2 dans le cytoplasme, grâce à des interactions avec des ancrages cytoplasmiques, des protéines d'échafaudages. Ces interactions confèrent une localisation précise et spécifique aux kinases (**figure 19**). Cependant, il est important d'avoir l'image d'une localisation subcellulaire dynamique et ce, même en l'absence de stimulation (Costa *et al*, 2006).

Localisation à la membrane plasmique. Le principal régulateur de la localisation membranaire de ERK1/2 est KSR (« Kinase suppressor of Ras »). Dans des cellules non stimulées, KSR1 interagit avec MEK1/2. L'activation de Ras provoque la translocation membranaire du complexe KSR1-MEK1/2. Raf actif rejoint ce complexe, active MEK1/2 qui, à son tour, recrute et active ERK1/2 (Wortzel & Seger, 2011). Les phosphorylations de MEK1/2 et de ERK1/2 induisent des changements de conformation et inhibent leurs interactions avec KSR1. Ainsi, les kinases actives vont transloquer majoritairement au noyau mais aussi au niveau d'autres organelles ou composants cellulaires (Wortzel & Seger, 2011).

Localisation nucléaire. Les mécanismes précis de la localisation spatio-temporelle nucléaire de ERK1/2 reste inconnus. La translocation nucléaire des kinases actives nécessite dans un premier temps leur dissociation des ancrages cytoplasmiques. Un transport passif ou un transport actif (via une importine) permettraient aux kinases ERK1/2 de franchir l'enveloppe nucléaire. Des événements de phosphorylations additionnels pourraient être importants pour cette translocation (Yao & Seger, 2009; Plotnikov *et al*, 2011).

Les kinases ERK1/2 sont en mouvement permanent entre le cytoplasme et le noyau. Suite à une stimulation, ERK1/2 peut être retenues dans le noyau de quelques minutes à plusieurs heures. L'hypothèse d'ancres nucléaires néo-synthétisés par l'activation de la voie ERK1/2 est la plus plausible, mais le mécanisme précis est inconnu (Zehorai *et al*, 2010). En revanche, il est admis que la localisation nucléaire prolongée de ERK1/2 est requise pour la prolifération cellulaire (Meloche & Pouyssegur, 2007).

Localisation mitochondriale. Après stimulation, plusieurs études rapportent la présence des kinases Raf, MEK1/2 et ERK1/2 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Yao & Seger, 2009).

C-Raf est connu pour être recruté au niveau mitochondrial par différentes protéines (e.g. Bcl-2, Grb10, PAK1). Classiquement, C-Raf exerce des fonctions anti-apoptotiques

directes et indépendantes de MEK (e.g. phosphorylation de Bad et interaction avec Bcl-2) (Zehorai *et al*, 2010). Cependant, C-Raf favoriserait aussi la survie cellulaire en contrôlant le niveau mitochondrial de ROS et de calcium via un mécanisme dépendant de MEK (Kuznetsov *et al*, 2008).

En revanche, les mécanismes de recrutement et l'action « mitochondriale » de ERK1/2 sont moins bien définis (Wortzel & Seger, 2011). ERK1/2 mitochondrial peut interagir avec des protéines de signalisation apoptotique (e.g. Bcl-2), des facteurs de transcription (e.g. TFAM « mitochondrial transcription factor A ») et des protéines impliquées dans le métabolisme (e.g. VDAC1 « voltage-dependent « anion channel 1 »). Cette localisation permettrait à ERK1/2 d'exercer des fonctions anti-apoptotiques directes (Rasola *et al*, 2010) mais aussi de réguler le métabolisme mitochondrial directement ou indirectement en modulant la transcription de l'ADN mitochondrial (Wang *et al*, 2014b; Galli *et al*, 2009).

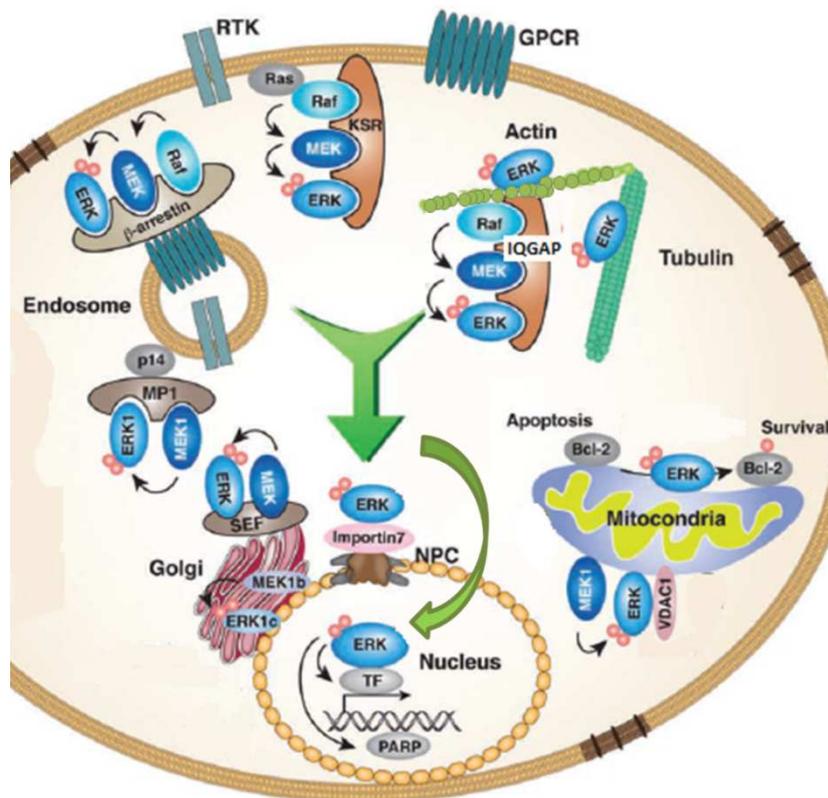


Figure 19. Distribution intracellulaire de ERK1/2.

L'activation de ERK1/2 engendre une forte translocation nucléaire nécessaire à la prolifération cellulaire. De plus, ERK1/2 transloque à la membrane de différents organelles ou compartiments cellulaires principalement grâce à des protéines d'échafaudage dont les mécanismes ne sont pas complètement identifiés. ERK1/2 peut soit réguler une activité intrinsèque, soit activer des substrats à proximité. Modifié d'après (Wortzel & Seger, 2011). KSR : kinase suppresseur de ras, IQGAP : Ras GTPase-activating like protein, 1, SEF : similar expression to *fgf* genes, MP1 : MEK1 partner, TF : facteur de transcription, PARP : poly(ADP-ribose) polymérase ; Bcl-2 : B cell lymphoma 2.

Localisation au niveau du cytosquelette. ERK1/2 interagit directement avec des éléments du cytosquelette (tubuline, actine, calponine, vimentine) ou indirectement.

Au niveau du cytosquelette d'actine, la protéine d'échafaudage IQGAP (« Ras GTPase-activating like protein ») interagit avec B-Raf, MEK et ERK1/2 ce qui est associé à des changements morphologiques et aux propriétés migratoires des cellules (Yao & Seger, 2009; Wortzel & Seger, 2011).

Actuellement, il n'existe pas de protéines d'échafaudage connues spécifiques aux microtubules. Cependant, indépendamment de son activité, il existe une fraction de molécules ERK1/2 associée aux microtubules via une interaction avec la tubuline (Yao & Seger, 2009; Wortzel & Seger, 2011). Cette interaction nécessite un cytosquelette intact (Smith *et al*, 2004). ERK1/2 peut réguler la dynamique microtubulaire en phosphorylant des MAPs (« microtubule associated proteins », voir partie II chapitre 1). La régulation de la dynamique microtubulaire serait un aspect important de la réponse mitogénique. En effet, après une stimulation mitogénique de fibroblastes quiescents, la moitié de l'activité de ERK1/2 est nucléaire et l'autre moitié est associée au cytosquelette (Reszka *et al*, 1995). De plus, dans un modèle neuronal, l'interaction de ERK1/2 actif avec des éléments du cytosquelette (moteur moléculaire) pourrait être impliquée dans son transport nucléaire (Perlson *et al*, 2005).

Localisation endosomale. Les protéines d'échafaudage MP1 et β -arrestine, au niveau des vésicules d'endocytose, permettraient de faciliter l'activation de la voie en aval des récepteurs internalisés de type RTK et GPCR, respectivement (Wortzel & Seger, 2011).

Localisation Golgienne. La signalisation MAPK/ERK1/2 au niveau du Golgi permettrait de réguler des fonctions spécifiques à cet organite (e.g. polarisation pendant la migration, fragmentation mitotique) mais aussi, d'intégrer des signaux spécifiques à la signalisation MAPK/ERK1/2 (Mayinger, 2011). Par exemple, l'interaction entre Sef1 et les composants de la voie ERK1/2 active spécifiquement la PLA2 (Casar *et al*, 2009). De plus, ERK1/2 actif ne se dissocie pas de Sef1 ce qui constitue un moyen de séquestration cytosolique. Le laboratoire de Méloche a récemment proposé que la perte de l'expression de Sef1 serait un événement oncogénique précoce qui contribue à l'instabilité génomique et à la progression tumorale via l'activation nucléaire prolongée et soutenue de la signalisation ERK1/2 (Duhamel *et al*, 2012).

C. Interconnexions entre voies de signalisation

En fonction du stimulus et du contexte cellulaire, les voies PI3K/Akt et Raf-MEK1/2-ERK1/2 communiquent via des boucles de rétrocontrôle négatifs ou positifs et des interconnexions (Mendoza *et al*, 2011). Synergie ou antagonisme modulent la durée et l'amplitude des signaux pro-prolifératifs, influençant ainsi l'effet biologique. La coopération entre les signalisations PI3K/Akt et ERK1/2 peut intervenir aux différents niveaux de la régulation et de la transduction du signal (**figure 20A**). La compréhension des réseaux biologiques interconnectés et complexes est fondamentale pour l'étude des mécanismes de résistance aux drogues et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. De nouveaux systèmes d'études, combinant des approches *in silico* avec des modélisations mathématiques et des données *in vitro*, permettent aujourd'hui de mieux évaluer l'étendue des interconnexions entre les voies ERK1/2 et Akt (Aksamitiene *et al*, 2012; Won *et al*, 2012).

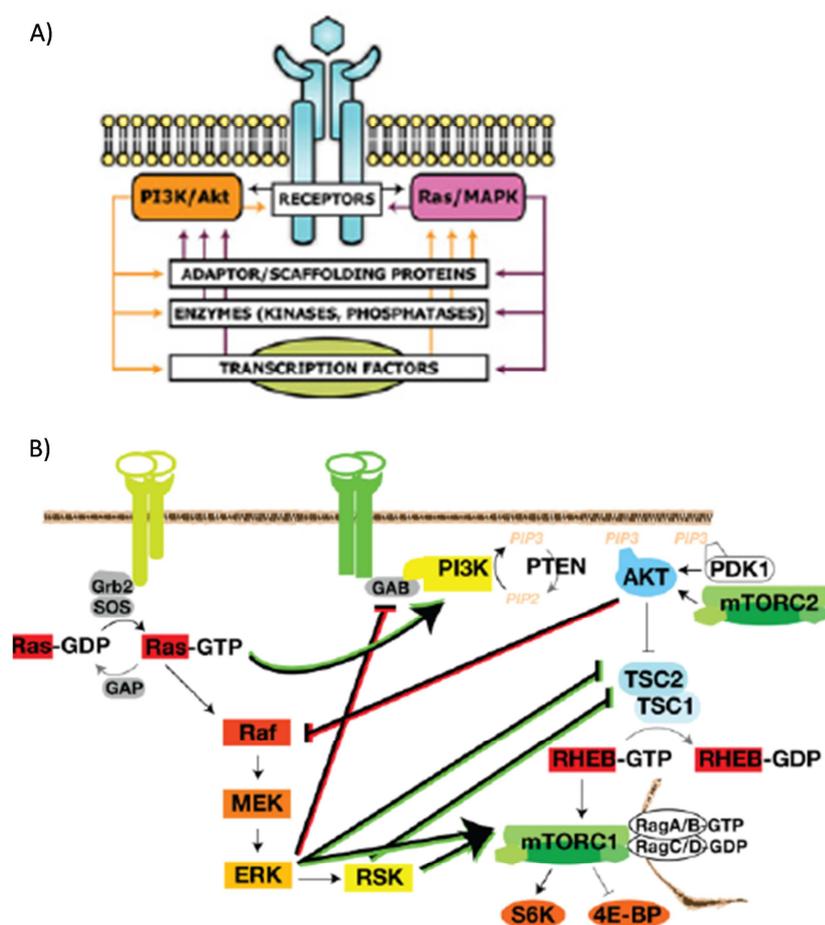


Figure 20. Interconnexions entre les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/Akt

A_Niveaux d'interaction. Les voies PI3K/Akt (lignes oranges) et Ras/MAPK (lignes violettes) peuvent influencer l'une sur l'autre aux différents niveaux de la transduction du signal. D'après (Aksamitiene *et al*, 2012). **B_Modèle d'interaction réalisé d'après des données biologiques.** En rouge sont représentées les cross-inhibitions et en vert, les cross-activations. D'après (Mendoza *et al*, 2011).

Trois grands mécanismes généraux d'interconnexions entre voies de signalisation ont été décrits : la « cross-inhibition », la « cross-activation » et la convergence des voies (e.g. FOXO est un substrat commun aux signalisations ERK1/2 et PI3K/Akt) (Mendoza *et al*, 2011). Les interconnexions entre voies de signalisation sont hautement dépendantes du contexte cellulaire, les exemples cités ci-dessous sont donc donnés à titre indicatif.

Les voies Ras-ERK et PI3K/Akt peuvent réguler négativement l'activité de l'une et de l'autre. Les mécanismes de cross-inhibition sont souvent révélés par l'inhibition chimique d'une voie de signalisation : le blocage de la voie induit l'activation de l'autre. Par exemple, en fonction du contexte cellulaire, l'utilisation d'inhibiteurs de MEK peut induire l'activation de la voie PI3K/Akt (Hoefflich *et al*, 2009). Inversement, Akt peut réguler négativement l'activation de ERK en phosphorylant des sites inhibiteurs de la kinase raf (Moelling *et al*, 2002) (**figure 20B**).

A l'opposé, la cross-activation est le résultat d'une régulation positive entre deux membres de voies de signalisation différentes. Par exemple, l'activation de la voie Ras-ERK1/2 peut activer la signalisation PI3K-mTORC1 en régulant PI3K, TSC2 et mTORC1 (Mendoza *et al*, 2011).

5. Signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK1/2 dans le cancer du sein

Le cancer du sein est une pathologie très complexe présentant une grande hétérogénéité (voir partie III, chapitre 1). Les avancées en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence un grand nombre d'aberrations génomiques. Beaucoup de ces aberrations convergent vers quelques voies de signalisation clés, incluant PI3K/Akt et Raf/MEK/ERK (Polyak & Metzger Filho, 2012). Les altérations de ces deux voies de signalisation sont impliquées dans la prolifération incontrôlée, la survie, la migration et la formation de métastases.

A. Signalisation PI3K/Akt

La signalisation PI3K/Akt est la voie dont les composants sont le plus fréquemment mutés et/ou amplifiés dans le cancer du sein, après le gène suppresseur de tumeur p53 (Paplomata & O'Regan, 2014). Environ 25% des cancers du sein présentent une mutation du gène *PI3KCA* qui est particulièrement associée aux sous-types cliniques ER+ et HER2 amplifié (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Par ailleurs, la voie PI3K/Akt est fréquemment suractivée dans les cancers du sein en raison de la dérégulation d'activateurs en amont de la voie (surexpression de HER2 et de IGFR1) ou de la dérégulation d'inhibiteurs (perte d'expression ou mutation inactivatrice de PTEN et de INPP4B) (Saini *et al*, 2013). Par exemple, il a été montré que les tumeurs « HER2 amplifiés » sont largement dépendantes de la signalisation PI3K/Akt (She *et al*, 2008). Ainsi, les altérations génétiques et l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt contribuent au développement tumoral des cancers mammaires dans leur ensemble (Cully *et al*, 2006; Saini *et al*, 2013).

B. Signalisation Raf-MEK1/2-ERK1/2.

Si des mutations affectant Ras ou Raf sont fréquentes dans plusieurs types de cancer, de telles altérations restent rares dans le cadre du cancer du sein (Cancer Genome Atlas Network, 2012). MEKK1 (MAPKK) est retrouvé muté dans 14% et 5% des cancers luminaux A et B, respectivement (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Malgré ces observations, des arguments expérimentaux valident l'importance de la voie Ras/MAPK dans le cancer du sein et particulièrement dans les phénotypes agressifs : i) l'expression de gènes signatures de la voie ERK1/2 est augmentée dans les cancers de type triple négatif (TNBC) et « basal-like » (Hoeflich *et al*, 2009; Giltane & Balko, 2014), ii) par rapport à la tumeur primaire, l'activation de ERK1/2 (phosphorylation) est augmentée au niveau des sites métastatiques (Adeyinka *et al*, 2002; Sivaraman *et al*, 1997) et iii) l'altération des mécanismes de régulation négatifs de la voie ERK1/2 (e. g. phosphatase ou Ras-GAP) est particulièrement associé aux phénotypes « basal-like » (Giltane & Balko, 2014).

En effet, l'équipe de Balko a montré des altérations génétiques et épigénétiques du gène *DUSP4* (« dual specificity phosphatase 4 » ou MKP2) associées aux sous-types TNBC et « basal-like ». 50% des cancers du sein présentent une perte de copie simple du gène *DUSP4* (Balko *et al*, 2012, 2014). Par ailleurs, Hoeflich *et al*. ont montré que les modèles de cancer du sein « basal-like » sont plus sensibles à l'inhibition de MEK1/2 que les modèles de phénotypes luminaux et HER2 amplifiés (Hoeflich *et al*, 2009).

Enfin, la dérégulation de l'expression de RTKs (e. g. EGFR, HER2) fréquente dans les cancers du sein sous-tend une activation anormale des voies de signalisation en aval (Giltane & Balko, 2014). Cependant, il semblerait que de telles altérations fournissent une dépendance plus marquée à la voie de signalisation PI3K/Akt (She *et al*, 2008; Sos *et al*, 2009).

C. Implications thérapeutiques

Les interconnexions entre les voies PI3K/Akt et ERK1/2 justifient la stratégie émergente de double inhibition : cibler à la fois la voie PI3K/Akt et la voie Ras/MAPK. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'une peut provoquer l'activation de l'autre via un mécanisme de cross-inhibition (Carracedo *et al*, 2008; Hoeflich *et al*, 2009; Serra *et al*, 2011). Démontré dans des modèles précliniques, le ciblage de ces deux voies présente un intérêt thérapeutique accru par rapport à une simple inhibition (Saini *et al*, 2013). Une méta-analyse d'études cliniques de phase I menées sur des patients atteints de cancers solides avancés (colorectal, sein, mélanome, ovaire, pancréas) suggère qu'une double inhibition est plus efficace. Cependant, cette stratégie est plus toxique, 46 % des patients ayant reçu une double inhibition présentent des effets secondaires non hématologiques de grade 3 contre 17% des patients ayant reçu une simple inhibition ciblant PI3K/Akt ou MEK1/2 (Shimizu *et al*, 2012). Dans le but de limiter les toxicités, les défis de cette stratégie sont de i) concevoir des programmes d'administration appropriés, ii) choisir quels composants cibler dans chaque voie de signalisation en fonction de la tolérance individuelle des drogues et des combinaisons et, iii) définir une population cible, l'efficacité des inhibiteurs étant largement susceptible d'être influencée par le génotype de la tumeur (Shimizu *et al*, 2012; Saini *et al*, 2013).

Encadré 3. Points clés du chapitre « Signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt »

- ✓ Des protéines interagissant avec les lipides membranaires sont à l'origine de l'activation des signalisations MAPK/ERK1/2 (Ras, Raf, PKC) et PI3K/Akt (PI3K, PDK1, Akt, mTORC2).
- ✓ Une activation coordonnée des signaux ERK1/2 et PI3K/Akt est requise pour la prolifération cellulaire.
- ✓ Les signalisations MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt coopèrent pour contrôler la prolifération et la survie cellulaire.
- ✓ L'étendue des interconnexions entre ces deux signalisations justifie la stratégie de double inhibition dans un contexte thérapeutique.

Partie II. Taxanes et chimiorésistance

Les taxanes représentent une importante classe d'agents cytotoxiques et appartiennent à la famille des agents tubulo-affins qui interfèrent avec la dynamique des microtubules. La molécule originelle, le taxol, a été isolée d'extraits d'if du Pacifique, un conifère à croissance lente dans les années 60. Après la mise en évidence de son effet cytotoxique, les limites liées à son extraction ont motivé le développement d'analogues semi-synthétiques. Des recherches ont permis de conduire à l'hémi-synthèse du taxol à partir d'un précurseur dérivé des aiguilles de l'if européen (Guéritte-Voegelein *et al*, 1987). Depuis, la production industrielle de paclitaxel et d'un analogue structural, le docétaxel, sont possibles. La FDA (« Food and Drug Administration ») a délivré une autorisation de mise sur le marché en 1994 et en 1996, respectivement pour l'utilisation du paclitaxel (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb) et du docétaxel (Taxotere[®], Sanofi-Aventis) dans le traitement du cancer du sein (Gradishar, 2012). Aujourd'hui, le paclitaxel et le docétaxel sont largement prescrits comme agents antinéoplasiques pour de nombreux types de cancer (e.g. sein, poumon, prostate) (Fauzee *et al*, 2011).

Cette deuxième partie de l'introduction abordera l'utilisation des taxanes en clinique dans le cadre du cancer du sein puis le mécanisme d'action des taxanes et plus particulièrement du docétaxel (agent utilisé pour les travaux de la présente thèse). Enfin, les grands mécanismes de chimiorésistance aux taxanes seront décrits.

Chapitre 1. Cancer du sein et docétaxel en clinique

1. Généralités sur le cancer du sein et sa classification

Sources : (Mathieu, 2007 ; Goldhirsch et al, 2013 ; <http://www.pathophys.org/breast-cancer/> ; http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre_26.html)

La grande majorité des cancers du sein sont des adénocarcinomes, se développant à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire (canaux ou lobules). Les adénocarcinomes naissent le plus souvent à partir des cellules des canaux et plus rarement à partir des cellules des lobules. Les cancers dits « *in situ* » se caractérisent par l'absence d'invasion des tissus environnants, à la différence des cancers dits « infiltrants », qui se

définissent par le franchissement de la membrane basale. 80% des cancers sont des carcinomes canaux infiltrants. S'ils ne sont pas traités à temps, les cancers du sein invasifs peuvent ensuite se propager par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Les cellules cancéreuses s'accumulent alors dans les ganglions lymphatiques les plus proches (ganglions axillaires) ou vers d'autres régions du corps et génèrent ainsi des métastases.

La classification des cancers du sein se rapporte à l'histologie du tissu mammaire (**figure 21**). Les canaux et les lobules sont bordés par deux types de cellules : i) les cellules luminales ou épithéliales qui bordent la lumière des lobules et des canaux sont sensibles aux oestrogènes et à la progestérone et expriment les cytokératines CK8/18/19, ii) les cellules basales ou myoépithéliales, au contact de la membrane basale sont insensibles aux oestrogènes et à la progestérone et expriment d'autres types de cytokératines ainsi que des marqueurs musculaires lisses. Dans les canaux, il existe aussi des cellules souches progénitrices en faible nombre qui peuvent se différencier en cellule basale ou luminale

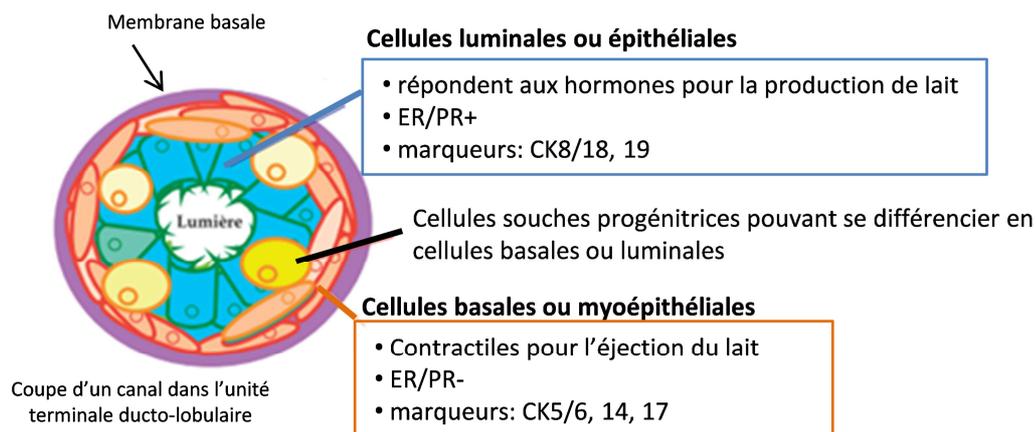


Figure 21. Schéma d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire et les différents types cellulaires.

Trois types cellulaires sont à distinguer : les cellules luminales, les cellules myoépithéliales et les cellules progénitrices. Modifié d'après <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/?sequence=38>. CK : cytokératine, ER/PR : récepteur aux oestrogènes et à la progestérone.

Le cancer du sein est une pathologie très hétérogène et les classifications histologiques et cliniques seules, restent insuffisantes pour prédire efficacement l'évolution de la maladie. Les programmes de recherche dédiés à la génomique des cancers ont permis de dresser une carte d'identité des cancers correspondant à leur « portrait » génomique. Perou *et al.* ont été les premiers à établir des sous-groupes moléculaires : « luminal A », « luminal B », « HER2 enrichi » et « basal-like » (Perou *et al.*, 2000). Ces différentes classes moléculaires permettent de définir des groupes de cancer du sein de pronostics distincts dont le but est de proposer à

terme une prise en charge thérapeutique plus individualisée. Les signatures moléculaires nécessitent cependant de plus amples études : i) pour leur validation comme facteurs prédictifs ou pronostiques, ii) pour s'assurer de leur bénéfice clinique par rapport aux paramètres histologiques et cliniques classiques (voir ci-dessous), et iii) pour évaluer le rapport coût/efficacité (Bonnefoi, 2009). L'analyse moléculaire systématique est aujourd'hui difficilement réalisable en routine

Afin d'établir la meilleure stratégie thérapeutique, trois grand types d'informations sont établis : i) le stade de la pathologie via la classification TNM (« Tumor, Node, Metastase ») basé sur des examens cliniques, ii) le grade de la tumeur via des examens histologiques (e.g. grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson, index de prolifération ki67) et, iii) l'expression des récepteurs hormonaux (ER, PR) et du récepteur HER2 basés sur des examens histologiques.

Les marqueurs pronostiques et prédictifs classiques (âge, TNM, grade, expression des récepteurs, marqueur de prolifération) sont utilisés pour orienter la stratégie thérapeutique. Ces derniers ont été associés à des sous-types moléculaires par des définitions de substitution adoptées par le groupe d'experts international de la conférence de St Gallen 2013 (Goldhirsch *et al*, 2013) (**figure 22**). Le sous type « luminal A » correspond à des cancers généralement de bas grade, exprimant des récepteurs hormonaux et d'évolution plutôt favorable. Les cancers « basal like » (triple négatifs) sont de haut grade et de mauvais pronostic et n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni HER2.

Définition clinico-pathologique de substitution	Triple négative	HER2 ^{enrichi} non luminal	Luminal-B like HER2+/-	Luminal-A like
Sous-types moléculaires intrinsèques	« basal-like »	« HER2 ^{enrichi} »	« Luminal B »	« Luminal A »
% des cancers du sein	15-20%	10-15%	20%	40%
Expression des récepteurs		ER/PR- HER2+	ER+ HER2+/-	ER/PR+ HER2-
Pronostic	Mauvais			Bon

Figure 22. Définitions clinico-pathologiques de substitution.

Les tumeurs ER+, HER2- du groupe « luminal B-like » sont différenciées du groupe « luminal A-like » par un ki67 élevé ou un marquage PR négatif ou faible. Modifié d'après Wong & Rebelo, Mc Master physiopathology review, <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>.

2. Les taxanes dans le traitement du cancer du sein

La comparaison d'essais randomisés évaluant l'efficacité des taxanes conforte leur utilisation dans le traitement néo-adjuvant et adjuvant des cancers du sein localement avancés (Hassan *et al*, 2010).

Les taxanes sont utilisés dans le traitement des cancers du sein infiltrants non métastatiques et dans les cancers du sein métastatique, qu'ils soient hormonaux +, triple négatifs ou HER2+. Selon le référentiels de bon usage (Institut national du cancer),

- **le docetaxel en association à la doxorubicine et au cyclophosphamide** est indiqué dans le traitement adjuvant du cancer du sein opérable chez des patientes présentant ou non un envahissement ganglionnaire.
- **Le docetaxel en association à la doxorubicine** est indiqué dans le traitement du cancer du sein localement avancé ou métastatique chez les patientes n'ayant pas reçu de chimiothérapie cytotoxique antérieure dans cette affection.
- **Le docetaxel est indiqué en monothérapie** dans le traitement des patientes atteints d'un cancer du sein localement avancé ou métastatique après échec d'une chimiothérapie cytotoxique, ayant comporté une anthracycline ou un agent alkylant.
- **Le docetaxel en association au trastuzumab** est indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de HER2, chez les patientes non pré-traitées par chimiothérapie pour leur maladie métastatique.
- **Le docetaxel en association à la capécitabine** est indiqué dans le traitement du cancer du sein localement avancé ou métastatique après échec d'une chimiothérapie cytotoxique ayant comporté une anthracycline.

La comparaison indirecte entre plusieurs études cliniques (Hassan *et al*, 2010) ainsi qu'une étude randomisée de phase III (Jones *et al*, 2005b) suggèrent que le docétaxel serait plus efficace que le paclitaxel pour le traitement palliatif des cancers du sein métastatiques. Bien qu'il n'existe pas de consensus sur la stratégie thérapeutique à adopter pour les cancers du sein métastatiques, les taxanes et le capecitabine (fluoropyrimidine) seraient les agents qui montrent la meilleure activité, seuls ou en combinaison (Roché & Vahdat, 2010). *In fine*, le choix du traitement est individualisé en fonction des caractéristiques de la tumeur, de son agressivité et des traitements antérieurs reçus par la patiente.

3. Les limitations à l'utilisation des taxanes

Source : (Fauzee et al, 2011)

Les deux principales limitations à l'efficacité des taxanes sont les phénomènes de résistance (voir chapitre 3) et la dose-limitante de toxicité.

Les toxicités hématologiques et neurologiques (neuropathie périphérique) induites par les taxanes sont les plus fréquentes. Les réactions d'hypersensibilité liées aux solvants utilisés pour pallier la mauvaise solubilité de ces molécules sont gérées par des médications préventives. Les toxicités hématologiques sont dues à une atteinte de la moëlle osseuse et peuvent conduire à une anémie, une neutropénie et une thrombopénie. Une prophylaxie médicamenteuse à base de « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF) permet de diminuer et de contrôler les neutropénies sévères. D'autres effets secondaires de gravité moindre, comme l'alopécie ou la rétention hydrique sont également recensés. Malgré ces désavantages certains, la fréquence d'utilisation des taxanes n'est pas affectée au vu des réels bénéfices cliniques que ces agents apportent.

4. Taxanes de 3^{ème} génération

Dans le but d'augmenter l'efficacité et de diminuer la toxicité et le développement des résistances aux taxanes, de nombreuses recherches se concentrent sur le développement de taxanes de 3^{ème} génération à partir des molécules de paclitaxel et de docétaxel (**figure 23**). Plusieurs stratégies sont mises en œuvre :

i) une amélioration de la formulation du paclitaxel et du docétaxel. Par exemple, le Nab-paclitaxel (Abraxane[®], Celgene Inc) utilise des nanoparticules d'albumine pour améliorer l'absorption du paclitaxel (Yared & Tkaczuk, 2012). Approuvé en 2008 par la Haute Administration de Santé, l'Abraxane est indiqué en 2^{ème} ligne pour le traitement des cancers du sein métastatiques.

ii) la génération de prodrogue. La DHA-paclitaxel[®] (Taxoprexin[®], Protarga) est en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase III pour des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules et de mélanomes. Cette conjugaison conduirait à une meilleure délivrance de l'agent anticancéreux et une augmentation de l'effet cytotoxique du paclitaxel (Bradley *et al*, 2001; Fracasso *et al*, 2009).

iii) le développement de molécules analogues. Par exemple, le cabazitaxel (Jevtana[®], Sanofi) dérivé du docétaxel, présente des avantages pharmacocinétiques. De plus, la P-gP (P-glycoprotéine), protéine transmembranaire responsable de l'efflux de xénobiotique et largement incriminée dans l'acquisition du phénotype MDR (« multi-drug resistance »), présenterait moins d'affinité pour le cabazitaxel comparée au docétaxel (Yared & Tkaczuk, 2012). Le cabazitaxel a été approuvé par la FDA en 2010 pour le traitement de cancer prostatique réfractaire à l'hormonothérapie. Un essai clinique de phase II est en cours dans le cancer du sein.

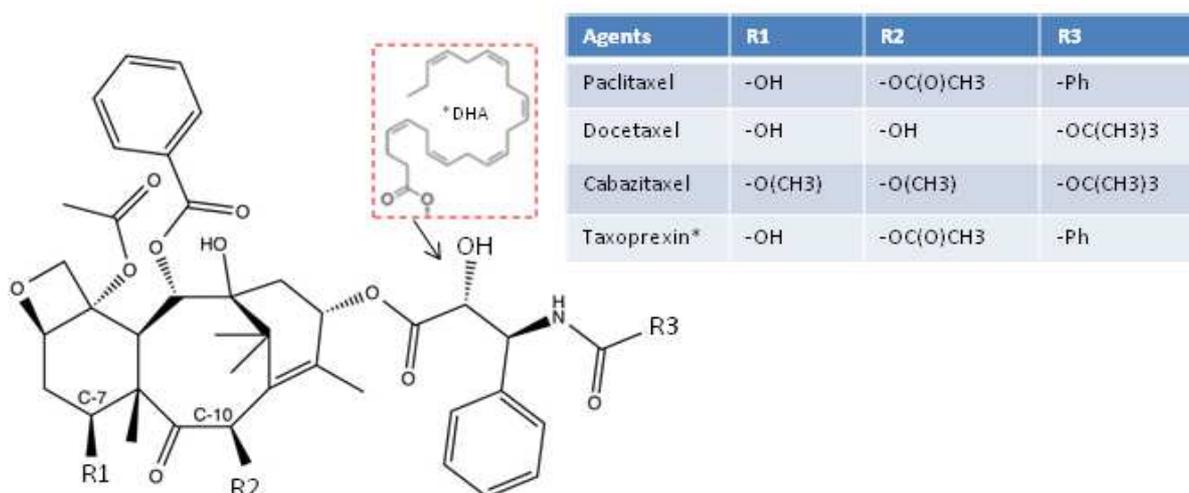


Figure 23. Structures chimiques du paclitaxel, du docétaxel et de leurs dérivés.

La substitution du groupement acétate (R2) et du groupement phényl (R3) confère au docétaxel une meilleure solubilité et une meilleure biodisponibilité par rapport au paclitaxel. Le cabazitaxel est un dérivé du docétaxel, les deux chaînes latérales (R1 et R2) sont substituées par des groupes diméthoxydes. La Taxoprexine correspond à une molécule avec un squelette paclitaxel sur lequel l'acide gras DHA (encadré rouge) est conjugué via une liaison ester. D'après (St. George *et al*, 2015; Yared & Tkaczuk, 2012).

Encadré 4. Points clés du chapitre « Cancer du sein et docétaxel en clinique »

- ✓ Les carcinomes mammaires sont hétérogènes en terme de phénotype et de pronostic et l'utilisation de chimiothérapie systémique est incontournable.
- ✓ Le docétaxel est indiqué en 1^{ère} ligne de traitement néo-adjuvante et adjuvante des cancers du sein localement avancés et dans le traitement des cancers du sein métastatiques.
- ✓ Les deux principales limitations à l'efficacité des taxanes sont les effets secondaires toxiques et les phénomènes de résistance.

Chapitre 2. Mécanismes d'action des taxanes

1. Les taxanes, des agents ciblant les microtubules

A. Structure et dynamique des microtubules

(Jordan & Wilson, 2004; McGrogan *et al*, 2008; Honore *et al*, 2005).

Les microtubules, composants clés du cytosquelette, sont nécessaires à de nombreuses fonctions cellulaires essentielles comme l'adaptation et le contrôle de la forme cellulaire, le transport intracellulaire, la mobilité et la division cellulaires. Les microtubules sont de longs et creux polymères protéiques constitués d'hétéro-dimères de tubuline (α et β). Dans la cellule, les microtubules sont polarisés et orientés. L'extrémité (+) est caractérisée par une croissance rapide vers la périphérie cellulaire alors que l'extrémité (-) est caractérisée par une croissance lente associée aux centrosomes. Le polymorphisme génétique et post-traductionnel de la tubuline influence la dynamique des microtubules et leurs fonctions.

La dynamique de polymérisation des microtubules est un mécanisme complexe et hautement régulé. Un mécanisme GTP-dépendant assure un échange actif entre les dimères constitutifs du microtubule et les dimères solubles. Cet échange se produit selon les deux grands modèles que sont l'instabilité dynamique et le « treadmelling ». L'instabilité dynamique est considérée comme le modèle prédominant *in vivo*. Ce modèle est caractérisé par une alternance de phases de croissance rapide et de dépolymérisation lente, entrecoupées de phases de transition brutales à l'extrémité (+) du microtubule (« catastrophe » vers un raccourcissement ou « sauvetage » vers une reprise de l'élongation du microtubule) (**figure 24A**). Le phénomène de « treadmelling », dont la traduction littérale est tapis roulant, est caractérisé par une croissance à l'extrémité (+) et un raccourcissement à l'autre extrémité (**figure 24B**). Le renouvellement des microtubules peut être basé sur l'instabilité dynamique, le « treadmelling » ou une combinaison des deux.

La compréhension des mécanismes régulateurs de la dynamique des microtubules est encore assez fractionnée. Cependant, les « microtubule associated proteins » (MAPs) semblent largement impliquées dans la régulation de leur dynamique (e.g MAP structurale comme Tau, MAPs motrices comme la dynéine et la kinésine, et les TIPS « +end tracking proteins »).

Les fonctions des MAPs sont, en partie, régulées par des voies de signalisation et l'action de kinases et phosphatases. Classiquement, la phosphorylation des MAPs mène à leur dissociation des microtubules et/ou de la tubuline et augmente l'instabilité des microtubules. Les kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, comme la kinase Cdk1 ou la famille Aurora, sont les plus importantes pour la régulation de l'activité des MAPs. En outre, les kinases ERK1/2 et Gsk3- β , effectrices de signaux prolifératifs, sont également impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules via leur action sur les MAPs.

En interphase, les principales fonctions des microtubules irradiant à partir du centrosome sont le transport et l'organisation cellulaire. L'accomplissement d'un cycle cellulaire nécessite un réseau de microtubules 20 à 100 fois plus dynamique qu'en interphase. En effet, la dynamique des microtubules est particulièrement importante pendant la mitose pour permettre l'assemblage du fuseau mitotique. De plus, la croissance et la dépolymérisation rapide des microtubules permettent de faciliter la capture et l'alignement des chromosomes. Ainsi, les microtubules sont des cibles pour des molécules anti-mitotiques, utilisées avec succès dans le traitement du cancer.

B. Les taxanes, des agents tubulo-affins

Les taxanes interagissent avec les microtubules polymérisés, en se liant, de manière réversible, à la sous-unité β de la tubuline, dans la lumière du microtubule. A forte concentration (>10 nM sur un modèle de HeLa, Yvon *et al*, 1999), les taxanes augmentent la polymérisation des microtubules menant à une masse de polymères plus importante. A des concentrations 10 à 100 fois plus faibles, les taxanes diminuent la dynamique des microtubules en faveur de leur polymérisation (**figure 24C**) (Risinger *et al*, 2009). L'interaction β -tubuline/taxane stabiliserait la structure du microtubule en provoquant un changement de conformation qui augmenterait l'affinité de l'interaction entre les dimères de tubuline (Gascoigne & Taylor, 2009).

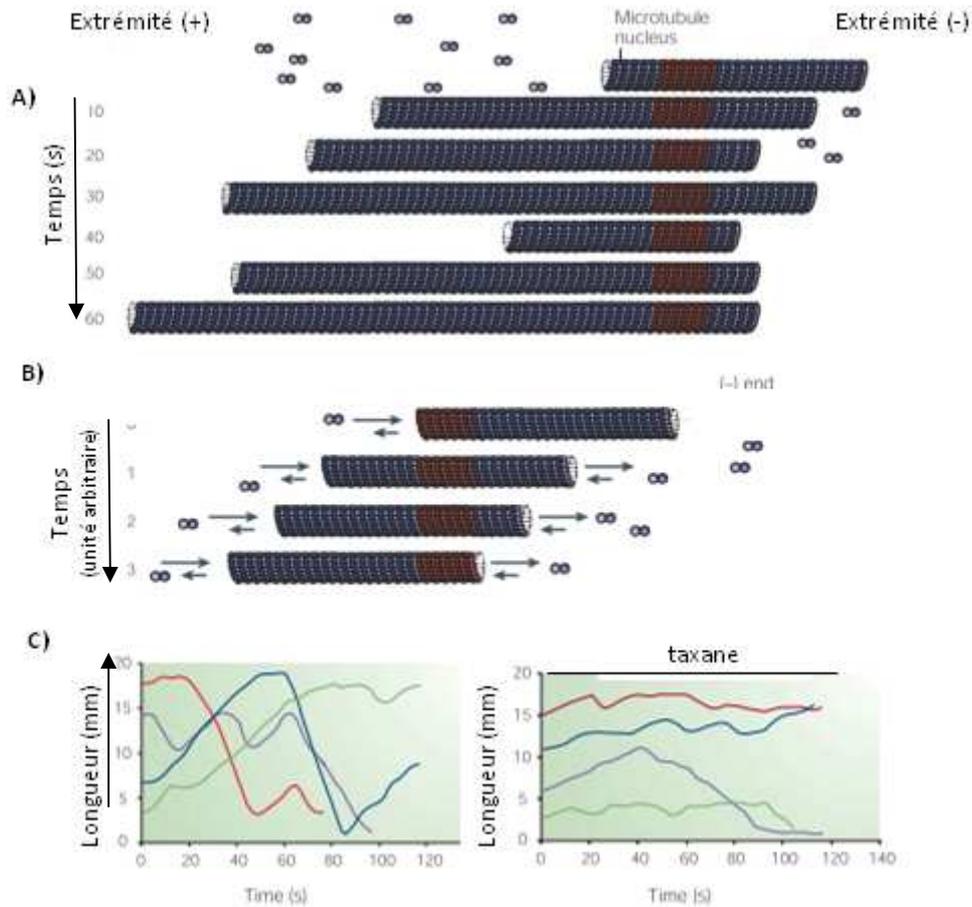


Figure 24. Dynamique des microtubules et taxane.

Modifié d'après Jordan & Wilson, 2004. **A_** Modèle d'instabilité dynamique (variation physiologique de la longueur d'un microtubule dans le temps). L'extrémité du microtubule croît (sauvetage) et se raccourcit (catastrophe) de manière aléatoire avec l'addition et la perte de dimères de tubulines. Les variations de longueur sont plus importantes à l'extrémité + du microtubule. **B_** Modèle du « treadmelling ». Les dimères de tubulines sont incorporés à l'extrémité + du microtubule au temps 0 et sont libérés à l'extrémité - du microtubule au temps 3. La longueur du microtubule est inchangée. Le phénomène de treadmelling est provoqué par les différences de concentrations de dimères de tubulines aux extrémités opposées du microtubule. **C_** Longueur de 4 microtubules individuels dans le temps (représentée par 4 couleurs différentes) en condition physiologique (à droite) et en présence de taxane (à gauche). Assemblage de tubulines de cerveau de bœuf purifiées étudié par différence de contraste en microscopie temps-réel. En absence de drogue, la dynamique est rapide avec de nombreuses variations de longueur. En présence de taxane, la dynamique des microtubules est supprimée.

Le docétaxel présente des caractéristiques uniques, différentes du paclitaxel :

i) Le docétaxel montre une plus grande affinité pour la β -tubuline et cible préférentiellement les microtubules au niveau des centres d'organisation des microtubules, les centrosomes, alors que le paclitaxel cible préférentiellement le fuseau mitotique (Gligorov & Lotz, 2004).

ii) Le docétaxel exerce une plus grande activité cytotoxique sur différents types d'explants tumoraux *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xéno greffes murins (Hanauske *et al*, 1992; Bissery, 1995).

ii) le docétaxel présente une pharmacocinétique différente, probablement liée à une meilleure captation et rétention cellulaire (Eisenhauer & Vermoken, 1998).

2. Mécanismes d'action anti-tumorale des taxanes

Le principal mode d'action des taxanes résulterait de la perturbation du cycle cellulaire. En effet, en stabilisant les microtubules, les taxanes provoquent un blocage du cycle cellulaire en G2/M ce qui conduit à une mort cellulaire. Cependant, les conséquences de la perturbation de la dynamique des microtubules sont très complexes. Le blocage du cycle cellulaire est majoritairement associé à l'activation de l'apoptose mitochondriale (Wertz *et al*, 2011) mais une mort cellulaire par nécrose est aussi décrite (Hernández-Vargas *et al*, 2007). De plus, indépendamment du blocage du cycle cellulaire, il pourrait aussi exister un lien direct entre la perturbation des microtubules induite par les agents tubulo-affins et l'apoptose mitochondriale (Rovini *et al*, 2011; Grand *et al*, 2014).

Cette partie sera consacrée au mode d'action classique des taxanes. Dans un premier temps, l'effet des taxanes sur le cycle cellulaire et leurs actions cyotoxiques seront abordés, puis un deuxième point sera consacré aux mécanismes moléculaires des taxanes.

A. Perturbation du cycle cellulaire et conséquences cellulaires

Les taxanes, en perturbant le cycle cellulaire des cellules tumorales aboutissent à des effets cyostatiques avec un retard dans la progression du cycle (Rixe & Fojo, 2007; Jordan *et al*, 1993), et à des effets cytotoxiques.

Le docétaxel agit dès la phase S et son effet cytotoxique semble maximal quand la molécule est appliquée sur des cellules synchronisées en phase S (Hennequin *et al*, 1995). La désorganisation des centrosomes induite par le docétaxel mène à la formation d'un fuseau mitotique anormal (Paoletti *et al*, 1997). En effet, la suppression de la dynamique des microtubules par les taxanes empêche l'alignement correct des chromosomes et perturbe la tension exercée au travers des kinétochores. Ainsi, la transition métaphase/anaphase est inhibée par l'activation du point de contrôle mitotique (SAC, « spindle assembly checkpoint »). L'activation du SAC induit un blocage en mitose. Ce blocage des cellules

tumorales en mitose conduit à différents comportements cellulaires (Gascoigne & Taylor, 2008):

- i) une mort cellulaire pendant le blocage en mitose (**figure 25A**)
- ii) une mort cellulaire après une sortie de mitose (**figure 25B-C**). En effet, malgré l'activation du SAC, les cellules peuvent sortir de mitose. Ce phénomène, appelé glissement mitotique (« mitotic slippage ») est dû à la dégradation graduelle de la cycline B1. L'activation du SAC ne peut pas prévenir d'une lente et continue dégradation de la cycline B1, qui mène finalement à la sortie de la mitose (Brito & Rieder, 2006; Gascoigne & Taylor, 2009).
- iii) des cellules ayant subi un glissement mitotique peuvent à nouveau entrer dans un cycle cellulaire (**figure 25D**).

Suite au blocage mitotique, deux grandes hypothèses peuvent expliquer la divergence des comportements cellulaires : la durée du blocage mitotique (Bekier *et al*, 2009) et le niveau d'activation des voies de signalisation intracellulaires (Gascoigne & Taylor, 2009). La vue actuelle est en faveur de l'hypothèse du niveau d'activation des voies de signalisation (Vitale *et al*, 2011). En effet, l'équilibre entre les signaux de mort cellulaire et de survie générés pendant le blocage mitotique dicterait le comportement cellulaire (Vitale *et al*, 2011; Gascoigne & Taylor, 2009).

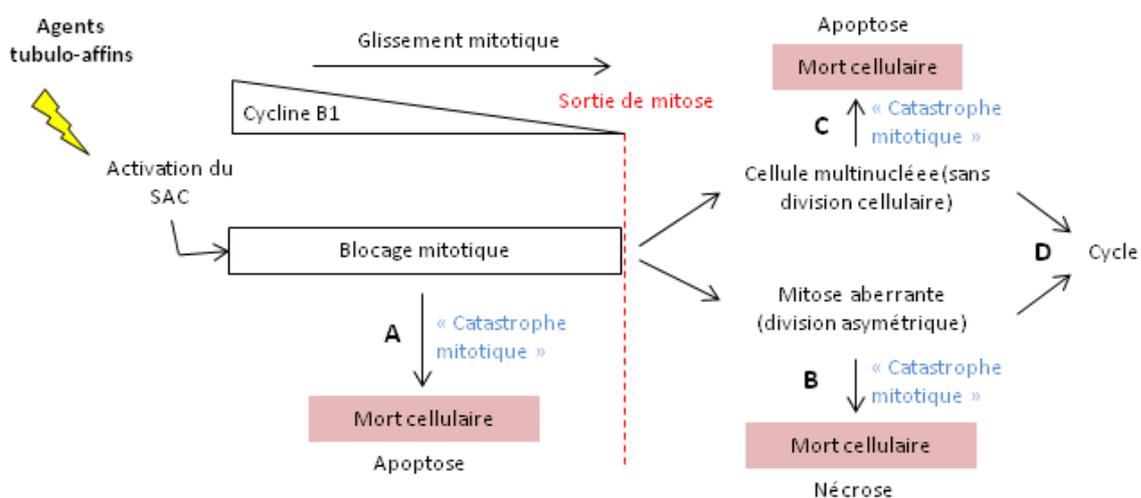


Figure 25. Conséquences cellulaires de la perturbation du cycle cellulaire par les agents tubulo-affins.
Réalisé d'après les données de Hernandez-Vargas *et al*. 2007.

D'autre part, les agents tubulo-affins peuvent induire différents types de mort cellulaire suite à la « catastrophe mitotique ». L'évolution de la définition de la catastrophe mitotique au cours des années peut prêter à confusion. En effet, par le passé, ce terme a été utilisé pour définir un type de mort cellulaire résultant d'une mitose aberrante, au même titre que l'apoptose (Paoletti *et al*, 1997; Morse *et al*, 2005). Aujourd'hui, bien qu'encore controversée, une nouvelle définition fonctionnelle est proposée (Vitale *et al*, 2011). La catastrophe mitotique activée par un blocage en mitose serait un mécanisme qui précède et qui mène à la mort cellulaire par le biais de l'apoptose (majoritairement décrite) mais aussi de la nécrose ou de la sénescence, et ce, en fonction du profil moléculaire des cellules (**figure 25**) (Vakifahmetoglu *et al*, 2008; Vitale *et al*, 2011).

Dans des cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231 et MCF-7), le type de mort cellulaire déclenché semble dépendre de la dose de docétaxel (Hernández-Vargas *et al*, 2007). Une forte dose de docétaxel (100 nM) peut induire une mort cellulaire par apoptose (**figure 25A et 25C**). Par opposition, une faible dose de docétaxel (2-4 nM) provoque une mitose aberrante associée à une accumulation de cellules hypodiploïdes suivie d'une mort cellulaire par nécrose (**figure 25B**) (Hernández-Vargas *et al*, 2007).

Les études cliniques restent controversées quant au type de mort cellulaire observé dans une tumeur traitée par les taxanes. Dans un certain nombre d'études, la réponse thérapeutique aux taxanes ne semble pas être corrélée à l'apoptose, tout comme les mutations ou les altérations de l'expression de gènes anti-apoptotiques ne semblent pas être des facteurs négatifs permettant de prédire l'efficacité thérapeutique des taxanes (Brown & Wouters, 1999; Rein *et al*, 2000; Morse *et al*, 2005). Cependant, une étude montre une corrélation entre le taux d'apoptose cumulé dans les 4 jours suivant la première injection de paclitaxel et la proportion de tumeur résiduelle à la fin du cycle de chimiothérapie néo-adjuvante (Symmans *et al*, 2000).

B. Mécanismes moléculaires de l'action cytotoxique

La majorité des études se concentrent sur l'apoptose intrinsèque induite par les taxanes. Les taxanes sont connus pour moduler positivement l'expression et l'activité des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (e.g. Bad, Bax) (Rovini *et al*, 2011). Une hyperphosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 conduisant à son inhibition a également été rapportée (Ruvolo *et al*, 2001). Cette hyperphosphorylation de Bcl-2

coïnciderait avec le blocage des cellules en G2/M suite à la fixation de l'agent anticancéreux sur les microtubules (McDaid & Horwitz, 2001a). L'hyperphosphorylation de Bcl-2, dans ce cas, est associée à la mort cellulaire par opposition à la mono-phosphorylation de Bcl-2 (ser70) en réponse à des facteurs de croissance, qui est associée à la survie cellulaire (Ruvolo *et al*, 2001). Blagoskonny *et al*. ont montré que les PKCs et ERK1/2 ne semblent pas impliqués dans l'hyperphosphorylation de Bcl-2 induite par les taxanes (Blagosklonny *et al*, 1996, 1999).

Plus récemment, les trois protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 (« myeloid cell leukemia 1 ») ont clairement été identifiées pour leurs rôles essentiels dans l'apoptose induite par un blocage mitotique (Terrano *et al*, 2010; Wertz *et al*, 2011). L'étude de Wertz, parue dans « Nature », identifie Mcl-1 comme un facteur clé de l'apoptose induite par les agents tubulo-affins. Activées suite à l'arrêt mitotique induite par les agents tubulo-affins, l'action coordonnée des kinases Cdk-1, CKII (« casein-kinase II »), JNK et p38 cible la dégradation de Mcl-1 et participe à déclencher l'apoptose des cellules bloquées en mitose (Wertz *et al*, 2011).

Enfin, d'une manière générale, le rôle de p53 dans la mort cellulaire induite par les taxanes est controversé et semble dépendre des types cellulaires étudiés. Dans le cadre du cancer du sein, il semblerait que le statut de p53 n'affecte pas la sensibilité aux taxanes (Rein *et al*, 2000; Sezgin *et al*, 2005). Ces données sont en accord avec celles d'Hernandez-Vargas montrant que les mécanismes de mort cellulaire induite par le docétaxel dans la lignée MDA-MB-231 (p53 muté non fonctionnel) et dans la lignée MCF7 (p53 « wild type ») sont identiques (Hernández-Vargas *et al*, 2007).

3. Effets anti-angiogéniques du docétaxel

Le docétaxel exerce des effets anti-angiogéniques. Ces effets ont été observés *in vitro*, avec une inhibition des principales étapes de l'angiogénèse : inhibition de la prolifération, de la migration, de l'invasion des cellules endothéliales et de leur capacité à former des pseudocapillaires (Sweeney *et al*, 2001; Grant *et al*, 2003; Bijman *et al*, 2006). L'effet anti-angiogénique du docétaxel est également observé *in vivo*, dans des modèles pré-cliniques de xénogreffes tumorales ou de tumeurs autochtones chez le petit animal (Sweeney *et al*, 2001; Kornfeld *et al*, 2012). Une diminution de la vascularisation des tumeurs mammaires chez des

patientes atteintes de cancer du sein traitées avec du docétaxel a également été observée (Mahéo *et al*, 2012).

Les effets antiangiogéniques du docétaxel ont été rapportés comme étant plus puissants que ceux du paclitaxel (Grant *et al*, 2003).

Encadré 5. Points clés du chapitre « Mécanismes d'action des taxanes »

- ✓ Les taxanes interagissent avec la β -tubuline, perturbent la dynamique des microtubules en favorisant leur stabilisation.
- ✓ Les taxanes bloquent les cellules en G2/M et induisent une mort cellulaire.
- ✓ Les taxanes déclenchent majoritairement une mort par apoptose mitochondriale.
- ✓ Les taxanes ont des propriétés antiangiogéniques.

Chapitre 3. Chimiorésistance aux taxanes

L'efficacité des taxanes peut être compromise par des phénomènes de résistance. Une chimiorésistance peut être développée par les cellules cancéreuses avant toute exposition aux taxanes (résistance intrinsèque ou innée) ou après une exposition (résistance acquise, plus fréquente) (Murray *et al*, 2012). Ces deux types de chimiorésistance représentent un obstacle majeur dans le traitement des cancers du sein et notamment des cancers du sein métastatiques déjà exposés à plusieurs lignes de chimiothérapie (Wang, 2014). D'une manière générale, trois grands mécanismes sont associés à la résistance aux anticancéreux : i) les pompes d'efflux, ii) des mutations ou des altérations de l'expression de la cible des agents cytotoxiques et, iii) la perturbation de voies de signalisation.

1. Phénotype MDR et pompe à efflux

(Murray *et al*, 2012; Katayama *et al*, 2014)

Le phénotype MDR « multidrug resistance » est une cause majeure de l'échec des traitements cytotoxiques dans de nombreux types de cancers. Classiquement, ce phénotype apparaît pendant la chimiothérapie de première intention ou après une rechute métastatique. Ce phénotype est caractérisé par l'expression ou la surexpression de protéines membranaires d'efflux et confère aux cellules cancéreuses une résistance croisée à différents agents anticancéreux (e.g. taxanes, anthracyclines). Les protéines d'efflux de drogue les mieux caractérisées appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC. Parmi cette famille, la protéine P-glycoprotéine (P-gp)/ABCB1 (« permeability glycoprotein », gène *MDR-1*), la protéine BCRP/ABCG2 (« breast cancer resistance protein ») et les protéines MRPs/ABCCs (« multidrug resistance proteins ») fonctionnent comme des pompes d'efflux énergie-dépendantes pour les agents cytotoxiques et leur expression confère un phénotype MDR aux cellules cancéreuses.

Modulation de l'expression de P-gp par les voies de signalisation. Plusieurs études montrent que l'inhibition de voies de signalisation diminue l'expression de la P-gp. La voie des MAPKs (ERK1/2, p38, JNK) semblerait être impliquée dans cette régulation (Katayama *et al*, 2014). La voie MAPK/ERK1/2 affecterait l'expression de la P-gp à la fois au niveau transcriptionnel (Zhao *et al*, 2013; Shen *et al*, 2011) et au niveau post-traductionnel (Katayama

et al, 2007). Ainsi, l'inhibition pharmacologique de MEK et l'extinction de ERK1/2 et p90RSK par siRNA inhibent l'expression de la P-gp dans des lignées de cancer du sein transduites par des vecteurs lentiviraux portant le cDNA du gène *MDR-1* (MDA-MB-231 et MCF-7) (Katayama *et al*, 2007).

Phénotype MDR, taxane et cancer du sein. *In vitro*, le niveau d'expression du gène *MDR-1*, codant pour la P-glycoprotéine, est corrélé à la sensibilité au paclitaxel (Mechetner *et al*, 1998). En clinique, la relevance de l'expression du gène *MDR-1* dans le cancer du sein a fait l'objet de nombreuses études. Une seule étude, réalisée à partir de 94 échantillons tumoraux, montre que l'expression de la P-gp est associée à une diminution de survie sans progression chez des patientes atteintes de cancer mammaire (66% de survie sans progression à 5 ans pour les patientes P-gp positives *versus* 88% pour les patientes P-gp négatives) (Tsukamoto *et al*, 1997). Les autres études ne montrent pas de lien significatif entre l'expression du gène *MDR-1* et/ou de la P-gp et la réponse aux taxanes chez des patientes atteintes de cancer du sein (Schneider & Romero, 1995; Yang *et al*, 1999; Schneider *et al*, 2000; Kanzaki *et al*, 2001). La corrélation entre la survie des patientes et le phénotype MDR resulterait d'avantage de la combinaison de l'expression des différentes protéines d'efflux (e.g. BCRP, MRPs) que de l'expression de la P-gp seule (Kuo, 2007).

Les essais cliniques testant des inhibiteurs de P-gp ont été stoppés en raison de la toxicité engendrée. Malgré le développement d'inhibiteurs de seconde et de troisième génération (e. g. biricodar, tariquidar), cette stratégie semble avoir peu de valeur clinique dans la diminution des phénomènes de résistance, et d'importants effets secondaires (McGrogan *et al*, 2008).

2. Altération des microtubules

L'augmentation de la dynamique microtubulaire peut être à l'origine d'une résistance aux agents stabilisateurs comme les taxanes, car ces molécules se fixent sur des microtubules polymérisés (Orr *et al*, 2003). Deux modèles sont proposés pour expliquer la relation entre la dynamique microtubulaire et la résistance aux taxanes. Le premier, décrit par le laboratoire de Cabral, propose que les cellules résistantes au taxane contiennent des microtubules « hypostables ». L'équilibre entre dimères de tubuline solubles et polymères serait perturbé et basculerait vers les dimères (Minotti *et al*, 1991). Le deuxième modèle, de Jordan & Wilson,

propose que l'équilibre entre microtubules faiblement et hautement dynamiques soit déplacé vers un état très dynamique.

Deux grands mécanismes peuvent être à l'origine de la modification de la dynamique des microtubules : l'altération des sous-unités de tubuline (expression, mutation, modifications post-traductionnelles) et l'altération des MAPs (Orr *et al*, 2003).

A. Altération de la β -tubuline

Il existe 7 isoformes de β -tubuline. $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ exprimées dans les lignées humaines de cancer du sein (Berrieman *et al*, 2004; Wang *et al*, 2014a). Il existe peu de données associant des mutations du site de fixation des taxanes au niveau de la β -tubuline à la résistance à ces agents anticancéreux dans le cancer du sein (Murray *et al*, 2012). En revanche, l'expression aberrante de certaines isoformes est fortement associée à la résistance aux taxanes (Wang, 2014). Par exemple, une concentration plus élevée de paclitaxel est requise pour stabiliser des microtubules composés des isoformes $\beta 3$ et $\beta 4$ de la tubuline (Derry *et al*, 1997).

Un intérêt particulier est porté à l'isoforme $\beta 3$ de la tubuline. Sa surexpression induit une résistance au paclitaxel dans les cellules MCF-7, en perturbant la dynamique microtubulaire (Kamath *et al*, 2005). De plus, dans le contexte du cancer du sein, des études cliniques associent l'expression de cette isoforme à une résistance aux taxanes (Paradiso, 2005; Hasegawa *et al*, 2003) et à la survie globale des patientes (Dumontet *et al*, 2010). Collectivement, l'ensemble des données cliniques suggère que la tubuline $\beta 3$ pourrait être à la fois un marqueur pronostic et un marqueur prédictif de la réponse aux taxanes dans le cancer du sein, du poumon, de l'ovaire et de l'estomac (Sève & Dumontet, 2008; Hwang *et al*, 2013). Cependant de plus grandes études randomisées sont nécessaires pour confirmer la valeur pronostique et prédictive de la tubuline $\beta 3$.

B. Expression des MAPs

Les différences d'interactions entre MAPs (« microtubule-associated proteins ») et microtubules mènent à des effets opposés sur la sensibilité aux taxanes (Kavallaris, 2010). Une forte expression de Tau diminuerait la liaison du paclitaxel aux microtubules ce qui est associé à une diminution de la réponse tumorale au paclitaxel néo-adjuvant chez des femmes atteintes de cancer du sein (Rouzier *et al*, 2005). En revanche, le paclitaxel favoriserait l'interaction MAP2/microtubule ce qui potentialiserait la stabilisation des microtubules.

Ainsi, l'augmentation de l'expression de MAP2 est associée à une meilleure réponse tumorale au paclitaxel néo-adjuvant chez des patientes atteintes de cancer du sein (Bauer *et al*, 2010). La validation de l'intérêt des MAPs comme marqueur prédictif de la réponse aux taxanes nécessite des études cliniques de plus grande envergure.

Une autre MAPs, la stathmine, fréquemment surexprimée dans les cancers du sein, serait aussi impliquée dans la résistance aux taxanes (Alli *et al*, 2007). La stathmine fonctionne comme protéine de séquestration pour la tubuline et inhibe la polymérisation du fuseau mitotique. Son inhibition sensibilise la lignée cancéreuse mammaire BT-549 au paclitaxel (Alli *et al*, 2007).

Une meilleure compréhension de la régulation des nombreuses MAPs peut mener à l'identification de nouveaux mécanismes de résistances aux agents tubulo-affins. En effet, d'autres MAPs peuvent être impliquées dans la résistance aux taxanes (e.g. MAP4, les MAPs motrices dynéine et kynésine, les « plus-end tracking » protéines) (Greenberger & Sampath, 2006). Dans le but d'augmenter la sensibilité des agents tubulo-affins, il serait nécessaire d'avoir une vision globale qui intègre la co-expression des MAPs et des différentes isoformes de tubuline.

3. Perturbation des voies de signalisation

La suractivation de certaines voies de signalisation est fréquemment observée dans les cellules cancéreuses et peut moduler l'efficacité thérapeutique des taxanes via de nombreux processus : la régulation de l'expression de pompes d'efflux et d'enzymes impliquées dans le métabolisme des taxanes, la dynamique des microtubules, la régulation et le contrôle de la progression du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose (Noguchi, 2006).

Ainsi, la stratégie visant à combiner des inhibiteurs de la transduction du signal avec des agents cytotoxiques conventionnels permettrait d'améliorer l'efficacité de la réponse thérapeutique chez des patients qui n'y répondraient que faiblement. Cette partie se concentrera sur l'implication de HER2, PI3K/Akt et MEK-ERK1/2 dans la chimiorésistance aux taxanes.

A. La surexpression de HER2

Malgré l'absence de preuves cliniques claires et homogènes corrélant la résistance aux taxanes et la surexpression du récepteur HER2 dans le cancer du sein (Murray *et al*, 2012), la

combinaison docétaxel/thérapies anti-HER2 (e. g. trastuzumab, pertuzumab) améliore le contrôle des cancers du sein métastatiques surexprimant HER2 (Bullock & Blackwell, 2008). Dans des modèles précliniques de xénogreffe et *in vitro*, la combinaison trastuzumab/docétaxel exerce un effet cytotoxique synergique sur des lignées de cancer du sein surexprimant HER2 (Yu, 2001; Pegram *et al*, 2004).

Il existerait un lien fonctionnel entre la surexpression de HER2 et la transcription et/ou l'activité des pompes d'efflux (De Hoon *et al*, 2012). D'une part, la surexpression ectopique de HER2 dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 augmente l'expression de BCRP/ABCG2 (Chumsri *et al*, 2007). D'autre part, dans des modèles de cancers pulmonaires, le lapatinib (un inhibiteur tyrosine kinase de HER2) restaure la sensibilité des cellules cancéreuses à des agents cytotoxiques, effet associé à l'inhibition de l'activité du transporteur ABCB1 (Minami *et al*, 2012).

Il est également connu que la surexpression de HER2 mène à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires qui peuvent être impliquées dans la résistance aux taxanes. Par exemple, l'activation d'Akt résultant de la surexpression de HER2 confère un large spectre de résistance aux agents cytotoxiques dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 (Knuefermann *et al*, 2003). Par ailleurs, la surexpression de HER2 induit la transcription de p21. La protéine p21 s'associe et inhibe l'activation de Cdk1 par le paclitaxel, retarde l'entrée en mitose et prévient ainsi l'apoptose induite par le paclitaxel (Yu *et al*, 1998).

B. Signalisation PI3K/Akt

Décrite dans la première partie de l'introduction, cette voie de signalisation est associée à la survie et la prolifération cellulaire. L'inhibition de cette voie augmente l'efficacité des taxanes dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de PI3K (LY94002) augmente la mort cellulaire induite par le paclitaxel dans des lignées cancéreuses mammaires et ovariennes (MacKeigan *et al*, 2002; Hu *et al*, 2002; Kim *et al*, 2007; Clark *et al*, 2002). A l'inverse, la surexpression de PI3K et d'Akt protège les cellules de la mort induite par le paclitaxel (respectivement, Hu *et al*, 2002; MacKeigan *et al*, 2002). Le ciblage spécifique des PI3K de classe I semble exerce un effet synergique avec le docétaxel dans des modèles de cancers du sein (Wallin *et al*, 2012).

Plus récemment, il a été montré qu'une combinaison docétaxel/inhibiteur d'Akt (MK-2206) inhibe la prolifération cellulaire de manière synergique dans un large panel de lignées cancéreuses mammaires. La chronologie du traitement semble importante puisqu'un traitement docétaxel avant le traitement par l'inhibiteur d'Akt accentue l'efficacité de cette combinaison (Hirai *et al*, 2010).

Il a d'autre part été observé que le docétaxel pouvait induire des mécanismes de survie impliqués dans la résistance. Ainsi, dans un modèle cellulaire de cancer prostatique, le docétaxel induit l'activation d'Akt de manière dose-dépendante. Ce mécanisme de chimiorésistance est contrecarré par l'utilisation d'un double inhibiteur de PI3K/mTOR (NVP-BEZ235) augmentant l'apoptose induite par le docétaxel (Kosaka *et al*, 2011). Enfin, dans un modèle de lignée tumorale mammaire MCF-7, il a été montré que le paclitaxel induit l'expression de la survivine, protéine anti-apoptotique, via l'activation des voies PI3K/Akt et ERK1/2. L'inhibition pharmacologique de ces deux voies bloque l'expression de la survivine et augmente la mort cellulaire induite par le paclitaxel (Ling *et al*, 2004).

Ainsi, la voie PI3K/Akt semble être impliquée dans la chimiorésistance aux taxanes. Plusieurs essais cliniques de phase II combinant des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt aux taxanes sont actuellement en cours dans le cadre de cancers du sein localement avancés et/ou métastatiques (NCT01263145, NCT02423603, NCT01980277).

C. Signalisation MEK-ERK1/2

La voie ERK1/2 de par son rôle dans la survie et/ou dans la progression du cycle cellulaire est une voie de signalisation potentiellement impliquée dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses. De nombreuses études montrent que l'inhibition pharmacologique de la voie MEK-ERK1/2 augmente l'efficacité des taxanes. Largement démontrées *in vitro* (Seidman *et al*, 2001; MacKeigan *et al*, 2000; Yu *et al*, 2001; Yacoub *et al*, 2003; MacKeigan *et al*, 2002), ces données ont été confirmées sur des modèles pré-cliniques de xénogreffes (Yacoub *et al*, 2006; Haass *et al*, 2008; Holt *et al*, 2012) et un modèle *in vivo* de cancer pulmonaire (McDaid *et al*, 2005).

Il est également connu que les agents tubulo-affins activent cette voie de signalisation (Orr *et al*, 2003; McGrogan *et al*, 2008). D'autres agents perturbant les microtubules (e.g. colchicine, nocodazole) activent aussi cette voie de signalisation (Shinohara-Gotoh *et al*, 1991; Guo *et al*, 2012).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation de cette voie ne sont pas clairs. La fixation des taxanes aux microtubules semble être requise pour l'activation de ERK1/2 (McDaid & Horwitz, 2001b). Dans un modèle de mélanome, il a été montré que l'activation de la voie ERK1/2 par le docétaxel est dépendante des PKCs (Mhaidat *et al*, 2007a).

La littérature s'accorde à attribuer l'effet chimiosensibilisant du ciblage de MEK à une augmentation de l'apoptose induite par le docétaxel (MacKeigan *et al*, 2000; Yu *et al*, 2001; McDaid & Horwitz, 2001b). Un autre mécanisme de résistance a également été proposé. L'activation de ERK1/2 pourrait induire la phosphorylation de MAPs et augmenter l'instabilité des microtubules. Ainsi, inhiber cette voie favoriserait la polymérisation des microtubules et la liaison des taxanes aux microtubules (Shinohara-Gotoh *et al*, 1991; Orr *et al*, 2003). Plusieurs essais cliniques de phase II combinant des inhibiteurs de MEK aux taxanes sont actuellement en cours dans le cadre de cancers pulmonaires, de mélanomes et d'adénocarcinomes gastriques (NCT01750281, NCT01256359, NCT02449655).

4. Identification d'une signature moléculaire prédictive de la chimiorésistance aux taxanes?

En étudiant le profil d'expression génique dans une cohorte de 92 et de 68 patientes respectivement résistantes et sensibles aux taxanes, une équipe chinoise a identifié une signature de 20 gènes (nommée « TAXsig ») permettant de prédire la réponse tumorale aux taxanes (He *et al*, 2014). La méthode TAXsig a été re-validée par une méta-analyse de 4 cohortes différentes représentant un total de 659 patientes (He *et al*, 2014). TAXsig discriminerait efficacement et de manière reproductible les tumeurs chimiorésistantes des tumeurs chimiosensibles aux taxanes, de manière indépendante du sous-type et du grade des tumeurs. Ainsi, cette signature serait applicable à la majorité des patientes. Par ailleurs, la survie après chimiothérapie est étroitement associée au degré de chimiosensibilité des tumeurs (évalué par un score TAXsig).

Parmi les 20 gènes significativement régulés dans les cancers chimiorésistants, les auteurs de l'étude ont identifié 4 grands groupes associés à différentes fonctions cellulaires. Ci-dessous, les gènes que les auteurs ont associés à l'apoptose et à la prolifération cellulaire sont classés en fonction de leur niveau d'activation, correspondant à la quantité d'ARNm retrouvée dans les tumeurs résistantes. Des précisions sur les grandes fonctions protéiques associées à ces gènes sont également apportées (source NCBI gene et/ou UniProtKB).

+

TNFR10C code pour un récepteur de la famille « tumor necrosis factor » (TNF) sans domaine de mort cytoplasmique et donc incapable de transduire un signal d'apoptose via TRAIL. Ce récepteur fonctionnerait comme un récepteur antagoniste protégeant les cellules de l'apoptose.

GNAI3 code pour la sous-unité α protéine G (« guanine nucleotide α inhibiting activity ») impliquée dans la transduction du signal en aval de récepteurs transmembranaires.

ATF3 code pour facteur de transcription activateur de la famille « cAMP responsive element-binding protein » (CREB). ATF3 régule la transcription de plus de 30 gènes cibles. Il serait impliqué dans la réponse au stress cellulaire.

CDKN2C code pour un inhibiteur de cdk (p18) qui inhibe la formation de complexe Cdk4-6/cycline D de Cdk6 nécessaire à la transition G1/S. p18 induit un blocage du cycle cellulaire.

ATG9A code pour « Autophagy related protein 9A » qui est impliquée dans l'autophagie stimulée par des stress cellulaires tels que la carence en nutriments et l'hypoxie.

-

Dans la signature TAXsig, les auteurs ont également défini trois autres groupes de gènes qu'ils ont associés à : i) l'augmentation de la migration et l'invasion cellulaires dans les tumeurs résistantes (via les gènes *SATB2*, *GOLGA2*, *DTNA* et *TUBGCP3*), ii) la promotion de l'agressivité tumorale (gène *FGFR1* et *PDXK*) et iii) la transition épithélio-mésenchymateuse (*PRKCI* et *DCTN1*).

D'autres gènes dans la signature ne sont pas, aujourd'hui, directement liés à la chimiorésistance et à la progression tumorale. Il s'agit des gènes *DBI* (« GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein »), *TNPO2* (transportine 2), *TOR1A* (torsine 1A), *BTN3A3* (« butyrophilin subfamily 3 member A3 »), *NDUFA6* (sous-unité 6 du complexe alpha 1 de la NADH deshydrogénase) et *LSM6* (« U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated »).

Encadré 6. Points clés du chapitre « Chimiorésistance aux taxanes »

- ✓ Les protéines d'efflux de drogues sont un mécanisme de résistance non spécifique aux taxanes.
- ✓ L'altération de la dynamique des microtubules est un mécanisme de résistance associé aux agents tubulo-affins.
- ✓ La signalisation intracellulaire peut réguler la résistance associée aux protéines d'efflux et à la dynamique des microtubules.
- ✓ La perturbation de la signalisation intracellulaire constitue aussi un mécanisme de résistance en favorisant la survie cellulaire.
- ✓ Des essais cliniques de phase II combinant un taxane avec des inhibiteurs PI3K/Akt ou des inhibiteurs de MEK sont en cours.

Partie III. AGPI et chimiosensibilisation

Dans l'organisme, les acides gras sont principalement stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides et constituent une source importante d'énergie. Dans tous les tissus, ils sont présents en tant que constituants essentiels des membranes biologiques (sous forme de phospholipides et de glycolipides) où ils ont un rôle structural et un rôle fonctionnel en tant que précurseurs de médiateurs lipidiques bioactifs (eicosanoïdes). Ils agissent aussi comme modulateurs de l'expression de certains gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que les PPARs (« peroxisome proliferator-activated receptor ») (Guesnet *et al*, 2005). De par le renouvellement cellulaire, la composition des lipides membranaires n'est pas figée et est directement influencée par les acides gras provenant de l'alimentation. C'est un aspect important puisque la composition en acides gras des phospholipides membranaires est connue pour moduler, au sein des membranes cellulaires y compris au niveau des cavéoles (radeaux lipidiques), l'activité d'un grand nombre d'enzymes, de transporteurs et de récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire (Stillwell *et al*, 2005; Schmitz & Grandl, 2008).

L'acide docosahexanoïque (DHA, 22 :6n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5n-3) sont des acides gras polyinsaturés à longues chaînes, de la famille des oméga-3 (AGPI n-3LC, cette abréviation faisant référence au DHA et à l'EPA dans la suite du texte). La nomenclature (e.g. 22 :6n-3 pour le DHA) caractérise les acides gras en mentionnant successivement le nombre d'atomes de carbone (22), le nombre de doubles liaisons (6) et la position de la première double liaison numérotée à partir de l'extrémité méthyle (première insaturation du DHA portée sur le carbone 3) (**figure 26, DHA**). Cette dernière caractéristique permet de classer les AGPI en deux grandes familles, les AGPIs oméga 3 ou n-3 et les AGPIs oméga 6 ou n-6.

La synthèse *de novo* des AGPI n-3LC est possible à partir de l'élongation et de la désaturation de l'acide alpha-linolénique (18 :3n-3), acide gras essentiel. Cependant, dans l'organisme, l'efficacité de ce processus est limitée (Plourde & Cunnane, 2007) et les AGPI n-3LC sont apportés essentiellement par l'alimentation. Alors que l'acide alpha-linolénique est retrouvé dans les huiles végétales (e.g. colza, lin, soja), les AGPI n-3LC sont apportés par des produits de la mer comme les poissons gras (e.g. saumon, thon) (**figure 26**).

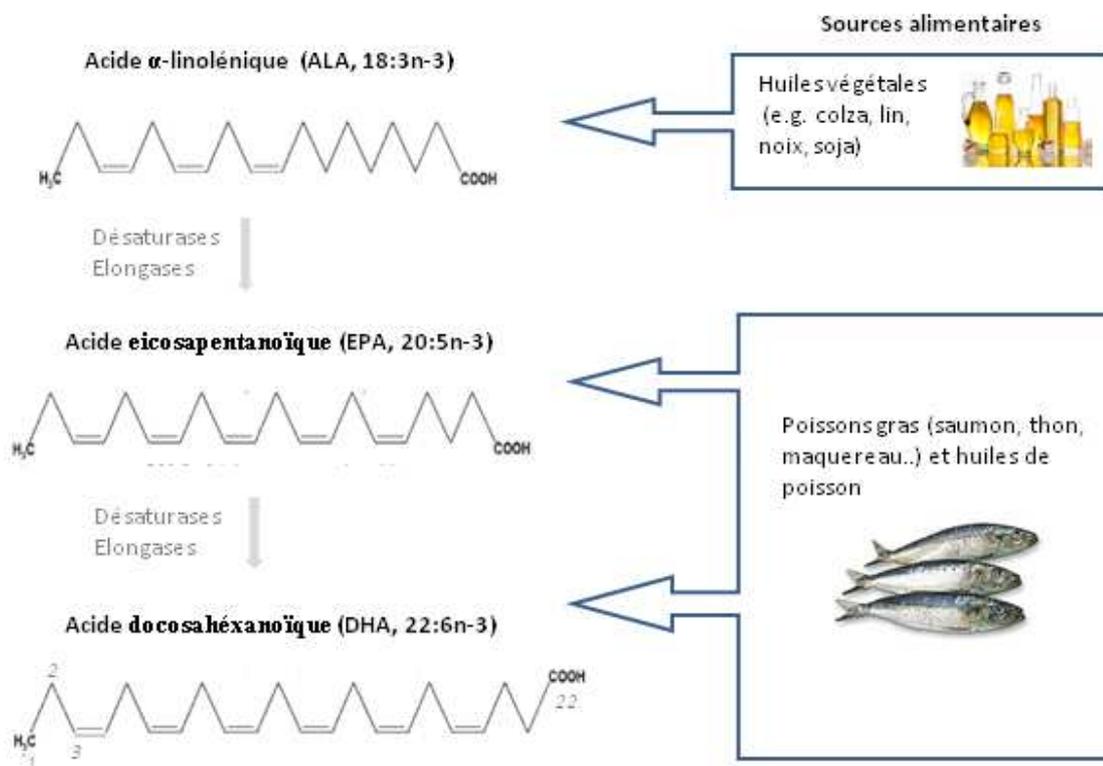


Figure 26. Structures et sources alimentaires des principaux AGPI n-3.

L'alimentation est la principale source d'acide alpha-linolénique (ALA), d'acide eicosapentanoïque (EPA) et d'acide docosahéxanoïque (DHA). La voie métabolique, représentée en gris, participe très peu à l'apport des AGPI n-3LC. Pour illustrer la nomenclature utilisée pour les acides gras, les carbones du DHA sont numérotés à partir de l'extrémité méthyle. Le DHA comporte 22 atomes de carbone, 6 insaturations dont la première est située entre le carbone 3 et le carbone 4 définissant ainsi son appartenance à la famille des AGPI n-3 (nomenclature 22 :6n-3).

Les AGPI n-3LC sont étudiés en cancérologie d'une part dans le contexte de la prévention (incidence et prévention de rechutes métastatiques), et d'autre part dans le contexte de la thérapie (Bougnoux *et al*, 2010a) :

- i) **AGPI n-3 et incidence du cancer du sein.** Le régime alimentaire est considéré depuis longtemps comme l'un des facteurs environnementaux contribuant au risque de cancer (Nkondjock & Ghadirian, 2005). Parmi les composants de l'alimentation, ce sont les lipides qui rendent le mieux compte de la variabilité entre différents pays des taux d'incidence des cancers en influençant leur cinétique d'apparition (Bougnoux *et al*, 2010a). L'étude du lipidome, déterminant le profil lipidique en acides gras du tissu adipeux mammaire, a été réalisée au laboratoire (Bougnoux *et al*, 2006). Dans cette analyse, un profil de tissu adipeux avec peu d'acide linoléique (LA, 18:2n-6), un rapport AGPI n-6/ AGPI n-3 faible, et de forts taux d'acides gras mono-insaturés est

associé à une diminution du risque du cancer du sein. Le rôle bénéfique du DHA reste controversé dans les études d'épidémiologie nutritionnelle (Chajès & Bougnoux, 2003; Chajès *et al*, 2008), ceci suggère que d'autres composants de l'alimentation tels que le rapport AGPI n-6/ AGPI n-3 (Chajès & Bougnoux, 2003), la présence d'agents antioxydants (Cognault *et al*, 2000) ou encore de caroténoïdes (Maillard *et al*, 2006), peuvent moduler l'effet des AGPI n-3 sur le risque de cancer du sein chez la femme. Cependant, une récente étude d'épidémiologie nutritionnelle de type Cas/Témoin portant sur 3000 femmes souligne l'importance de la consommation des AGPI n-6 et n-3 et du rapport AGPI n-6/AGPI n-3. Cette étude montre qu'une forte consommation d'AGPI n-6 associée à une faible consommation d'AGPI n-3 augmente le risque de cancer du sein (Khankari *et al*, 2015).

- ii) ***AGPI n-3LC et prévention des métastases.*** Peu d'études font référence à la prévention des métastases par les AGPI n-3LC et elles sont décrites sur des modèles animaux. Deux concernent des xénogreffes de cellules tumorales mammaires (Rose *et al*, 1995; Mandal *et al*, 2010) et une utilise un modèle syngénique de carcinome colique chez la souris (Hawcroft *et al*, 2012). Dans l'étude de Mandal *et al*, les métastases ostéolytiques sont diminuées par une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA. Sur le plan mécanistique, une diminution de l'expression de la protéine pro-métastatique CD44 est observée. Dans le modèle utilisant le carcinome colique, les métastases hépatiques sont diminuées par un régime enrichi en EPA, avec une diminution des PGE2 (prostaglandine E2) ainsi que du niveau de phosphorylation de ERK1/2.

- iii) ***AGPI n-3LC et traitement du cancer du sein.*** Une supplémentation nutritionnelle en acide gras peut également influencer sur le traitement des cancers en modulant la biologie de la tumeur (prolifération, apoptose, inflammation, vascularisation, migration, invasion) et en améliorant la réponse aux agents anticancéreux (Bougnoux *et al*, 2009; Sawyer & Field, 2010). Dans les chapitres suivants, les activités et les mécanismes d'action anti-tumoraux des AGPI n-3LC seront évoqués lorsqu'ils sont apportés seuls (activité propre) et lorsqu'ils sont combinés à des agents anticancéreux.

Chapitre 1. Effets des AGPIIn-3LC

Les mécanismes incriminés pour rendre compte des effets anti-tumoraux des AGPIIn-3LC sont multiples. Leur incorporation cellulaire n'est pas sélective et concerne l'ensemble des tissus. Ainsi, une supplémentation nutritionnelle en AGPIIn-3LC mène à leur distribution dans toutes les cellules du corps (Jump, 2002). De ce fait, les AGPIIn-3LC peuvent agir à la fois sur les cellules cancéreuses et sur le microenvironnement tumoral (e.g. vascularisation, système immunitaire, inflammation) (Sawyer & Field, 2010; Calder, 2013).

Dans les cellules mammifères, plusieurs niveaux d'activité des AGPIIn-3LC ont été décrits. Le premier se situe au niveau des membranes. En effet, les AGPIIn-3LC à longues chaînes sont retrouvés sous forme estérifiés dans les PL membranaires (Kuhl & Spector, 1970). Leur incorporation dans les phospholipides membranaires est considérée comme une étape essentielle à leurs effets biologiques. Ainsi, en modifiant la composition des membranes, ils peuvent modifier l'activité et la localisation de protéines de signalisation, de manière directe ou indirecte via la production de seconds messagers lipidiques. Le second niveau d'activité implique les formes libres des acides gras après libération enzymatique. Les AGPIIn-3LC peuvent soit i) être métabolisés et/ou perturber le métabolisme de l'acide arachidonique et ses dérivés eicosanoïdes soit ii) moduler l'expression génique de par leur fixation à des facteurs de transcription comme les récepteurs de la famille PPARs (Sawyer & Field, 2010).

1. Métabolisme enzymatique des AGPI

Dans la littérature, le mécanisme d'action anti-tumorale des AGPIIn-3LC le plus souvent rapporté est l'inhibition du métabolisme enzymatique des AGPIIn-6. Le métabolisme enzymatique des AGPI mène à la production d'eicosanoïdes et de docosanoïdes, médiateurs lipidiques bioactifs. Classiquement, les acides gras précurseurs des eicosanoïdes (métabolite à 20 carbones) sont l'acide arachidonique (AGPIIn-6) et l'EPA (AGPIIn-3) et pour les docosanoïdes (métabolites à 22 carbones), il s'agit du DHA (**figure 27**).

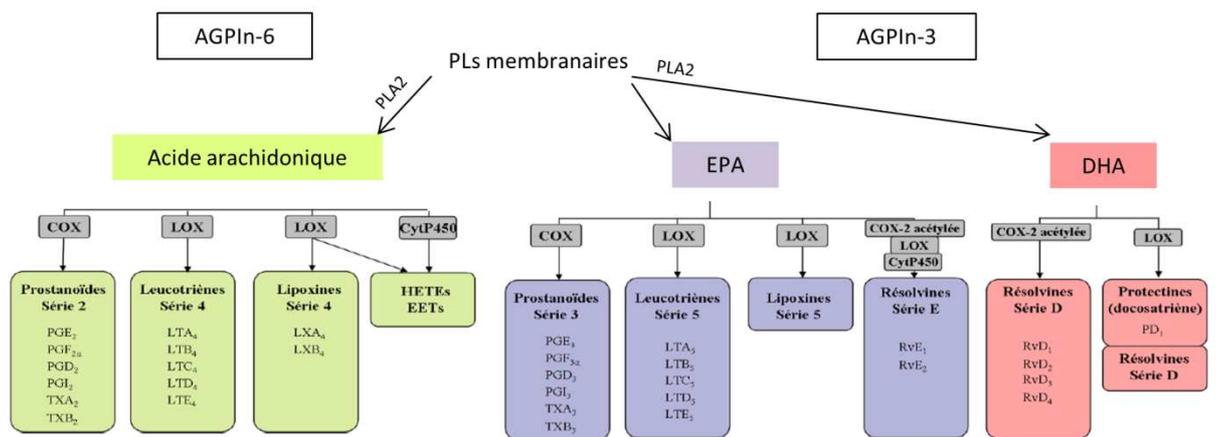


Figure 27. Résumé de la synthèse des eicosanoïdes et des docosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, de l'EPA et du DHA.

Modifié d'après (Greene *et al*, 2011). Les acides gras précurseurs des eicosanoïdes sont l'acide arachidonique et l'EPA libérés après hydrolyse enzymatique des phospholipides membranaires par la phospholipase A2. L'acide gras précurseur des docosanoïdes est le DHA. Notons que la voie de biosynthèse métabolique (désaturase/élongase) comme source d'acide gras précurseur est minoritaire et n'est pas représentée sur le schéma. Trois grands types d'enzymes sont impliqués dans la production et dans l'oxydation des AGPIs: les cyclooxygénases (COX), les lipooxygénases (LOX) et le cytochrome P450. Les médiateurs lipidiques produits diffèrent en fonction de la série des AGPI oxydés. Plus récemment, deux nouvelles familles de métabolites dérivés de l'EPA et du DHA ont été identifiées : les résolvines et les protectines. Les résolvines de la série D ne peuvent être synthétisées que par la COX2 acétylée. PLA2 :phospholipase A2 , EPA :acide eicosapentaénoïque, DHA :acide docosahénoïque COX :cyclooxygénase, LOX :lipooxygénase, cytP450 :cytochrome P450, PG : prostaglandine, PGI :prostacycline, TX :thromboxane, LT :leucotriène, LX :lipoxine, RvE :résolvine série E, RvD : résolvine série D, PD : protectine, HETE :acide gras hydroxylés, EET :acide gras époxydés.

Pour la synthèse de ces dérivés, les acides gras sont libérés des PLs membranaires par la phospholipase A2 et servent de substrats à trois grandes classes d'enzymes : i) les cyclooxygénases (COX) permettant la synthèse des prostanoides (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), ii) les lipooxygénases (LOX) synthétisant des leucotriènes et des lipoxines et, iii) les cytochromes P450 mono-oxygénases pour la synthèse des acides gras hydroxylés ou époxydés (Greene *et al*, 2011).

Les eicosanoïdes/docosanoïdes agissent comme messagers intracellulaires ou comme ligands paracrines et/ou autocrines de récepteurs couplés aux protéines G. Ils peuvent aussi se lier aux récepteurs nucléaires de la famille PPAR et moduler l'expression génique (Wymann & Schneider, 2008).

Physiologiquement, l'acide arachidonique (AA) est l'AGPI n-6 majoritaire dans les PLs membranaires et ses dérivés lipidiques sont connus pour être impliqués dans

l'inflammation (Calder, 2013). L'inflammation peut moduler une grande variété de processus favorisant l'initiation et la progression tumorales via des régulations paracrines et juxtacrines entre les différents types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral (Greene *et al*, 2011; Hugo *et al*, 2015). Ainsi, dans le cancer du sein, l'expression tumorale de COX2 est associée aux grades élevés, à la rechute métastatique et à la diminution de la survie des patientes (Hugo *et al*, 2015). En effet, la prostaglandine E2 (PGE2), principal produit métabolique de la COX2, régule des processus clés de la progression et de l'agressivité tumorale comme la survie, la prolifération, l'angiogénèse, l'invasion et les métastases (Greenhough *et al*, 2009; Hugo *et al*, 2015). De ce fait, des agents anti-inflammatoires tels que des inhibiteurs de COX2, inhibent la croissance tumorale en supprimant notamment l'inflammation et l'angiogénèse (Greene *et al*, 2011; Brandão *et al*, 2013).

Les eicosanoïdes/docosanoïdes dérivés des AGPI_n-3LC présentent des effets opposés à ceux dérivés des AGPI_n-6 (Sawyer & Field, 2010; Hardman, 2004; Tapiero *et al*, 2002; Greene *et al*, 2011). Physiologiquement, ces dérivés sont synthétisés suite à une phase d'inflammation aiguë pour générer une phase de résolution de l'inflammation en diminuant le recrutement des cellules immunitaires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF α , interleukine 1), en réduisant la douleur et en initiant la cicatrisation (Ji *et al*, 2011).

Une supplémentation nutritionnelle en AGPI_n-3LC diminue le niveau global des AGPI_n-6 incorporés dans les PLs membranaires (Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012). Alors que l'intégration du DHA dans les phospholipides s'effectue préférentiellement sur la position sn-2 du glycérol (Gu *et al*, 2013), la phospholipase A2 hydrolyse indifféremment les chaînes acyl (AGPI_n-6 ou n-3) en position sn-2 des phospholipides augmentant la libération d'acides gras n-3 par rapport aux n-6. Par conséquent, un apport nutritionnel en AGPI_n-3LC réduit la biosynthèse des eicosanoïdes dérivés de l'AA en faveur de ceux dérivés des AGPI_n-3LC (Sawyer & Field, 2010). De plus, des phénomènes de compétition entre substrats (AA *versus* EPA/DHA) pour l'action enzymatique des COX et des LOX ont été décrits (Sawyer & Field, 2010). Enfin, il a été montré qu'une supplémentation en AGPI_n-3LC peut aussi diminuer l'expression et/ou l'activité de COX-2 dans des modèles *in vivo* (Hamid *et al*, 1999; Szymczak *et al*, 2008).

2. Etude des AGPIIn-3LC sur la croissance tumorale et l'apoptose

Un grand nombre d'études ont été réalisées sur des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et dans des modèles précliniques de tumeurs mammaires. Des effets multiples d'une supplémentation en DHA ont été décrits sur la progression tumorale (Kang *et al*, 2010; Xue *et al*, 2014), la prolifération (Barascu *et al*, 2006; Blanckaert *et al*, 2010; Lu *et al*, 2010; Cao *et al*, 2012; Xue *et al*, 2014), l'apoptose (Kang *et al*, 2010; Blanckaert *et al*, 2010; Barascu *et al*, 2006; Cao *et al*, 2012; Xue *et al*, 2014), l'inflammation, la migration et/ou l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires (Mandal *et al*, 2010; Xue *et al*, 2014; Oh *et al*, 2010; Wannous *et al*, 2014).

L'ensemble des données s'accorde sur des effets anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, anti-migratoires et anti-invasifs. Cependant, il pourra être noté que, dans les expériences animales réalisées au laboratoire, les régimes nutritionnels apportant les AGPIIn-3LC ne sont pas capables de diminuer la croissance tumorale à eux seuls (Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012). Ces données soulèvent le problème des doses d'AGPIIn-3LC utilisées *in vitro* et *in vivo*, doses pouvant être incompatibles avec la physiologie ou une supplémentation nutritionnelle.

A. Mécanismes d'action

Les explications mécanistiques des multiples effets des AGPIIn-3LC restent souvent élusives. On peut distinguer quatre grands mécanismes par lesquels une supplémentation en AGPIIn-3LC peut influencer sur le comportement cellulaire pour induire une réponse biologique (Calder, 2012):

- i) un effet lié la production des métabolites eïcasanoïdes/docosanoïdes (oxydation enzymatique des AGPIIn-3LC décrite précédemment)
- ii) un effet lié à la peroxydation lipidique (oxydation directe des AGPIIn-3LC membranaires initiée par les espèces réactives de l'oxygène)
- iii) un effet direct des AGPIIn-3LC sur la signalisation et la transcription génique via des récepteurs intracellulaires (facteurs de transcription PPARs) ou des récepteurs à la surface cellulaire (e.g. GPR120, Oh *et al*, 2010)
- iv) un effet des AGPIIn-3LC lié à la modification de la composition des phospholipides membranaires (e.g. fluidité membranaire) avec de potentiels effets sur la signalisation cellulaire

Cependant, cette vue cloisonnée ne reflète pas la réalité puisque tous ces mécanismes peuvent être complémentaires et/ou interconnectés.

B. Perturbation de la signalisation intracellulaire et conséquences biologiques

En réponse à l'enrichissement en DHA et/ou en EPA, la modification de la signalisation intracellulaire peut conduire à la mort cellulaire, principalement par apoptose. L'apoptose induite par le DHA a été associée à l'inhibition fonctionnelle et/ou à la diminution de la quantité des protéines associées aux radeaux lipidiques comme le récepteur EGFR, les kinases PDK1, Akt, Src et la protéine chaperonne HSP90 (Schley *et al*, 2005, 2007; Rogers *et al*, 2010; Lee *et al*, 2014; Gu *et al*, 2013). Dans un modèle de cellules cancéreuses pulmonaires, le DHA induit l'apoptose en induisant l'expression de MKP1 ce qui est associé à une diminution de la phosphorylation des MAPK ERK1/2 et p38 (Serini *et al*, 2008). Dans un modèle de tumeurs mammaires autochones, l'augmentation de l'apoptose induite par un régime alimentaire présentant un fort ratio n-3/n-6 est associée à l'augmentation de l'expression de APAF1 (« apoptotic protease activating factor 1 ») et du ratio Bax/Bcl-2 (Jiang *et al*. 2012).

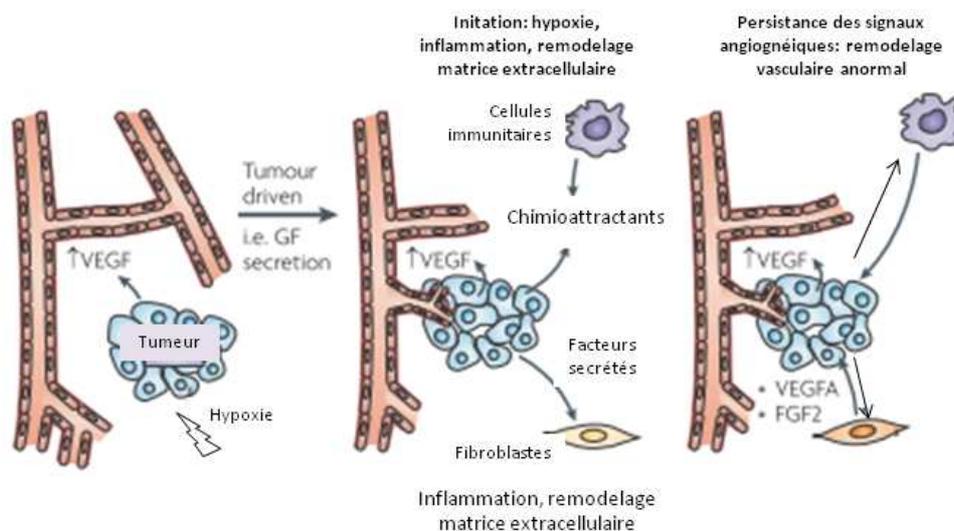
Dans une moindre mesure comparé à l'apoptose, le DHA a aussi été montré pour induire une mort cellulaire nécrotique (Shaikh *et al*, 2008). Enfin, il a été montré que le DHA induit aussi une mort cellulaire par autophagie en diminuant l'expression de p53 dans des cellules p53 « wild type » (Jing *et al*, 2011). Dans des cellules p53 mutée, le DHA induit une mort cellulaire par autophagie en produisant des ROS mitochondriales et en inhibant la voie Akt/mTOR (Shin *et al*, 2013). L'autophagie semble interconnectée avec l'apoptose car une inhibition de l'autophagie supprime l'apoptose induite par le DHA (Jing *et al*, 2011).

Une supplémentation en DHA mène également à une inhibition de la prolifération cellulaire dans de nombreux modèles de cellules cancéreuses. Dans un modèle de lignée cancéreuse mammaire (MD-MB-231), le DHA augmente la durée de la phase G2/M de manière dose dépendante. Cet effet est associé à une diminution de la phosphorylation de la cycline B1 et de l'expression de Cdc25c, ce qui mènerait à l'inhibition de l'activité du complexe cycline B1/cdk1 nécessaire à l'entrée en mitose (Barascu *et al*, 2006). L'effet anti-prolifératif du DHA a aussi été associé à l'inhibition d'Akt (Schley *et al*, 2005). Dans des lignées cancéreuses mammaires, la diminution de la viabilité cellulaire induite par le DHA est

associée à l'inhibition de la signalisation HER2/HER3 (Zou *et al.*, 2013) et à l'inhibition de PPAR β (Wannous *et al.*, 2013). *In vivo*, la diminution de la prolifération des cellules tumorales a été associée à la diminution de l'expression de la cycline D1, de P-Rb et à l'augmentation de l'expression de p21 et p27 (Jiang *et al.* 2012). D'autres auteurs associent l'inhibition de la croissance tumorale induite par un régime enrichi en AGPIIn-3 à l'inhibition des signalisations mTORC1/mTORC2 (Chen *et al.* 2014).

3. Etude des AGPIIn-3LC sur la vascularisation tumorale

Les cellules endothéliales et les péricytes, composants cellulaires des vaisseaux sanguins, répondent aux facteurs pro- et antiangiogéniques. Dans un contexte pathologique comme le cancer, le processus angiogénique physiologique est activé et exploité par la tumeur pour sa progression. Quand une lésion tumorale atteint 1-2mm², l'hypoxie déclenche un « switch angiogénique » orchestré par les cellules tumorales avec la participation des cellules stromales, et mène à la formation d'un réseau vasculaire tumoral anormal. La variété des facteurs pro-angiogéniques induit l'activation des cellules endothéliales, leur dissémination, leur prolifération, la formation de tubes vasculaires, ainsi que le recrutement de péricytes qui stabilisent les néovaisseaux.



Les cellules tumorales exploitent leur microenvironnement en libérant des facteurs de croissance et des cytokines pour activer les cellules stromales quiescentes (fibroblastes et cellules immunitaires) et initier une cascade d'événements qui deviennent rapidement incontrôlés. Les fibroblastes et les cellules inflammatoires du système immunitaire participent à créer un environnement pro-angiogénique en sécrétant de nombreux facteurs solubles. Les cellules vasculaires sont ainsi exposées à des signaux stimulateurs persistants et excessifs ce qui conduit à la formation d'un réseau vasculaire tumoral tortueux et irrégulier.

Encadré 7. Angiogenèse tumorale.

D'après (Weis & Cheresh, 2011). Schéma modifié d'après (Chung *et al.*, 2010).

Les AGPIIn-3 sont connus pour moduler l'angiogenèse tumorale (**encadré 1**). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence le potentiel anti-angiogénique des

AGPIIn-3LC. *In vitro*, les AGPIIn-3LC et leurs métabolites inhibent la prolifération, la migration, la formation de pseudocapillaires et la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales induites par un facteur pro-angiogénique, le VEGF (« vascular endothelial growth factor ») (Tsuzuki *et al*, 2007; Szymczak *et al*, 2008; Kornfeld *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2013). Ces données ont été confirmées *in vivo* chez le rongeur. Un régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC diminue la vascularisation tumorale dans plusieurs modèles de tumeurs mammaires (Rose & Connolly, 1999; Mukutmoni-Norris *et al*, 2000; Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012).

Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans l'effet anti-angiogénique des AGPIIn-3LC. Comme décrit précédemment, certains eicosanoïdes issus de l'acide arachidonique sont connus pour exercer des effets pro-angiogéniques (Greene *et al*, 2011). Ainsi, plusieurs études associent l'effet anti-angiogénique des AGPIIn-3LC à la modulation de la production d'eicosanoïdes, et plus particulièrement à l'inhibition de la voie COX2/PGE2 (Calviello *et al*, 2004; Szymczak *et al*, 2008). D'autre part, de manière plus directe, les AGPIIn-3LC peuvent diminuer l'expression de facteurs pro-angiogéniques (e.g. VEGF, MMP « métalloprotéinase matricielle ») et perturber la transduction des signaux intracellulaires induits par ces derniers (e.g. en modulant les signalisations du monoxyde d'azote NO, MAPK, NF-KB) (Spencer *et al*, 2009).

Encadré 8. Points clés du chapitre « Effets des AGPIIn-3LC »

- ✓ De fortes doses d'AGPIIn-3LC induisent une inhibition de la croissance tumorale.
- ✓ Les AGPIIn-3LC modifient la biologie de la cellule tumorale mais peuvent également moduler l'ensemble du microenvironnement tumoral.
- ✓ L'incorporation des AGPIIn-3LC dans les phospholipides membranaires modifie la signalisation intracellulaire.

Chapitre 2. Chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPI n-3LC

L'existence d'un lien entre l'efficacité de la chimiothérapie et l'apport alimentaire lipidique a été montrée pour la première fois par le Pr P. Bougnoux dans une étude regroupant 56 femmes atteintes de cancer du sein localement avancé, traitées par chimiothérapie néo-adjuvante (mitoxantrone, vindesine, cyclophosphamide et 5-fluorouracil) (Bougnoux *et al*, 1999). L'analyse de la composition lipidique du tissu adipeux mammaire a permis de mettre en évidence que l'efficacité de la chimiothérapie était meilleure chez les patientes présentant un plus fort taux d'AGPI n-3LC, et plus particulièrement de DHA.

Ces données suggéraient pour la première fois que la composition du tissu adipeux avoisinant la tumeur pouvait influencer la progression tumorale. La composition du tissu adipeux étant directement liée aux apports alimentaires lipidiques, une supplémentation nutritionnelle en lipides était susceptible d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Le tissu adipeux est un biomarqueur reflétant les apports alimentaires passés en acides gras consommés sur une période de temps assez longue. En effet, la composition en acides gras du tissu adipeux présente un renouvellement assez lent puisque la demi-vie des acides gras y est estimée à 2 ans (Sun *et al*, 2007). Potentiellement, les acides gras consommés étaient aussi susceptibles d'affecter la fraction phospholipidique des cellules tumorales qui présentent un renouvellement très rapide (Pardini, 2006).

La composition du tissu adipeux étant directement liée aux apports alimentaires lipidiques, le concept émergent de cette étude était qu'une supplémentation nutritionnelle en lipides riches en AGPI n-3LC était susceptible d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Les mécanismes d'action de ces lipides conduisant à la sensibilisation tumorale aux agents anticancéreux restaient à définir : était-ce la composition du tissu adipeux avoisinant la tumeur qui permettait cette sensibilisation, ou bien, la composition du tissu adipeux reflétait-elle la composition lipidique des tumeurs et des cellules tumorales ? Plusieurs études *in vitro* et des modèles précliniques ont été élaborés pour étayer ce concept, seules les études concernant le cancer du sein seront rapportées.

1. Données expérimentales in vitro

De nombreuses données rapportent que le DHA et/ou l'EPA augmente la cytotoxicité d'agents anticancéreux dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires. Les AGPI n-3LC augmentent l'efficacité de la doxorubicine (anthracycline), de la mitoxantrone (anthracènedione), du paclitaxel, du docétaxel et de la vinorelbine (agents tubulo-affins) (**figure 28**). La classe des agents thérapeutiques, les doses d'AGPI n-3LC et la durée de l'exposition de ces traitements influencent fortement l'effet sensibilisant des AGPI n-3LC. Dans des conditions comparables, l'effet sensibilisant du DHA semble augmenter avec le temps d'application et la dose (Germain *et al*, 1998; Menendez *et al*, 2005). Dans le même type cellulaire (MDA-MB-231), un traitement concomittant avec l'agent anticancéreux et le DHA mène à un effet sensibilisant maximal lors de longues expositions à la doxorubicine (supérieures à 4 jours) et à un effet sensibilisant minimal lors d'une courte exposition au docétaxel (24 h) (**figure 28**).

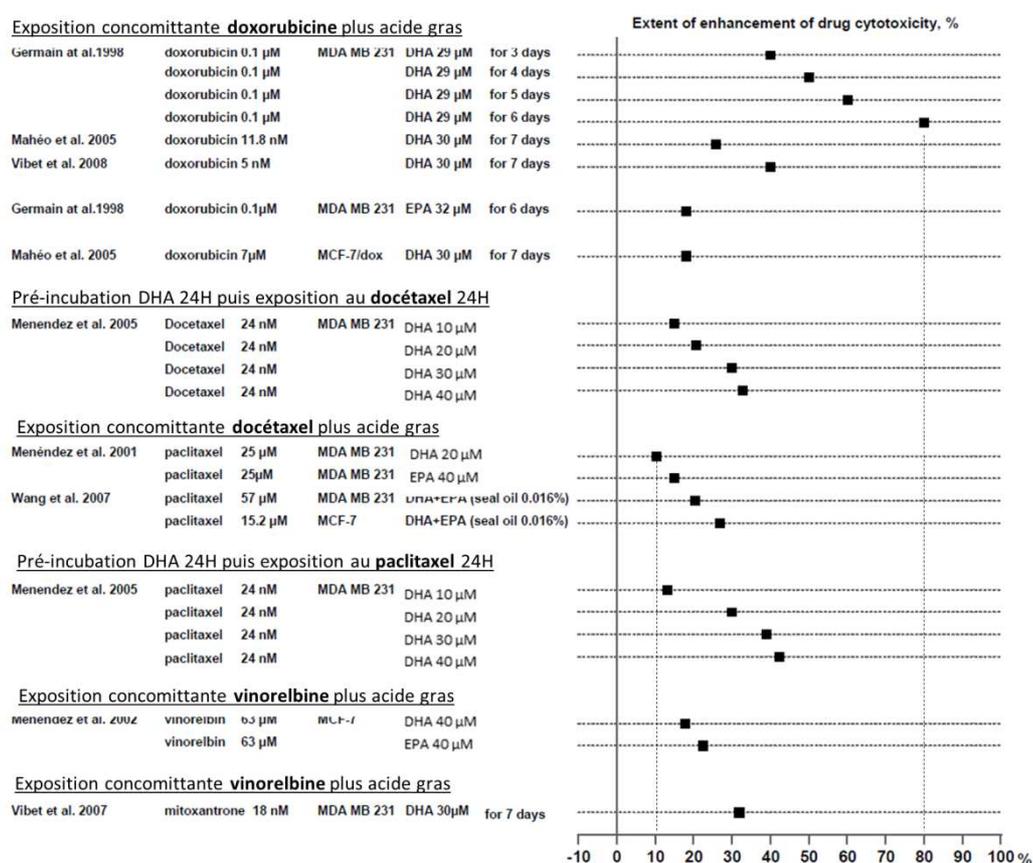


Figure 28. Le DHA et l'EPA potentialisent l'efficacité des chimiothérapies sur des lignées cancéreuses mammaires.

Modifié d'après (Hajjaji & Bougnoux, 2012). La cytotoxicité a été analysée en mesurant la viabilité cellulaire (test MTT, incorporation de thymidine ou test de clonogénicité). Le % d'augmentation correspond à la différence de viabilité cellulaire entre le traitement avec l'agent anticancéreux seul et la combinaison agent anticancéreux plus DHA ou EPA. (Germain *et al*, 1998), (Mahéo *et al*, 2005), (Vibet *et al*, 2008), (Menendez *et al*, 2005), (Menéndez *et al*, 2001), (Wang *et al*, 2007), (Vibet *et al*, 2008).

L'étude de Menendez *et al*. montre une action synergique du DHA sur l'efficacité du paclitaxel et du docétaxel dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 (Menendez *et al*, 2005). Cet effet est retrouvé dans d'autres lignées tumorales mammaires SK-Br3 et BT-474 surexprimant HER2 (Wang *et al*, 2007).

2. Données précliniques

L'effet chimiosensibilisant des AGPI ω -3LC a été exploré sur deux grands types de modèles animaux : des xénogreffes de cellules tumorales humaines sur des souris immunodéprimées et des tumeurs mammaires autochtones chimioinduites par le NMU (N-méthyl-nitroso-urée) chez des rates. Les AGPI ω -3LC apportés sous forme d'huile de poisson (e.g. menhanden) ou d'huile de micro-algue (e.g. DHASCO) augmentent l'efficacité de 4 grandes classes d'agents chimiothérapeutiques : les anthracyclines (épirubicine et doxorubicine, respectivement Colas *et al*, 2006; Hardman *et al*, 2001, 2002), les agents alkylants (mitocyne C et cyclophosphamide, respectivement Shao *et al*, 1995, 1997), un inhibiteur de topoisomérase (irinotecan, Hardman *et al*, 1999) et un taxane (docétaxel, Kornfeld *et al*, 2012) (**tableau 2**). Une supplémentation nutritionnelle en AGPI ω -3LC augmente aussi l'efficacité de la radiothérapie dans un modèle de tumeurs mammaires chimioinduites (Colas *et al*, 2004).

Deux acides gras n-3 à moyenne chaîne, l'acide 12-oxo-5,8,10-heptadécatriénoïque (KHT) et l'acide hexadeca-4,7,10,13-tétranoïque (16:4n-3) semblent se distinguer des AGPI ω -3LC à longue chaîne puisqu'ils induiraient une résistance aux sels de platine dans un modèle de cancer pulmonaire (Roodhart *et al*, 2011). Cette étude suggère que la supplémentation en AGPI ω -3LC au cours de la chimiothérapie doit être apportée par des compléments alimentaires de composition définie et idéalement pure en AGPI ω -3LC à longues chaînes (Vaughan *et al*, 2013). De plus, ces données soulignent l'intérêt de définir les mécanismes d'action moléculaire spécifiques des AGPI ω -3LC.

Classe	Chimiothérapie	Modèle animal	Régime nutritionnel ^a	Résultats	Références
Anthracycline	Epirubicine	Rat NMU	DHASCO (4% DHA/15% total) vs huile de palme	↑ Efficacité TT ↑ stress oxydant	Colas, 2006
	Doxorubicine	Xénogreffe MDA-MB-231	Huile de poisson (0.8% DHA+ 2.6% EPA/25% total) vs huile de maïs	↑ Efficacité TT ↓ vascularisation	Hardman, 2001
Alkylant	Mitocyne C	Xénogreffe MX-1	Huile de Menhanden (0.8%DHA+ 0.8%EPA/25% total) vs huile de maïs	↑ Efficacité TT ↑ Stress oxydant	Shao, 1995
	Cyclophosphamide	Xénogreffe MX-1	Huile de Menhanden (0.8%DHA+ 2.6%EPA/25% total) vs huile de maïs	↑ Efficacité TT Protection vs effets secondaires	Shao, 1997
Inhibiteur de topoisomérase	Irinitecan	Xénogreffe MCF-7	Huile de Menhanden (0.12%DHA+ 0.4%EPA/7% total) vs huile de maïs	↑ Efficacité TT Protection vs effets secondaires	Hardman, 1999
Taxane	Docetaxel	Rat NMU	Huile de poisson (2.5% DHA +1%EPA /15% total) vs huile de colza/cacahuète	↑ Efficacité TT ↓ vascularisation	Kornfeld, 2012

^a : % d'AGPI n-3 apportés par le régime nutritionnel par rapport au % de lipides totaux apportés.

Tableau 2. Chimiosensibilisation des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux par les AGPI n-3LC dans des modèles in vivo.

Modifié d'après (Hajjaji & Bougnoux, 2012). NMU : N-méthyl-nitroso-urée, DHASCO : DHA single cell oil.

En ce qui concerne les mécanismes d'action des AGPI n-3LC menant à l'augmentation de l'efficacité des agents anti-cancéreux, le stress oxydatif semble être impliqué dans l'augmentation de la sensibilité aux anthracyclines (Hardman *et al*, 2001, Colas *et al*, 2005) et à la mitomycine C (Shao *et al*, 1995). L'augmentation du métabolisme par les cytochromes P-450 serait responsable de la sensibilisation au cyclophosphamide (Shao *et al*, 1997). Les études du laboratoire ont rapporté une modification de la vascularisation tumorale dans les tumeurs mammaires supplémentées par les AGPI n-3LC, avant et durant le traitement par l'épirubicine ou le docétaxel (respectivement, Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012). L'ensemble de ces mécanismes sera détaillé dans le troisième chapitre.

Les AGPI n-3 sont incorporés dans les lipides des tissus tumoraux et non-tumoraux. De la même manière, la chimiothérapie est un traitement systémique qui ne permet pas de cibler spécifiquement la tumeur. Cependant, aucune des études précliniques mentionnées ci-dessus ne rapporte une augmentation des effets secondaires liés à la chimiothérapie. Au contraire, certaines études montrent même qu'une supplémentation en DHA et en EPA diminue les effets secondaires de la chimiothérapie (Hardman *et al*, 1999). La capacité des AGPI n-3 à augmenter spécifiquement l'efficacité des chimiothérapies au niveau de la tumeur en

préservant les tissus sains n'est à ce jour pas élucidée. Plusieurs mécanismes peuvent être suggérés tels que des mécanismes antioxydants moins efficaces ou des différences d'expressions protéiques (Hajjaji & Bougnoux, 2012).

3. Intervention nutritionnelle chez l'homme

En 2009, le Pr. Bougnoux a conduit une étude de phase I/II sur un groupe de 25 patientes atteintes de cancer du sein métastatique traitées par une chimiothérapie de première ligne néo-adjuvante (Bougnoux *et al*, 2009). Une supplémentation nutritionnelle avec 1.8g/jour de DHA, commencée une semaine avant le début du traitement par chimiothérapie, a perduré pendant les six cycles de chimiothérapie (soit 18 semaines). Un cycle de chimiothérapie correspond à une injection d'une combinaison thérapeutique « FEC » (5-fluorouracil, épirubicine, cyclophosphamide) une fois toutes les trois semaines.

Cette étude a montré que l'incorporation en DHA (mesurée dans les phospholipides du sérum) ne se faisait pas de manière identique chez toutes les patientes. En séparant les patientes selon leur taux d'incorporation en DHA, il a été montré que les patientes présentant un fort taux d'incorporation présentaient une médiane de survie (34 mois) plus importante que celles 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'anthracycline. Plus récemment, une étude randomisée a montré qu'une supplémentation en AGPI ω -3 est efficace dans la prophylaxie des neuropathies périphériques provoquées par le paclitaxel chez des femmes atteintes de cancer du sein (Ghoreishi *et al*, 2012).

Une augmentation de l'efficacité de la chimiothérapie (carboplatine plus vinorelbine ou gemtubicine) par une supplémentation en AGPI ω -3 a également été rapportée dans une étude de phase II chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (Murphy *et al*, 2011). Deux essais cliniques de phase II (NCT01019382 et NCT01870791) sont actuellement en cours, respectivement dans le contexte du cancer pancréatique avancé (chimiothérapie gemcitabine) et du cancer oesophago-gastrique (chimiothérapie épirubicine/oxaliplatine/ capecitabine) dans le but d'évaluer l'impact d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI ω -3 sur la réponse tumorale aux chimiothérapies.

Dans un contexte adjuvant aux chimiothérapies conventionnelles, d'autres études cliniques ont été conduites pour évaluer l'effet d'une supplémentation en AGPIIn-3LC sur des complications secondaires associées aux traitements anticancéreux. Ces études rapportent une prévention de la perte de poids et de muscle, une atténuation des effets secondaires, une diminution de l'inflammation systémique et une amélioration de la qualité de vie (Vaughan *et al*, 2013; Aguiar Pastore Silva *et al*, 2015).

Encadré 9. Points clés du chapitre « Chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC »

- ✓ L'incorporation des AGPIIn-3LC dans les phospholipides membranaires est associée à la sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents cytotoxiques.
- ✓ L'effet sensibilisant des AGPIIn-3 est observé chez l'homme par intervention nutritionnelle (1.8g de DHA/jour ou 2.2g d'EPA plus 0.5g de DHA/jour).
- ✓ En adjuvant des chimiothérapies, les AGPIIn-3LC peuvent contribuer à améliorer la qualité de vie des patients et à diminuer les effets secondaires.

Chapitre 3. Mécanismes impliqués dans la chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIn-3LC

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets sensibilisant aux traitements anticancéreux des AGPIn-3LC ne peuvent pas être considérés indépendamment de leurs effets propres cités dans le chapitre 1. Les AGPIn-3LC peuvent agir à la fois sur les cellules cancéreuses et sur le microenvironnement tumoral (e.g. vascularisation, système immunitaire, inflammation) (Sawyer & Field, 2010; Calder, 2013).

Plusieurs mécanismes de chimiosensibilisation ont été identifiés au niveau de la cellule tumorale : le captage intracellulaire de l'agent anticancéreux, la régulation des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et le stress oxydant. Le microenvironnement tumoral est également une cible d'action des AGPIn-3LC puisqu'un remodelage et une normalisation fonctionnelle de la vascularisation tumorale ont été observés.

1. Accumulation intracellulaire des agents anticancéreux

L'incorporation des AGPIn-3LC dans les PLs modifie les propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique. Les insaturations des chaînes acyls forment des « coudes » et augmentent l'espace intermoléculaire entre les molécules membranaires. De ce fait, les AGPIn-3LC augmentent la fluidité et la perméabilité membranaires (Sawyer & Field, 2010; Murray *et al*, 2015). Cela peut avoir un impact direct sur le captage des agents anticancéreux hydrophobes et/ou un effet indirect via la modification de l'activité des pompes d'efflux.

Ainsi il a été montré qu'une supplémentation en DHA augmente l'accumulation intracellulaire de la mitoxantrone et de la vincristine dans des lignées cancéreuses mammaires (Vibet *et al*, 2007). Par exemple, le DHA augmente l'accumulation intracellulaire de la mitoxantrone, phénomène associé à la chimiosensibilisation de la lignée MDA-MB-231 à cet agent. A l'inverse, le DHA n'augmente pas l'efficacité de la mitoxantrone dans les cellules MCF-7 et ne modifie pas non plus sa concentration intracellulaire (Vibet *et al*, 2007). Cet effet du DHA n'est pas généralisable et semble dépendant de l'agent anticancéreux (observé pour la vincristine, la doxorubicine et la mitoxantrone) et du type cellulaire (Bougnoux *et al*, 2010b).

Il existe peu de données dans la littérature concernant la diminution d'activité des pompes d'efflux par les AGPI n-3 dans les cellules résistantes. Au laboratoire, les études menées sur les cellules résistantes à la doxorubicine (MCF7dox) n'ont pas montré de modification de l'efflux de la doxorubicine dans les cellules supplémentées par le DHA (Mahéo et al, 2005). A l'inverse, d'autres études ont montré une diminution de l'efflux de la vincristine dans les cellules cancéreuses utérines résistantes (Das & Madhavi, 2011). Plus récemment, Gelsomino et al. ont montré qu'une supplémentation en AGPI n-3 modifie la composition des radeaux lipidiques dans des cellules résistantes de colon conduisant à une délocalisation des pompes d'efflux P-gp et MRP hors des radeaux, menant à une diminution de leur activité d'efflux (Gelsomino et al, 2013).

2. Modification du métabolisme des agents anticancéreux

Les AGPI n-3 ont été décrits comme régulant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Ainsi, une augmentation de l'activité des cytochromes P450 conduisant à la formation de métabolites actifs du cyclophosphamide a été rapportée dans un contexte de chimiosensibilisation par les AGPI n-3 *in vivo* (Shao et al, 1997). Cependant, là encore, cet effet n'est pas généralisable. Les AGPI n-3 semblent réguler différenciellement l'activité des cytochromes en fonction des modèles d'études et des isoformes de cytochrome P450 (Chen et al, 2001; Yao et al, 2006).

3. Stress oxydant

Un certain nombre d'agents anticancéreux sont connus pour induire un stress oxydant, tels que : les anthracyclines (e.g. doxorubicine, épirubicine), les dérivés de sel de platine (e.g. cisplatine, carboplatine), les agents alkylants (e.g. mytocine C, cyclophosphamide) et les inhibiteurs de topoisomérases (e.g. etoposide, irinotecan) (Conklin, 2004). Dans une moindre mesure, quelques études montrent que les taxanes peuvent également induire un stress oxydant (Conklin, 2004; Grand et al, 2014).

De par leurs nombreuses insaturations, les AGPI sont très sensibles au phénomène de peroxydation lipidique et sont des cibles privilégiées des radicaux libres générés par les agents anticancéreux. La peroxydation lipidique est une réaction qui se propage et qui mène à la formation d'aldéhydes (e.g. malondialdéhyde). Ces produits présentent une forte réactivité

pour les protéines, l'ADN et les phospholipides, et sont très délétères pour la cellule (e.g. inhibition de la synthèse d'ADN et de la croissance cellulaire, induction de la mort cellulaire) (Biondo *et al*, 2008; Sawyer & Field, 2010).

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication du stress oxydant dans l'effet sensibilisant des AGPIIn-3LC. Ainsi Germain *et al*. ont montré que l'effet chimiosensibilisant des AGPI à la doxorubicine est proportionnel à leur nombre d'insaturations et au taux d'hydroperoxydes lipidiques (Germain *et al*, 1998). L'effet chimiosensibilisant sur les anthracyclines est accentué en présence de pro-oxydants et diminué en présence d'anti-oxydants dans la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 (Germain *et al*, 1998) et dans les tumeurs mammaires chez l'animal (Colas *et al*, 2005). De plus, la sensibilisation des tumeurs mammaires à la mitomycine C par les AGPIIn-3LC est associée au taux de malondialdéhyde (Shao *et al*, 1995).

Plusieurs études *in vitro* montrent que le DHA diminue l'activité ou l'expression d'enzymes antioxydantes (Vibet *et al*, 2008; Ding *et al*, 2004; Ding & Lind, 2007). *In vivo*, une diminution des enzymes antioxydantes par un régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC a été rapportée dans les tumeurs mammaires, telles que la glutathion peroxydase ou la superoxyde dismutase (Vibet *et al*, 2008; Hardman *et al*, 2001, 2002).

Au niveau mitochondrial, le DHA est incorporé préférentiellement dans des phospholipides particuliers, les cardiolipines (Suzuki *et al*, 1997; Di Paola & Lorusso, 2006). Les cardiolipines enrichis en AGPIIn-3LC sont plus sensibles aux radicaux libres, et la peroxydation qui en résulte altère l'intégrité de la membrane mitochondriale et le métabolisme énergétique (Watkins *et al*, 1998). La voie intrinsèque de l'apoptose peut être alors induite avec la libération des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux (Sawyer & Field, 2010; Bayir *et al*, 2006). En réponse au stress oxydant généré par le DHA, l'induction de l'apoptose est rapportée dans des cellules leucémiques résistantes à l'arsenic trioxyde (Sturlan *et al*, 2003).

4. Signalisation intracellulaire

Les lipides membranaires peuvent moduler de nombreux processus cellulaires (e.g. prolifération, apoptose) via la perturbation de la transduction du signal (Escribá *et al*, 2015). Très peu d'études relient ces effets à la chimiosensibilisation aux agents anticancéreux.

La diminution de l'expression de HER2 par le DHA a été associée à l'augmentation de la cytotoxicité du docétaxel dans des lignées cancéreuses mammaires SK-BR3 et BT-474 (Menendez *et al.*, 2005). De plus, dans un modèle de cellules cancéreuses prostatiques, l'inhibition de la signalisation NF-KB par le DHA a été associée à l'augmentation de l'apoptose induite par le docétaxel (Shaikh *et al.* 2008).

Dans plusieurs lignées cancéreuses colorectales traitées par le 5-fluorouracil, l'oxaliplatine et l'irinotecan (Granci *et al.*, 2013)

5. Vascularisation tumorale

Dans des modèles de tumeurs mammaires autochtones *in vivo*, l'effet sensibilisant des AGPIIn-3LC est associé à une diminution de la vascularisation tumorale avant et pendant les chimiothérapies à base d'épirubicine (Colas *et al.*, 2006) ou de docétaxel (Kornfeld *et al.*, 2012).

L'apparente contradiction entre l'augmentation de l'efficacité de la chimiothérapie et la diminution de la vascularisation induite par les AGPIIn-3LC a été explorée par Kornfeld *et al.* selon le modèle de normalisation vasculaire proposé par Jain *et al.* (Jain, 2005). L'architecture vasculaire tumorale est de mauvaise qualité. Elle présente des vaisseaux très perméables et un flux sanguin hétérogène favorisant l'hypoxie et l'augmentation de la pression interstitielle, deux marqueurs de chimiorésistance (Jain, 2005). Dans des tumeurs mammaires portées par des rats ayant suivi un régime alimentaire enrichi en AGPIIn-3LC, il a été montré i) une diminution de la pression du liquide interstitiel après une injection de docétaxel, ii) une augmentation de l'extravasation du bleu evans et iii) une meilleure oxygénation. Ces données montrent que les AGPIIn-3LC améliorent la fonctionnalité de la vascularisation tumorale. Sur le plan mécanistique, les AGPIIn-3LC inhibent l'activation de la voie eNOS (monoxyde d'azote, NO synthase endothéliale) induite par le docétaxel, voie impliquée dans l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire. Ainsi, la diminution de la perméabilité vasculaire induite par les AGPIIn-3LC pourrait restaurer les mouvements de convections responsables de la distribution de l'agent anticancéreux et, de ce fait, améliorer sa distribution dans les tissus tumoraux.

Encadré 10. Points clés du chapitre « Mécanismes impliqués dans la chimiosensibilisation aux agents anticancéreux par les AGPIIn-3LC »

- ✓ Les AGPIIn-3LC peuvent modifier la quantité d'agents cytotoxiques actifs dans les cellules cancéreuses.
- ✓ De part leurs nombreuses insaturations, les AGPIIn-3LC sont sensibles à la peroxydation lipidique, ce qui potentialise l'effet des chimiothérapies impliquant le stress oxydatif.
- ✓ Peu de données associent la perturbation de la signalisation intracellulaire par les AGPIIn-3LC à leur effet chimiosensibilisant.

Contexte et objectifs généraux

La mortalité associée au cancer du sein résulte principalement de rechutes métastatiques et/ou d'une résistance aux traitements. La chimiothérapie est une arme thérapeutique incontournable au vue de l'hétérogénéité des cancers du sein. Largement utilisé dans le traitement du cancer du sein, le docétaxel (agent tubulo-affin de la famille des taxanes) est indiqué pour la chimiothérapie néo-adjuvante et adjuvante, de 1^{ère} ligne et de 2^{ème} ligne, y compris des cancers du sein métastatiques.

Les objectifs de cette thèse ont été établis à partir de précédents travaux menés au sein du laboratoire. Sur la base des résultats antérieurs, l'objectif général de cette thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires des AGPIn-3LC impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires au docétaxel.

Lors de deux précédentes études menées au laboratoire, il a été montré que les AGPIn-3LC étaient capables de sensibiliser les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux tels que la radiothérapie (Colas *et al*, 2004) et les anthracyclines (Colas *et al*, 2006). Dans ce contexte, les mécanismes de chimiosensibilisation des AGPIn-3LC sont associés au stress oxydant *in vitro* et *in vivo*. En effet, les AGPIn-3LC, du fait de leurs nombreuses insaturations, sont des cibles supplémentaires de l'action des thérapies anticancéreuses qui induisent un stress oxydant comme la radiothérapie et les anthracyclines.

Grâce à la technique d'échographie évaluant le flux sanguin intratumoral, un lien a été établi entre la vascularisation fonctionnelle et la réponse tumorale aux agents anticancéreux (Denis *et al*, 2003). En explorant cet aspect, l'étude de Colas *et al*. montre que les AGPIn-3LC diminuent la vascularisation des tumeurs mammaires avant le début de la chimiothérapie à base d'anthracycline (Colas *et al*, 2006).

L'effet des AGPIn-3LC en combinaison avec le docétaxel a été exploré dans le cadre d'une expérimentation animale (protocole décrit ci-après). Le régime nutritionnel enrichi en AGPIn-3LC augmente l'efficacité du docétaxel : une régression tumorale plus importante et des effets antiangiogéniques du docétaxel plus prononcés ont été observés par rapport au régime contrôle (Kornfeld *et al*, 2012). Afin d'orienter les recherches sur une piste moléculaire, l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans l'angiogenèse a été évaluée par puce à oligonucléotides. Cette étude montre une profonde diminution du gène de

l'épiréguline dans les tumeurs AGPIn-3LC/Docétaxel (Kornfeld, 2011, Thèse de doctorat). De plus, les mécanismes d'action des AGPIn-3LC sur les cellules tumorales restaient à définir.

Les tumeurs de l'expérimentation animale présentée ci-après ont été utilisées pour ces travaux de thèse. Une carcinogénèse mammaire a été chimioinduite par une injection sous-cutanée de N-méthyl nitrosourée (NMU) chez des rats femelles Sprague Dwaley âgées de 48 à 50 jours, période de maturation de la glande mammaire. Cet agent mutagène engendre la formation de tumeurs mammaires qui sont des adénocarcinomes et dont la croissance est dépendante des oestrogènes. Le profil moléculaire des tumeurs induites par le NMU se rapproche des tumeurs humaines avec l'expression de ER+, de grade faible et intermédiaire (Chan, 2005). La supplémentation alimentaire débute 2 jours après l'initiation de la carcinogénèse et perdure tout au long de l'expérimentation (**figure 29**). Elle apporte 15 % de lipides dont : i) 12% d'huile d'arachide et 3% d'huile de Colza pour le régime contrôle, ii) 8% d'huile d'arachide, 2% d'huile de colza et 5% d'huile de poisson pour le régime AGPIn-3LC. Le régime alimentaire enrichi en huile de poisson apporte au final 2.5g de DHA (2.5%) et 1.2g d'EPA (1.2%) pour 100g de régime (Vibet, 2008, Thèse de Doctorat).

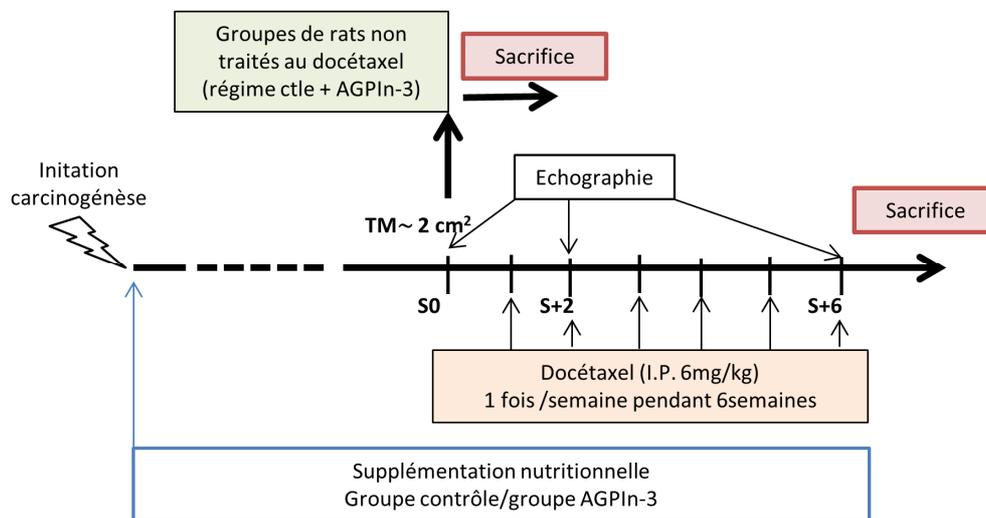


Figure 29. Chronologie de l'expérimentation animale.

D'après (Vibet, 2008, Thèse de doctorat). Après induction de la carcinogénèse, les rattes sont réparties aléatoirement dans un des deux groupes nutritionnels : contrôle ou huile de poisson apportant des AGPIn-3LC (DHA et EPA). Lorsque les tumeurs ont atteint une taille de 2 cm², les rattes pouvaient être incluses dans un protocole de chimiothérapie par le docétaxel pendant 6 semaines à raison d'une injection par semaine. Pour évaluer l'efficacité de la chimiothérapie, la taille tumorale a été évaluée de manière hebdomadaire. Un examen de la vascularisation par échographie a été réalisé avant le début de la chimiothérapie (semaine 0) puis après 2 et

6 semaines d'injections de docétaxel (S+2 et S+6). La dernière injection de docétaxel est réalisée à la 6^{ème} semaine (S+6), les rats ont été sacrifiés une semaine après. TM : tumeur mammaire, S : semaine.

Cette étude *in vivo* a montré que les AGPIIn-3LC sont capables de sensibiliser les tumeurs mammaires au docétaxel. Les AGPIIn-3LCLC apportés par l'alimentation augmentent la régression tumorale de l'ordre de 40% après six semaines de chimiothérapie avec le docétaxel. Cet effet est associé à une modification de la vascularisation des tumeurs mammaires avant et pendant la chimiothérapie (Vibet, 2008, Thèse de doctorat de l'Université de Tours). Ces résultats soulèvent aussi la question d'un effet direct des AGPIIn-3LC sur les cellules tumorales mammaires au cours d'une chimiothérapie avec du docétaxel. **Ainsi, l'objectif principal de mes travaux de thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires des AGPIIn-3LC impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires au docétaxel.**

A partir des tumeurs issues de cette expérimentation animale, l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse a permis d'identifier une cible moléculaire des AGPIIn-3LC, l'épiréguline (Kornfeld, 2011, Thèse de doctorat). **Le deuxième objectif de mes travaux a été d'établir un lien mécanistique entre la régulation de l'épiréguline par les AGPIIn-3LC et la sensibilisation des tumeurs au docétaxel.**

Matériels et méthodes

L'objectif de cette partie est d'apporter des informations complémentaires par rapport aux sections « matériels et méthodes » des articles, avec une description plus précise des techniques originales mises en œuvre pour ces travaux de thèse.

Chapitre 1. Culture cellulaire

1. Lignées cancéreuses mammaires

Plusieurs lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines ont été utilisées. Toutes sont des cellules cancéreuses épithéliales adhérentes issues d'adénocarcinomes mammaires métastatiques. Leurs principales caractéristiques phénotypiques sont présentées dans le tableau 3.

	SKBR3	MDA-MB-231	MDA-MB-468
Sous-type ^a	HER2 amp.	Basal	Basal
ER/PR ^a	-/-	-/-	-/-
HER2 exp ^a	forte	faible	Faible
PI3KCA ^b	WT	WT	WT
PTEN ^b	WT	WT	Mu (-)
RAS ^b	WT	KRAS Mu. (+)	WT
RAF ^b	WT	BRAF Mu(+)	WT
TP53 ^c	Mu (NF)	Mu (NF)	Mu (NF)

^A : d'après (Kao *et al*, 2009); le sous-type fait référence à la classification moléculaire de Pérou *et al*. 2001.

^B : d'après (Hollestelle *et al*, 2007)

^C : d'après « TP53 database »

Tableau 3. Principales caractéristiques des lignées cancéreuses mammaires utilisées.

Amp : amplifié, Lum : luminal, Mu (-): mutation inhibitrice, Mu(+) mutation activatrice, Mu (NF) : mutation non fonctionnelle, WT : wild type.

2. Culture primaire d'HUVECs : modèle *in vitro* pour l'étude de l'angiogénèse

Les cellules HUVECs (« Human Umbilical Vein Endothelial Cell », Promocell) sont des cellules de veine de cordon ombilical humain, issues d'un pool de donneurs. Ces cellules non immortalisées sont des cultures primaires et pour éviter toute dérive, elles ont été utilisées à de faibles passages (p3-4). Ces cellules sont cultivées dans du milieu M199 (Sigma)

supplémenté avec 20% de sérum de veau (Eurobio) décomplémenté (56°C pendant 30 min), 100 µg/mL d'héparine, 1% d'un mélange pénicilline/streptomycine (Lonza) et 50 mg/mL d'ECGS (« Endothelia cell growth supplement », Sigma).

Le nombre de cellulesensemencées est adapté à la surface du support de manière à ne pas dépasser 90% de confluence. Pour les expériences, les HUVECs sont sevrées dans un milieu M199 contenant 10% de SVF, 100 µg/mL d'héparine, 1% de pénicilline/streptomycine sans ECGS.

3. Purification du DHA pour l'utilisation en culture cellulaire.

Le DHA méthyl ester provient de chez Sigma (D2659). Il est purifié avant utilisation par chromatographie en couche mine (CCM) de manière à éliminer les peroxydes d'hydrogène, toxiques pour les cellules en culture.

Brièvement, le DHA est repris en hexane et déposé sur une plaque de silice. La migration s'effectue avec du chloroforme comme solvant de migration. Après séparation, le DHA est extrait de la silice par partition de phase (mélange éther/eau). La phase organique contenant le DHA est évaporée, et le DHA extrait est pesé. Il est repris dans de l'éthanol à une concentration finale de 150 mM et aliquoté dans des vials en verre ambré. L'éthanol est évaporé et les aliquots sont fermés sous azote. Les aliquots de DHA sont stockés à -80°C et utilisés pendant 3 semaines maximum.

En culture cellulaire, chaque traitement DHA s'effectue avec un nouvel aliquot qui est repris extemporanément en éthanol à 150 mM. La première dilution mère est effectuée dans du milieu de culture complet avec sérum, dans un tube en verre.

4. Transfection de siRNA

La technologie PepMute™ (SignaGen® Laboratories) repose sur la complexation entre les courts et doubles brins d'acides nucléiques (siRNA) et des peptides d'origine virale pénétrant dans les cellules mammifères. Cet agent de transfection a l'avantage de ne pas être lipidique et de moins perturber la membrane plasmique lors de la délivrance du siRNA à l'intérieur de la cellule.

La transfection se réalise sur des cellules à environ 60% de confluenceensemencées dans des flasques de 25 ou 75 cm² selon l'expérience. Le milieu de culture est remplacé, 30 min avant la transfection, par du milieu complet frais.

Pour permettre la formation de complexes de transfection, le tampon de transfection 1X, le réactif PepMute™ et le siRNA sont mélangés pour obtenir une solution de siRNA à 400 nM (avec un rapport de 20 µL de siRNA à 10 µM pour 10 µL de PepMute). Suite à une incubation de 15 min à température ambiante, les complexes de transfection sont appliqués dans du milieu complet sur les cellules pendant 4 h à la concentration finale de 40nM. Les cellules sont ensuite repiquées etensemencées sur différents supports de culture en fonction des expériences.

5. Test de chimiosensibilité au docétaxel

Les tests de chimiosensibilité sont réalisés sur 7 jours, à raison de 4 traitements par semaine (**figure 30**). Une semaine après l'ensemencement, la viabilité cellulaire est évaluée par un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium, 0.5mg/mL en milieu de culture complet) mesurant l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Après 30 min d'incubation à 37°C, les cristaux de formazan formés sont dissous dans le DMSO et la densité optique mesurée à 570nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage (condition traitée par rapport à la condition contrôle).

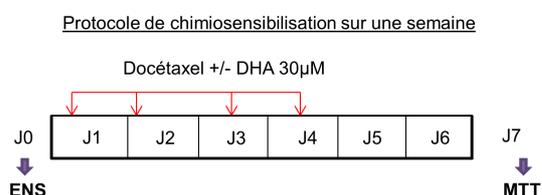


Figure 30. Protocole de chimiosensibilisation.

ENS : ensemencement.

Les doses de docétaxel utilisées (de 0.25 à 0.75 nM) correspondent à des doses menant à une toxicité cellulaire de 10 à 50 % sur la période de traitement. Ces doses ont été déterminées après établissement de courbes effet-dose avec une gamme croissante de concentrations de docétaxel.

Les concentrations de DHA (30 µM) et d'enzastaurine utilisées correspondent à des doses présentant un effet chimiosensibilisant maximum avec une toxicité acceptable (de l'ordre de 10 à 20%). Les cellules sont co-traitées par du DHA et/ou un inhibiteur pharmacologique et du docétaxel. Le premier traitement a lieu 24 h après l'ensemencement.

6. Activité enzymatique et incorporation de BrDu

Activité caspase 3/7 (« Caspase-Glo®3/7 », Promega, ref G8091). Les cellules sont cultivées en plaque 96 puits à raison de 1500 à 2000 cellules/puits. Les agents de traitements sont appliqués sur les cellules dans 50 µL. Après 24 h de traitement, 50µL de réactif Caspase-Glo sont ajoutés (incubation de 30 min à température ambiante, sous agitation, à l'abri de la lumière). 80 µL de surnageants sont transférés dans une plaque 96 puits à fond blanc pour une lecture par luminométrie (temps d'acquisition, 5 sec). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition de culture contrôle.

Activité kinase PKC (« PKC activity assay kit », Enzo life Science). L'activité kinase des PKCs est évaluée sur le lysat total de cellules MDA-MB-231 traitées, selon les recommandations du fabricant. Un traitement des cellules avec du phorbol ester est réalisé à chaque expérience et sert de contrôle positif.

Incorporation de BrDu (« Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric », Roche). Les cellules sont cultivées en plaque 96 puits à raison de 1500 à 2000 cellules/puits. Les cellules sont co-traitées par les différents agents étudiés et la BrDu (100 µM final) pendant 18 h. Selon les recommandations du fabricant, après élimination du milieu, les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé. L'anticorps anti-BrDu est utilisé au 1/200 et incubé pendant 2 h. Après l'étape de révélation (10 min), l'absorbance est mesurée à 450 nM. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition contrôle. Un contrôle positif est réalisé à chaque expérience (sevrage puis co-traitement SVF/BrDu).

Chapitre 2. Etude de la signalisation intracellulaire par Western blot

1. Conditions de culture cellulaire

Les doses de docétaxel utilisées ont été adaptées à la durée du traitement. Une dose de 1 nM de docétaxel a été utilisée pour un traitement aigu (15 à 60 min), et une dose de 0.75 nM

a été utilisée pour un traitement chronique (4 à 5 traitements, à raison d'un traitement par jour).

Pour les traitements chroniques, le nombre de cellulesensemencées a également été adapté de manière à obtenir le même ordre de confluence le jour de la récolte (environ 80 %). Cela se traduit par un nombre de cellulesensemencées 1,5 fois plus important pour la condition docétaxel et 2 fois plus important dans les conditions de « chimiosensibilisation » (docétaxel/DHA ou docétaxel/enzastaurine) par rapport à la condition contrôle.

Un sevrage en OPTI-MEM sans serum a systématiquement été réalisé 24 h avant la récolte. Les drogues testées sont ajoutées directement dans le milieu de culture pour les traitements aigus. Pour les traitements chroniques, l'avant dernier traitement est réalisé en OPTI-MEM. Classiquement, le jour de la récolte, les cellules sont placées en OPTI-MEM avec un agent de traitement (préchauffé à 37°C) pendant 2 h.

2. Lyse cellulaire et extraction protéique

Au moment de la récolte, les cellules sont délicatement lavées avec du PBS froid puis trypsinées. Toutes les étapes classiques (récolte des cellules, centrifugation, lyse cellulaire) sont réalisées sur glace ou à 4°C.

Lysats cellulaires totaux. Un tampon de lyse cellulaire de type RIPA « radioimmunoprecipitation assay buffer » est utilisé (50 mM Tris pH 7.4, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate) (Balko *et al*, 2009). Le tampon de lyse est supplémenté de manière extemporanée avec des cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma, ref. p5726).

Fractionnement subcellulaire. Les expériences de fractionnement subcellulaire ont été réalisées à l'aide du kit Subcellular Fractionation Kit (Pierce, Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant, avec quelques adaptations techniques :

- i) Tous les tampons sont supplémentés en inhibiteurs de phosphatase.
- ii) Avant le fractionnement, un comptage cellulaire permet de s'assurer d'un fractionnement identique et reproductible.
- iii) Entre chaque extraction, les culots cellulaires sont lavés avec du PBS froid afin de limiter les contaminations inter-fractions.

- iv) Les deux étapes de fractionnement nucléaire (fraction soluble et liée à la chromatine) ont été regroupées en une seule.

Cet outil permet un enrichissement protéique de la fraction cytosolique, membranaire (membrane plasmique et endomembranes), et nucléaire. La fraction cytosquelette n'a pas pu être analysée en routine sur les MDA-MB-231. En effet, même en partant d'un nombre de cellules supérieur à 4 millions, la viscosité et la concentration de l'échantillon obtenu restent problématiques.

3. Western blot

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrilamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de manière classique. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF. Deux techniques de transfert ont été utilisées : un système liquide et un système semi-sec. Le transfert liquide est particulièrement recommandé pour des protéines de haut poids moléculaires alors que le système semi-sec offre un transfert rapide recommandé pour les petites protéines.

Une technique simple permettant de vérifier l'homogénéité du transfert et d'évaluer la quantité globale de protéines dans chaque échantillon consiste à réaliser une coloration réversible au rouge Ponceau. La quantification par densitométrie de la coloration peut ensuite être utilisée comme contrôle de charge (Romero-Calvo *et al*, 2010).

Les cycles d'hybridations d'anticorps et de lavages sont réalisés de manière classique (hybridation sur la nuit à 4°C) Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau 5. Les anticorps secondaires utilisés couplés à l'HRP (« Horseradish peroxydase ») proviennent de chez Santa-cruz et sont utilisés au 1/10 000. La déshybridation des anticorps permet de ré-utiliser les membranes de PVDF pour un second cycle d'hybridation (classiquement pour un contrôle de dépôt). Après mise au point, le protocole le plus efficace consiste à incuber les membranes 30 min à 60 °C sous agitation dans un tampon contenant 62.5 mM de Tris pH6.7, 2% de SDS et 100 mM de β-mercaptoéthanol.

La révélation est réalisée par chimioluminescence. Le signal lumineux est capté à l'aide d'un imageur équipé d'une caméra CCD (« charge coupled device », MF-ChemiBis 3.2 Bio-Imaging system). L'imagerie digitale est un système qui offre une bonne sensibilité de détection et qui assure une linéarité entre l'intensité du signal et une large gamme de

concentrations protéiques, rendant la quantification plus précise et plus juste en comparaison avec un développement autoradiographique (GE Healthcare handbook).

Les images sont ensuite analysées et quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel MultiGauge V3.0 (Fujifilm). Les bandes de signal sont détectées de manière semi-manuelle puis le bruit de fond en est soustrait.

Anticorps	Référence	PM	dilution
Pan ERK1/2	Cst-4696	42/44 kDa	1/3000 (lait 3%)
P-ERK1/2 [thr202/tyr204 ERK1 et Thr185/tyr187 ,ERK2]	Cst-9101	42/44 kDa	1/3000 (lait 3%)
PKC ϵ	Sc-214	90 kDa	1/1000 (lait 3%)
PKC δ	Sc-937	78 kDa	1/1000 (lait 3%)
PKC α	Sc-208	80 kDa	1/1000 (lait 3%)
β -tubuline III	GTX102451	50 kDa	1/1000 (lait 3%)
MEK1/2	Cst-4694	45 kDa	1/1000 (lait 3%)
P-MEK1/2 (ser217/221)	Cst-9121	45 kDa	1/1000 (BSA 3%)
P-Ets1 (thr18)	Ab59179	50 kDa	1/1000 (lait3%)
Hsc70	Sc-7298	70 kDa	1/10 000 (lait 3%)
Pan Akt	Cst-9272	60 kDa	1/2000 (lait 3%)
P-Akt Ser473	Cst-4060	60 kDa	1/2000 (BSA 3%)
P-Akt thr308	Cst-13038	60 kDa	1/2000 (BSA 3%)

Tableau 4. Principaux anticorps primaires utilisés.

Cst : cell signaling technology, Sc :Santa-cruz, GTX : Genetex, Ab : Abcam.

Chapitre 3. Quantification de l'acide phosphatidique

La quantification des phospholipides totaux et l'analyse de leur composition en acides gras sont des techniques couramment utilisées au laboratoire par la plateforme de biochimie. En ce qui concerne la séparation et la quantification des phospholipides, le solvant d'élution utilisé jusqu'à présent ne permettait pas de quantifier l'acide phosphatidique qui co-élueait les

CLs. Une nouvelle technique a été développée pour les besoins de cette étude, elle est décrite dans le point 2.

1. Extraction des lipides totaux

Classiquement, les lipides totaux sont extraits à partir d'un culot cellulaire (minimum 10 millions de cellules). La technique de Bligh et Dyer (Bligh & Dyer, 1959) se déroule en deux étapes.

La première extraction permet de solubiliser les lipides et les composants non lipidiques (e.g. sucres, protéines) grâce à un mélange de solvant chloroforme/méthanol/eau (1 :2 :0.8, v/v/v). Après agitation et centrifugation (10 min à 1500 g), le surnageant est récupéré. Cette étape est à nouveau réalisée sur le culot pour assurer une extraction complète.

Avec la création d'une partition de phase, la deuxième étape permet de séparer les lipides des composants hydrophiles, en ajoutant sur les premières extractions un mélange de chloroforme et d'eau (1/1), les proportions de solvant permettent la formation d'une phase aqueuse. Après agitation et centrifugation (10 min à 1500 g), la phase organique contenant les lipides (phase inférieure) est récupérée. Pour éliminer les éventuelles traces d'eau, la phase organique est filtrée sur du sulfate de sodium anhydre et de la laine de verre. Les solvants sont évaporés et les lipides extraits sont pesés. Les lipides sont repris dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1). Les tubes sont fermés sous azote et stockés à -20 °C.

A partir de 10 millions de cellules, les quantités de lipides totaux extraits sont très faibles et la précision de la pesée peu fiable. Pour s'affranchir de ce problème et standardiser le dépôt sur plaque de chromatographie, le volume de reprise des lipides est ajusté en fonction du nombre initial de cellules.

2. Quantification des classes de phospholipides

Les lipides totaux sont séparés par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC). Contrairement à la méthode classique, des plaques de silice spécifiques (10x20cm, Merck) ont été utilisées pour améliorer la sensibilité et permettre la quantification du PA.

Après mise au point, une technique adaptée de Dreyfus *et al*, 1997 a permis la séparation et la quantification des différentes classes de phospholipides dont le PA (SM,

PC+PS, PI, PE, PA et CL), grâce à un éluant constitué d'un mélange éthanol/triéthylamine/chloroforme/eau (**figureXA**). On notera que la PC et la PS ne sont pas séparées, la hauteur de 10cm de la plaque de migration étant insuffisante. Avant élution et dépôt automatisé, les plaques de chromatographie sont imprégnées d'une solution éthanolique d'acide borique à 2.3%, puis séchées 30 min à 120°C.

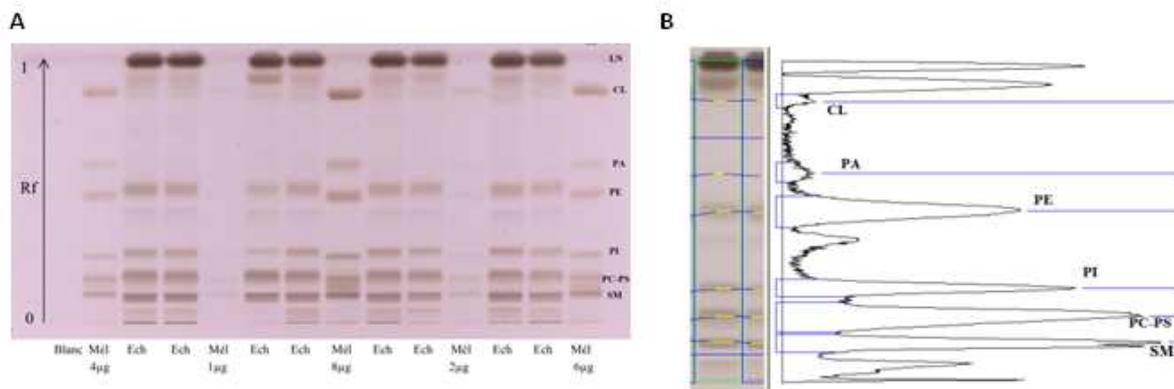


Figure 31. Quantification des phospholipides.

A_ Plaque HPTLC représentative après séparation des phospholipides dans des échantillons et carbonisation des lipides pour permettre une densitométrie. Six pistes sont consacrées au blanc et aux points de gamme nécessaires à la quantification des phospholipides dans les échantillons. B_ Chromatogramme obtenu après densitométrie d'un échantillon. Modifié d'après le rapport de stage de Morgane Bertrand. Mél : mélange de standards de PLs, Ech : échantillon, LN : lipide neutre.

Après la phase d'élution, la plaque est plongée dans une solution d'acide ortho-phosphorique et de sulfate de cuivre, les lipides sont carbonisés sur plaque chauffante et une photographie de la plaque (**figure 31A**, TLC-Visualizer, Camag) permet au logiciel de quantifier les tâches par densitométrie (VidéoScan, Camag), en les convertissant en pics chromatographiques (**figure 31B**). Le dépôt de quantités définies de standards de PLs (Sigma) permet de tracer une courbe d'étalonnage (aire du pic en fonction de la quantité) et de définir la quantité de chaque PL dans les échantillons. Les résultats sont exprimés en quantité relative (% de chaque PL par rapport à la masse totale des PLs sur chaque piste).

Chapitre 4. Mesure de l'expression génique

1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont isolés à l'aide du kit « Total RNA isolation Nucleospin RNAII » (Macherey Nagel), dont le principe d'isolement est la fixation des ARN sur une mini-colonne de silice. L'extraction s'effectue à partir d'un million de cellules au minimum.

Les ARNs extraits sont dosés par spectrophotométrie afin d'estimer leur concentration et de s'assurer de leur qualité. Les absorbances sont mesurées à 260, 280 et 230 nm. Les acides nucléiques (ADN et ARN) absorbent la lumière à 260 nm, ce qui permet de connaître leur concentration. En effet, une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg / mL d'ARN total. Le rapport des absorbances à 260 et 280 nm (absorbance des acides aminés aromatiques) reflète la contamination protéique, il doit être supérieur à 1,8. Le rapport des absorbances à 260 et 230 nm correspond au reflet de la contamination par les solvants d'extraction. Ce rapport doit être supérieur à 2 pour des ARN purs.

2. Transcription inverse des ARN en ADN complémentaire

La transcription inverse d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée par une ADN polymérase ARN dépendante (reverse transcriptase) en présence d'amorces oligonucléotidiques. L'hétéroduplex ARN/ADNc ainsi créé peut être utilisé, après sa dénaturation, comme substrat (ou matrice) pour une réaction de polymérisation en chaîne.

La transcription inverse en ADNc est réalisée grâce au kit « RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit » (Thermo Scientific, K1622) selon les recommandations du fabricant. Des amorces aléatoires sont utilisées afin d'assurer la rétrotranscription de tous les ARN sans distinction. Si les quantités d'ARN isolées le permettaient, la transcription inverse s'effectuait sur 2 à 5µg d'ARN.

3. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

L'amplification du fragment d'ADNc par une ADN polymérase (Taq polymérase) est suivie en temps réel grâce à la fluorescence émise par le SYBRGreen qui s'intercale dans l'ADN double brin.

A. Choix et validation des amorces de PCR

Après la conception d'amorces pour la PCR, plusieurs vérifications sont nécessaires afin de s'assurer du rendement de l'amplification, car une PCR ne pourra être quantitative que si l'amplification des séquences cibles (amplicon) présente une efficacité maximale de 2, c'est-à-dire si la quantité de l'amplicon double à chaque cycle.

Les banques de données permettent de connaître les séquences d'ADNc des gènes d'intérêt à amplifier (Consensus Coding Sequences Database, Nucleotide Database à partir du site du NCBI « National Center for Biotechnology Information »). Le logiciel Primer 3, gratuit en ligne (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) permet de construire plusieurs couples d'amorces à partir de la séquence d'ARN du gène d'intérêt, en fonction de critères imposés. La taille du fragment à amplifier (entre 80 et 200 bases), la taille des amorces (environ 20 nucléotides), le pourcentage de nucléotide G et C (entre 40 et 60%) et la température de fusion des amorces (proche de 60°C) permettent de sélectionner le couple d'amorces adéquat. La spécificité des paires d'amorces choisies est vérifiée à l'aide du logiciel Blast (BLAST pour « Basic Local Alignment Search Tool », <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ce logiciel permet, à partir des paires d'amorces choisies, de vérifier si ces amorces sont spécifiques de la séquence d'intérêt et non d'une autre séquence.

En réalisant une gamme d'ADNc (de 0 à 20ng), l'efficacité et la linéarité de Ct par rapport au logarithme de la concentration d'ADNc sont vérifiées pour chaque couple d'amorces. Les amorces validées pour nos conditions avec une efficacité située entre 1.9 et 2 sont présentées dans le tableau 5.

B. Méthode et analyse

La qPCR en temps réel est réalisée avec le SYBR Green Master Mix (Takara). Chaque puits contient 20µL d'un mélange réactionnel composé de : 1X de SYBR Green Master Mix, 0.5µM d'amorces sens et anti-sens, 5 ng d'ADNc. La quantité d'ADNc peut être adaptée en fonction de l'expression du gène (augmentée en cas de faible expression).

Le programme de températures utilisé est le suivant : 1 cycle de 30 sec à 95°C pour l'activation de la DNA polymérase puis 40 cycles d'amplification (15 sec à 95°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C) suivis de cycles pré-programmés pour la réalisation des courbes de fusion.

	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')
PKC ϵ (rat)	GAATGTTACCGTCGATGCG	GTTCTGGTCACAAGGGGAG
PKC δ (rat)	AACATTCGACGCCACATCT	TCCTCCTCACTACGCATGGA
DUSP1/MKP1 (rat)	GTGCCTGACAGTGCAGAATC	CCAGGTACAGGAAGGACAGG
DUSP4/MKP2 (rat)	GAAGATACCACAAGGCTGACA	GCAGTCCTCACTGCGTCTA
DUSP6/MKP3 (rat)	TCTCTGATCACTGGAGCCAAA	GTTTTGCCTCGGGCTTC
HPRT1 (rat)	GACCGTTCTGTCATGTCG	ACCTGGTTCATCACTAATCAC
RPL13A (rat)	CCCTCCACCCTATGACAAGA	GGTACTTCCACCCGACCTC
DUSP1/MKP1 (homme)	TCCAACGAGGCCATTGACTT	CCTGGCAGTGGACAAACAC
DUSP4/MKP2 (homme)	TGCATCCCAGTGGGAAGATAA	GCAGTCCTTACGGCATC
DUSP6/MKP3 (homme)	CGACTGGAACGAGAATACGG	GGAGAACTCGGCTTGGAACT
Epireguline (homme)	TGGTCTTCACTCAGGTCTCA	CGTGAGTTGGCATAGGGAAC
Amphiréguline (homme)	CGGAGAATGCAAATATATAGAGCAC	CACCGAAATATTCTTGCTGACA
EGF (homme)	AAGAATGGGGTCAACCAGT	TGAAGTTGGTTCATTGACC
TGF α (homme)	TTGCTGCCACTCAGAAACAG	ATCTGCCACAGTCCACTG
HB-EGF (homme)	TGGGGCTTCTCATGTTTAGG	CATGCCCACTTCACTTTCTC
β -celluline (homme)	ACTGCATCAAAGGGAGATGC	TCTCACACCTTGCTCCAATG
Neureguline 1 (homme)	CTCCTAGCCCCTTGAGGAT	GCTCGTACTCTGGGTCGTTT
Hprt1 (homme)	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	TATGTCCTGTTGACTGGT
Rpl13A (homme)	TGACCAATAGGAAGAGCAACC	AGATGCCCCACTCACAAGAT

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées en qPCR

NB : les amorces des gènes de la famille EGF utilisées pour l'étude de l'expression des ARNm dans les tumeurs mammaires de rats sont précisées dans le manuscrit.

Les résultats sont traités avec le logiciel MyIQ (Biorad). L'expression de chaque gène d'intérêt est normalisée par rapport à un gène de référence dont l'expression n'est pas modifiée en fonction des conditions (e.g. HPRT1, RPL13A) (Δ Ct). Les résultats peuvent être exprimés en $-\Delta$ Ct (expression génique dans les tumeurs mammaires) ou être quantifiés de manière relative par la méthode du $\Delta\Delta$ Ct (expression génique sur les modèles cellulaires *in vitro*). Cette méthode permet de déterminer l'effet d'un traitement (e.g. inhibiteur pharmacologique ou siRNA) sur l'expression d'un ARN messager spécifique. Le $\Delta\Delta$ Ct est calculé en soustrayant le Δ Ct de la condition contrôle à celui de la condition étudiée. La variation du nombre de copie du gène cible est déterminée par la valeur $Q = 2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Q est de 1 lorsque la quantité d'ARN n'est pas modifiée, supérieur à 1 dans le cas d'une surexpression et inférieur à 1 pour une sous-expression.

Chimiosensibilisation des cellules tumorales mammaires au docétaxel par les AGPIIn-3LC

Chapitre 1. Démarche scientifique

Collectivement, les données du laboratoire suggèrent que les AGPIIn-3LC répondent au besoin d'augmenter l'efficacité des chimiothérapies sans majorer les effets secondaires (Colas *et al*, 2004, 2006; Bougnoux *et al*, 2009; Kornfeld *et al*, 2012). Dans un modèle de tumeurs mammaires autochtones chez des rats, nous avons montré qu'une supplémentation du régime alimentaire en AGPIIn-3LC potentialise l'efficacité de la chimiothérapie docétaxel. Le but de cette étude a été d'identifier le mécanisme de chimiosensibilisation des AGPIIn-3LC au docétaxel afin d'apporter des arguments mécanistiques supplémentaires pour appuyer l'utilisation clinique des AGPIIn-3LC en tant que molécules adjuvantes aux agents anticancéreux.

Le docétaxel est un agent tubulo-affin qui mène à une mort cellulaire, classiquement après un blocage des cellules en G2/M. Dans ce contexte, l'activation aberrante des voies de survie et de prolifération constitue un mécanisme de chimiorésistance au docétaxel (Clark *et al*, 2002; Yasumizu *et al*, 2014; McDaid *et al*, 2005; Mhaidat *et al*, 2007b).

Des études *in vitro* ont montré que le docétaxel active la voie de signalisation MAPK/ERK1/2 impliquée dans la survie et la prolifération cellulaires (Okano J & Rustgi, 2001; Mhaidat *et al*, 2007b; Jeong *et al*, 2010). Nous nous sommes particulièrement intéressés à cette voie, dont l'inhibition est associée à une chimiosensibilisation au docétaxel (Yacoub *et al*, 2006; Haass *et al*, 2008; Holt *et al*, 2012; McDaid *et al*, 2005).

Les mécanismes d'activation de cette voie ne sont pas clairs. Dans un modèle de mélanome, il a été montré que le docétaxel active la voie ERK1/2 de manière dépendante des PKCs (Mhaidat *et al*, 2007a). Les isoformes de la famille des nouvelles PKCs, la PKC ϵ et la PKC δ , sont impliquées dans la chimiorésistance (Mhaidat *et al*, 2007a; Ding *et al*, 2002; Diaz Bessone *et al*, 2011) et/ou dans l'activation de ERK1/2 (Mhaidat *et al*, 2007a; Jackson & Foster, 2004; Grossoni *et al*, 2007). De plus, il a été montré que le docétaxel induit une production d'acide phosphatidique et de DAG dans un modèle cellulaire de cancer myéloblastique (Maestre *et al*, 2003).

Les AGPI_n-3LC, en s'incorporant dans les membranes, sont susceptibles d'interférer avec ces voies de signalisation intracellulaire. Notre hypothèse de travail a été que le DHA augmentait la sensibilité des cellules tumorales mammaires au docétaxel en régulant les voies de signalisation impliquées dans la résistance au docétaxel.

Les voies de signalisation intracellulaire étant largement interconnectées, l'exploration conjointe des signalisations MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt a été réalisée, ces deux voies étant associées à des phénomènes de chimiorésistance aux taxanes (Yasumizu *et al*, 2014; Clark *et al*, 2002; Yacoub *et al*, 2006; Holt *et al*, 2012).

Chapitre 2. Résultats

Cette partie présente les principaux résultats de l'article "Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating PKC ϵ - δ /ERK and Akt" soumis pour publication dans le journal Biochemica et Biophysica Acta « Molecular and Cell Biology of Lipids ». Cette partie est complétée par des résultats complémentaires non soumis pour publication. D'autres résultats complémentaires présentant un intérêt pour la discussion seront présentés dans un deuxième temps, à la suite de l'article.

Une étude *in vitro* préalablement réalisée au laboratoire a mis en évidence l'augmentation de la sensibilité des cellules mammaires MDA-MB-231 à la doxorubicine par une supplémentation du milieu de culture avec 30 μ M de DHA pendant 6 jours (Germain *et al*, 1998). Ces conditions de chimiosensibilisation ont été transposées au docétaxel. La concentration de DHA utilisée (30 μ M) correspond à une dose présentant un effet sensibilisant maximal avec une toxicité acceptable de l'ordre de 10 à 20%. Nous avons montré qu'une supplémentation du milieu de culture avec 30 μ M de DHA augmente la sensibilité au docétaxel de plusieurs lignées cellulaires de phénotypes différents (MDA-MB-231, MDA-MB-468, SkBr3) (**figure 32_Courbes de chimiosensibilisation**). En effet, en présence de DHA, l'EC50 du docétaxel est diminué de 35% dans les MDA-MB-231 (** $p < 0.01$), de 24% dans les MDA-MB-468 (* $p < 0.05$), de 38% dans les SKBR3 (* $p < 0.05$).

Nous avons étudié l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK1/2 dans différents modèles cellulaires traités par le docétaxel (MDA-MB-231, MDA-MB-468, SkBR3). Le docétaxel induit la phosphorylation de ERK1/2 (P-ERK1/2) dans les lignées cancéreuses mammaires. Une supplémentation du milieu de culture avec du DHA bloque l'activation de ERK1/2 induite par le docétaxel dans les lignées MDA-MB-231, MDA-MB-468 et SKBR3 (**figure 32B_Statut de phosphorylation de ERK1/2**). L'inhibition de ERK1/2 par le DHA semble associée à la chimiosensibilisation des cellules cancéreuses mammaires au docétaxel.

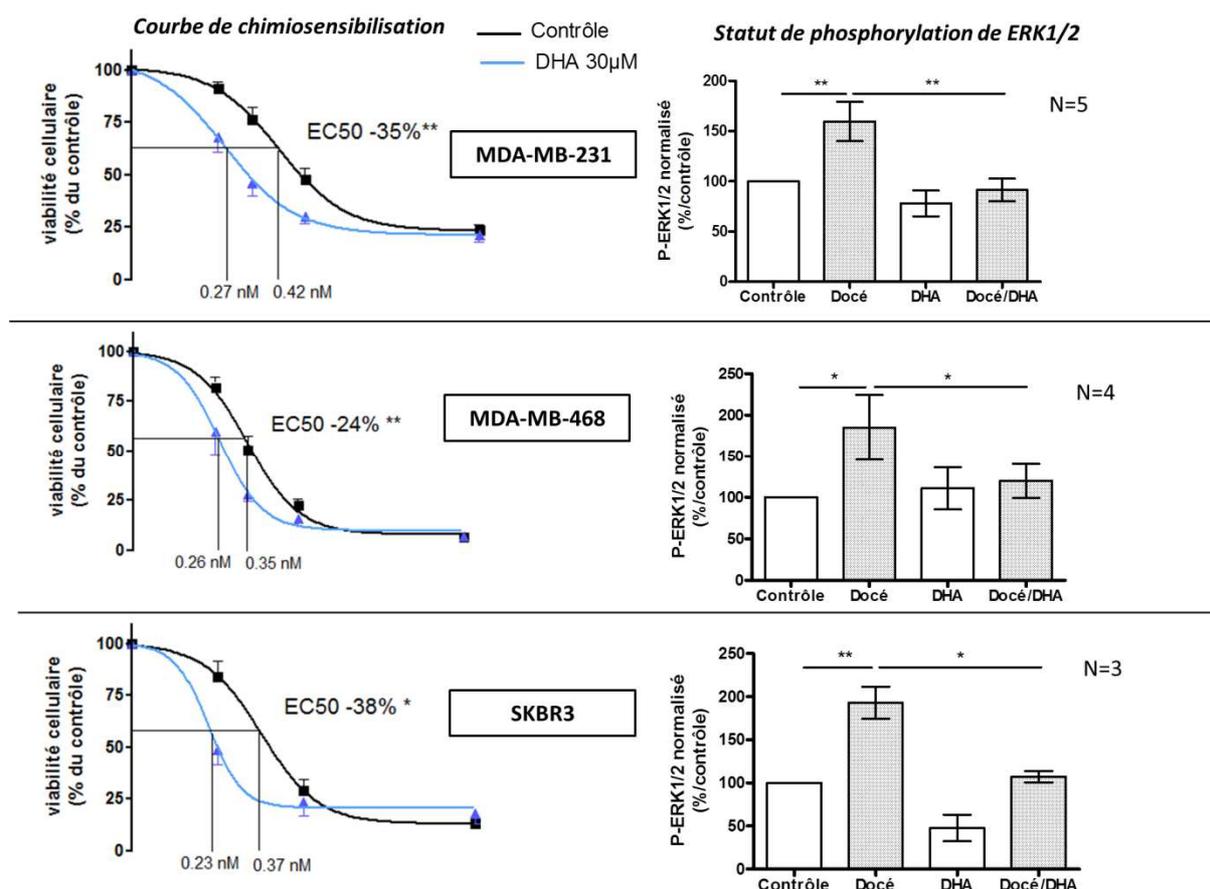


Figure 32. Chimiosensibilisation au docétaxel et régulation de ERK1/2 par le DHA sur un panel de lignées cancéreuses mammaires.

Courbe de chimiosensibilisation sur 7 jours (voir matériels et méthodes) Les EC50 sont comparés par le logiciel (F test) (pour chaque dose, $n \geq 3$, moyenne \pm SEM). **Statut de phosphorylation de ERK1/2** (thr202/tyr204 / thr185/tyr187). Les cellules sont co-traitées pendant 4 jours avec du docétaxel (0.5-1 nM) et du DHA (30µM). Le lysat total est analysé par western blot puis les résultats sont quantifiés par densitométrie (moyenne \pm SEM, test Mann-Whitney). $p \leq 0.05^*$, $p \leq 0.01^{**}$.

Le modèle cellulaire MDA-MB-231, fortement chimiosensibilisable par le DHA, a été utilisé pour poursuivre l'étude.

Notre stratégie expérimentale a été d'explorer le mécanisme d'activation de la voie ERK1/2 par le docétaxel afin d'identifier, dans un second temps, des cibles potentiellement régulées par le DHA. Nous avons identifié deux cinétiques d'activation de ERK1/2 par le docétaxel :

- i) une application aiguë de docétaxel (un traitement) est associée à une augmentation transitoire de P-ERK1/2, traduisant son activation transitoire (**figure 33-A1**). L'induction de P-ERK1/2 par le docétaxel est retrouvée dans tous les compartiments subcellulaires analysés par fractionnement (membrane, cytosol, noyau) (** $p < 0.01$) (**figure 33-A2**). Une expérience préliminaire montre que le

docétaxel induirait aussi la phosphorylation de ERK1/2 dans la fraction cytosquelette (n=1, non montré).

- ii) une application chronique de docétaxel (cinq jours de traitement) est associée à une activation persistante de ERK1/2 (**figure 33-B1**). L'induction de P-ERK1/2 par le docétaxel est retrouvée dans le compartiment membranaire (**p<0.001) et nucléaire (**p<0.001). Le docétaxel induirait aussi la phosphorylation de ERK1/2 dans la fraction cytosquelette (n=2, non montré).

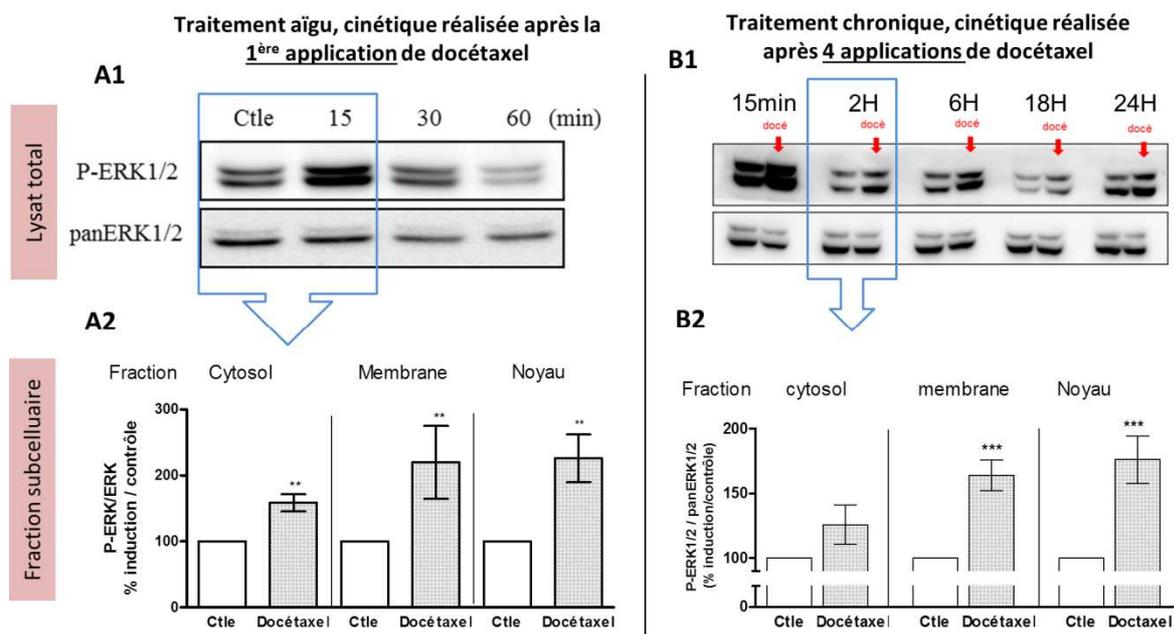


Figure 33. Cinétique d'activation de ERK1/2 par le docétaxel et distribution subcellulaire de P-ERK1/2

A_ Traitement aigu, une application de docétaxel (1 nM). (A1) Cinétique réalisée sur lysat total, WB représentatif, n=3. (A2) Fractionnement subcellulaire réalisée après 1 traitement de 15 min de docétaxel (moyenne +/- SEM, n=6). **B_** Traitement chronique, 4 applications de docétaxel (0.75 nM). (B1) Cinétique réalisée sur lysat total, WB représentatif, n=3. (B2) Après 4 traitement de docétaxel, le fractionnement cellulaire est réalisé après 2H d'application de docétaxel (moyenne +/- SEM, n=6). Test statistique Mann-Whitney, p<0.01**, p<0.001***). Ctle : contrôle, min : minute, H : heure.

Dans notre modèle cellulaire, l'activation de ERK1/2 par le docétaxel est dépendante de l'acide phosphatidique (PA), du DAG et de l'activation des PKCε/δ. En effet, nous montrons dans un premier temps que le docétaxel induit une production de PA concomitante à l'activation transitoire de ERK1/2 (**figure 34A**). Le PA, en tant que second messenger lipidique, peut rapidement être converti en DAG. L'inhibition de la conversion de PA en DAG (propranolol, Maestre *et al*, 2003) comme l'inhibition de la conversion de DAG en PA

(inhibiteur de DAG kinase) contrecarre l'activation de ERK1/2 par le docétaxel (**figure 34B**). Ces résultats suggèrent qu'un équilibre entre la production de PA et celle de DAG est nécessaire pour l'activation de ERK1/2 par le docétaxel. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de l'activité kinase de MEK1/2 (PD98059) et de PKCs (enzastaurine) bloque P-ERK1/2 induit par le docétaxel (**figure 34C**). Enfin, nous avons identifié les PKC ϵ/δ comme responsables de la phosphorylation de ERK1/2 induite par le docétaxel. Leur inhibition spécifique par ARN interférents bloque P-ERK1/2 induit par le docétaxel (**figure 34D**).

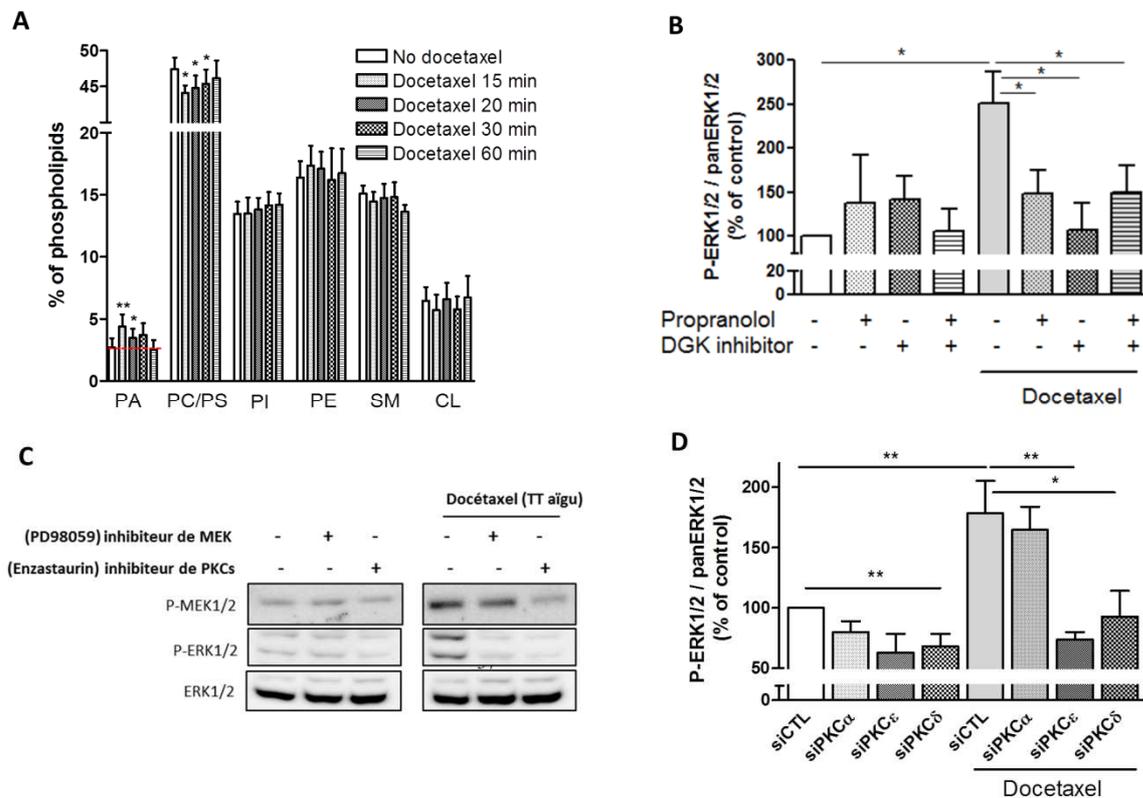


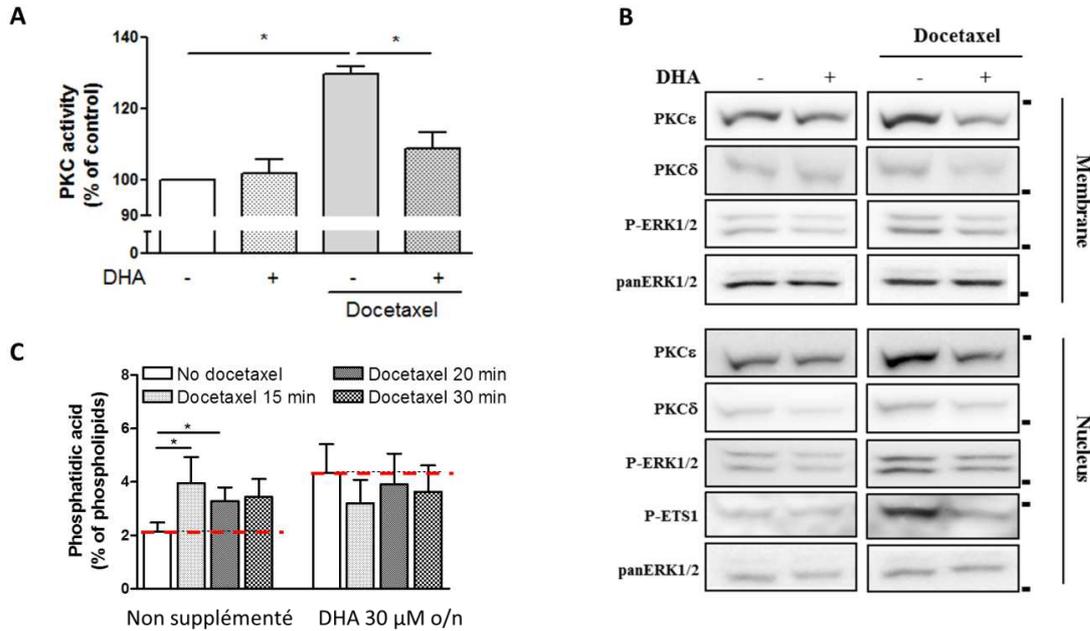
Figure 34. L'activation de ERK1/2 par le docétaxel est dépendante de la signalisation PA/DAG/PKC ϵ - δ .

A_Le docétaxel induit une production de PA. Niveau relatif (% des phospholipides identifiés) d'acide phosphatidique (PA), de phosphatidylcholine (PC), de phosphatidylsérine (PS), de phosphoinositol (PI), de phosphatidylethanolamine (PE), de sphingomyéline (SM) et de cardiolipine (CL) après un traitement aigu de docétaxel (10 nM). Les phospholipides sont identifiés par HPTLC (moyenne \pm SEM, n=8, test apparié Wilcoxon). **B_L'inhibition de la conversion entre PA et DAG bloque P-ERK1/2 induit par le docétaxel.** Le propranolol inhibe la conversion entre PA et DAG et l'inhibiteur de DAG kinase bloque la conversion entre DAG et PA. Les cellules MDA-MB-231 sont pré-traitées pendant 1 h avec 50 μ M de propranolol et 10 μ M d'inhibiteur de DGK. Le docétaxel est appliqué en aigu (1 nM, 15 min). Le lysat total est analysé par western blot et densitométrie (moyenne \pm SEM, n=4, test Mann-Whitney). **C_L'inhibition de MEK et de PKC bloque P-ERK induit par le docétaxel.** Les cellules MDA-MB-231 sont pré-traitées pendant 1h avec les inhibiteurs (enzastaurin 1 μ M, PD98059 5 μ M). Le docétaxel est appliquée en aigu (1 nM, 15 min). Le lysat total est analysé par western blot et densitométrie (WB représentatif, n=4). **D_L'extinction de la PKC ϵ et de la PKC δ**

par ARN interférents bloque P-ERK1/2 induit par le docétaxel. L'expression de ERK1/2 est étudiée par western blot sur le lysat total après transfection de siRNA contrôle (n=5) ou ciblant la PKC ϵ (n=5), la PKC δ (n=5) et la PKC α (n=3) (densitométrie moyenne +/-SEM, test Mann-Whitney). *p<0.05, **p<0.01

Collectivement nos données montrent que l'activation précoce de ERK1/2 par le docétaxel est dépendante d'une signalisation PA/DAG/PKC ϵ - δ . Le DHA est capable de bloquer la phosphorylation de ERK1/2 induite par un traitement chronique de docétaxel (**figure 32B**). Nous avons également observé l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 après un traitement aigu de docétaxel (non montré, n=2, voir résultats complémentaires).

Qu'en est-il de l'effet du DHA sur les différents acteurs impliqués dans l'activation de ERK1/2 par le docétaxel ? Nous montrons que le DHA inhibe l'activité PKC induite par le docétaxel (**figure 35A**) et qu'une supplémentation en DHA bloque la translocation membranaire et nucléaire des PKC ϵ - δ (**figure 35B**). L'analyse quantitative des phospholipides montre que le docétaxel n'induit pas d'augmentation transitoire du PA dans les cellules supplémentées en DHA (**figure 35C**). Enfin, l'analyse qualitative des phospholipides montre qu'une supplémentation avec 30 μ M de DHA mène à son incorporation dans tous les phospholipides des cellules MDA-MB-231. La plus forte incorporation de DHA est retrouvée dans la PC et le PI (de l'ordre de 6 fois, *p<0.01) (**figure 35D**). Dans notre étude, la production de PA induite par le docétaxel semble générée à partir de la PC (**figure 34A**). Ainsi, l'incorporation de DHA dans les PLs, et particulièrement dans la PC, peut mener à la production de seconds messagers lipidiques enrichis en DHA. Les hypothèses liées au mécanisme d'inhibition de la translocation des PKC ϵ - δ seront abordées dans la discussion.



D	Composition AG	Phosphatidylinositol		Phosphatidylcholine	
		Ctle (n=5)	DHA (n=5)	Ctle (n=5)	DHA (n=5)
	Saturés (1)	33,57 ± 1,30	35,24 ± 2,18	33,48 ± 2,35	35,50 ± 3,29
	Monosaturés (2)	27,29 ± 1,11	25,33 ± 3,78	43,54 ± 3,76	41,31 ± 4,37
	AGPIα-6 (3)	15,13 ± 4,35	14,70 ± 3,52	4,56 ± 1,33	4,74 ± 1,24
	AGPIα-3				
	20:5n-3 (EPA)	0,36 ± 0,07	0,57 ± 0,27	0,40 ± 0,12	0,73 ± 0,34
	22:6n-3 (DHA)	0,75 ± 0,22	5,51 ± 3,14 **	0,54 ± 0,19	3,23 ± 1,86 **
	Total (4)	2,13 ± 0,53	7,62 ± 3,91 *	1,71 ± 0,59	4,90 ± 2,54

(1) inclus 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 23:0, 24:0.
 (2) inclus 14:1, 15:1, 16:1, 18:1n-9c, 18:1n-7c, 20:1, 22:1, 24:1
 (3) inclus 18:2n-6c, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:4n-6
 (4) inclus 18:3, 20:3n-3, 22:5n-3

Figure 35. Effet du DHA sur la signalisation PA/DAG/ PKC ϵ - δ

A_ Le DHA inhibe l'activité PKC induite par le docétaxel. Activité kinase des PKCs (moyenne +/-SD, n=3, Mann-Whitney). **B_ Le DHA bloque la translocation membranaire et nucléaire des PKC ϵ - δ .** WB représentatif (n=5). (A, B) Les cellules MDA-MB-231 sont traitées pendant 5 jours avec du docétaxel (0.75 nM) +/- DHA (30 μ M). **C_ Une supplémentation en DHA contrecarre l'augmentation transitoire de PA induite par le docétaxel.** Les cellules MDA-MB-231 sont traitées pendant 18 h avec du DHA (30 μ M) puis du docétaxel (10 nM) est appliquée en aigu (moyenne +/- SEM, n=6, Wilcoxon). **D_ Le DHA est incorporé dans le phosphatidylinositol et dans la phosphatidylcholine.** Les cellules MDA-MB-231 sont traitées pendant 18 h avec du DHA (30 μ M). Après extraction des lipides totaux, les phospholipides sont séparés par TLC et analysés par chromatographie gazeuse (moyenne +/- SEM, Mann-Whitney). *p<0.05, **p<0.01.

Le DHA et l'enzastaurine (inhibiteur pharmacologique de PKCs) augmentent la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 au docétaxel (figure 36A).
 L'effet sensibilisant du DHA n'est pas potentialisé en présence d'enzastaurine ce qui suggère

un mécanisme d'action commun. Afin de démontrer l'implication de la PKC ϵ et de la PKC δ dans le mécanisme de chimiosensibilisation du DHA, nous avons inhibé leurs expressions par des ARN interférents et évalué l'effet sensibilisant du DHA. Après transfection d'un siRNA ne ciblant aucune protéine (siCTL) ou après extinction de la PKC α (siPKC α), le DHA conserve son effet chimiosensibilisant en augmentant l'efficacité du docétaxel de l'ordre de 30%. En revanche, lorsque la PKC ϵ et la PKC δ sont inhibées, l'effet sensibilisant du DHA est diminué de moitié (*p<0.05) (**figure 36B**). Ces données montrent que les PKC ϵ/δ sont des cibles moléculaires du DHA impliquées dans son effet sensibilisant.

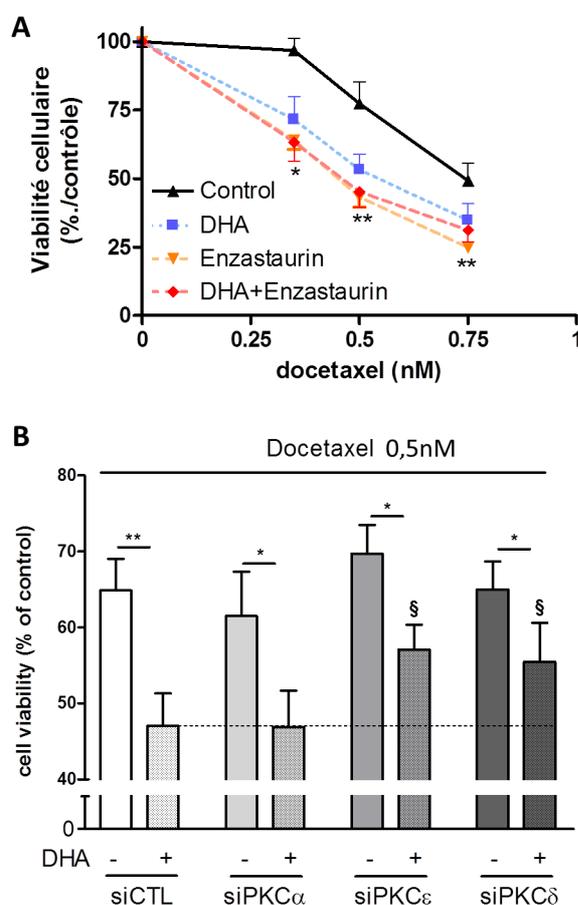


Figure 36. Implication des PKC ϵ/δ dans la chimiosensibilisation du DHA au docétaxel.

A Le DHA et l'enzastaurine augmentent l'efficacité du docétaxel. Courbe de chimiosensibilisation sur 7 jours des cellules MDA-MB-231 (DHA 30 μ M, enzastaurine 1 μ M, moyenne \pm SEM, n=4, test Mann Whitney *p<0.05, **p<0.01).

B La PKC ϵ et la PKC δ sont des cibles moléculaires du DHA impliquées dans la chimiosensibilisation au docétaxel. Chimiosensibilisation au docétaxel (0.5nM) sur 7 jours des cellules MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA contrôle (CTL), un siRNA ciblant la PKC α , la PKC ϵ et la PKC δ . 24 h après la transfection, les cellules sont co-traitées par du docétaxel (0.5nM) \pm DHA-30 μ M pendant 4 jours avant le test MTT (moyenne \pm SEM, n=6 sauf pour le siRNA PKC α n=5). Test statistique Wilcoxon : **p<0.01, *p<0.05 comparaison de la condition contrôle non supplémentée *versus* la condition DHA dans les mêmes conditions de transfection, §p<0.05 comparaison de la condition siRNA contrôle supplémentée en DHA *versus* les conditions siRNA supplémentées en DHA.

De manière surprenante, alors que l'inhibition de la PKC ϵ et de la PKC δ bloque l'activation de ERK1/2 par le docétaxel (figure 34D), l'inhibition de ces isoformes par les ARN interférents n'augmente pas la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au docétaxel (**figure 36B**). De la même manière, l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 (PD98059, figure 34C) n'augmente pas l'efficacité du docétaxel (voir résultats complémentaires).

Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse de phénomènes de compensation entre voies de signalisation. Au vue des interconnexions entre les voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt, nous avons étudié le niveau d'activation d'Akt dans notre modèle cellulaire. L'inhibition de ERK1/2 par extinction des PKC ϵ/δ induit la phosphorylation d'Akt (ser473) (**figure 37A**), ce qui pourrait expliquer que le ciblage des PKC ϵ/δ n'augmente pas l'efficacité du docétaxel.

Le docétaxel induit la phosphorylation de la sérine 473 d'Akt mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la thréonine 308 (résultats complémentaires). Dans le contexte de la chimiosensibilisation, le DHA et l'enzastaurine bloquent à la fois l'activation de ERK1/2 et l'activation d'Akt induite par le docétaxel (**figure 37B**). Ces données suggèrent que l'inhibition concomitante de ces deux voies de signalisation est requise pour augmenter l'efficacité du docétaxel dans les cellules MDA-MB-231.

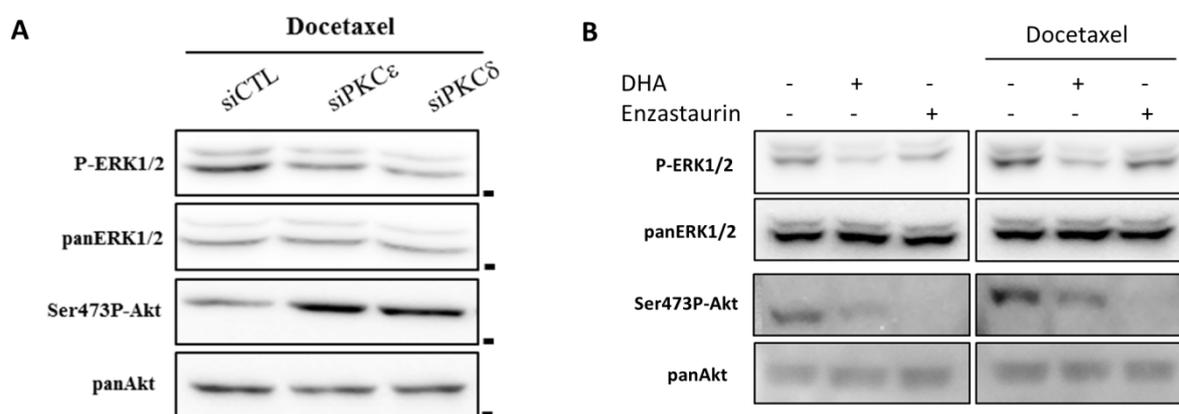


Figure 37. L'induction de la phosphorylation d'Akt (ser473) par le docétaxel est bloquée par le DHA et l'enzastaurine

A L'inhibition des PKC ϵ/δ augmente la phosphorylation d'Akt (ser473) sous docétaxel. 48h après la transfection des cellules MDA-MB-231, 1 nM de docétaxel est appliqué en aigu (WB représentatif, n=4). **B** Le DHA et l'enzastaurine bloquent la phosphorylation de ERK1/2 et la phosphorylation d'Akt (ser473) induite par le docétaxel. Les cellules MDA-MB-231 sont co-traitées par du docétaxel (0.75nM) +/- DHA (30 μ M) +/- enzastaurine (1 μ M) pendant 5 jours. (WB représentatif, n=4).

Après avoir mis en évidence l'implication des voies ERK1/2 et Akt dans la sensibilisation au docétaxel dans la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231, nous avons étendu cette étude au modèle *in vivo* de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU.

Les AGPI n -3LC apportés par l'alimentation augmentent la régression tumorale de 40% (**p<0.01) après six semaines de traitement docétaxel (**figure 38A**). Le docétaxel induit une nette augmentation de l'expression de P-ERK1/2, expression qui est fortement inhibée

dans les tumeurs de rats ayant suivi un régime alimentaire enrichi en AGPIIn-3LC (**figure 38B**). De la même manière et en accord avec les résultats *in vitro*, nous observons aussi une induction de la phosphorylation d'Akt (ser473) inhibée dans les tumeurs mammaires du groupe nutritionnel AGPIIn-3 (voir résultats complémentaires).

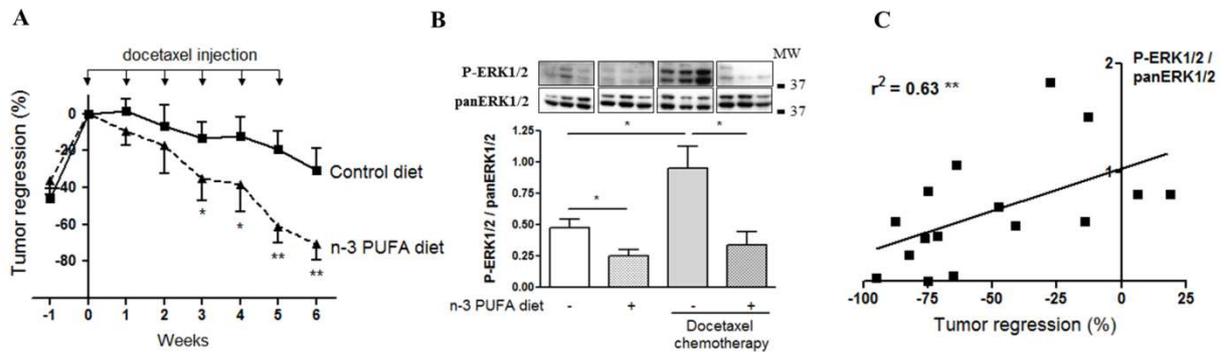


Figure 38. La régression tumorale sous docétaxel, potentialisée par le régime nutritionnel AGPIIn-3, est associée au niveau d'activation de ERK1/2 régulé par les AGPIIn-3

A_ % de variation de la surface tumorale entre le début de la chimiothérapie à W0 et les semaines de traitement docétaxel (voir contexte général, expérimentation animale réalisée par S.Vibet) (n=8/groupe nutritionnel, moyenne +/-SEM, Mann-Whitney *p<0.05, **p<0.01). B_Analyse par western blot de l'expression de P-ERK1/2 et de panERK1/2 des extraits protéiques tumoraux. Les résultats sont quantifiés par densitométrie (sans chimiothérapie n=6/groupe nutritionnel, sous docétaxel n=8/groupe nutritionnel, moyenne +/-SEM, Mann-Whitney *p<0.05). C_Corrélation entre la réponse au docétaxel (% de régression tumorale) et le ratio P-ERK1/2/panERK1/2. Corrélation réalisée avec les 16 tumeurs traitées par le docétaxel (n=8/groupe nutritionnel, Spearman, **p<0.01).

Le niveau d'activation de la signalisation ERK1/2 apparaît critique pour l'efficacité de la chimiothérapie docétaxel. En effet, il existe une corrélation entre le niveau de phosphorylation de ERK1/2 et la régression tumorale : un fort niveau d'activation est associé à la résistance des tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux (**figure 38C**).

Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating PKC ϵ - δ /ERK and Akt

Chauvin Lucie¹, Caroline Goupille^{1,2}, Blanc Charly¹, Pinault Michelle¹, Domingo Isabelle¹, Guimaraes Cyrille¹, Bougnoux Philippe^{1,2}, Chevalier Stephan^{1,3} and Mahéo Karine^{1,3,*}

¹ Inserm UMR1069 “Nutrition, Croissance et Cancer” Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France

² Hôpital “Bretonneau”, CHRU, 2 bd Tonnellé, 37000 Tours, France;

³ UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université François Rabelais de Tours, 31 av Monge, 37200 Tours, France

To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2473 66213 ; Fax: +33 2473 66226 ; Email: karine.maheo@univ-tours.fr

Short title: DHA increases docetaxel efficacy by inhibiting ERK and Akt

Abstract

Taxanes induce drug resistance potentially by increasing signaling pathways such as PI3K/Akt and ERK, which promotes survival and cell growth in human cancer cells. We have previously shown that very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) decrease resistance of experimental mammary tumors to several anticancer drugs. Our objective was to determine whether DHA could increase tumor sensitivity to docetaxel by down-regulating these survival pathways. In docetaxel-treated MDA-MB-231, phosphorylated-ERK1/2 levels were increased by 60% in membrane and nuclear compartments cells compared to untreated cells. Our data showed that ERK1/2 activation depended on PKC activation since: i) enzastaurin (a pan-PKC inhibitor) blocked docetaxel-induced ERK1/2 phosphorylation ii) docetaxel increased PKC activity by 30% and phosphatidic acid level by 1.6 fold iii) inhibition of PKC ϵ and PKC δ by siRNA resulted in reduced phosphorylated ERK1/2 levels. In DHA-supplemented cells, docetaxel was unable to increase membrane-and nuclear-PKC ϵ and δ levels, resulting in diminished ERK1/2 phosphorylation and potentiation of docetaxel efficacy. Reduced membrane level of PKC ϵ and PKC δ was associated with significant incorporation of DHA in all phospholipids, including phosphatidylcholine which is a major source of phosphatidic acid. Additionally, examination of the Akt pathway showed that DHA could repress docetaxel-induced Ser473Akt phosphorylation. In rat mammary tumors, dietary DHA supplementation during docetaxel chemotherapy repressed ERK and Akt survival pathways and in turn strongly improved taxane efficacy. The ERK level is negatively correlated with tumor regression. These findings may be of potential clinical importance in treating chemotherapy-refractory cancer.

Keywords : n-3 LCPUFA, DHA, docetaxel, tumor sensitization, PKC ϵ , PKC δ , ERK, Akt, mammary tumors

Highlights

- Docetaxel induces phosphatidic acid leading to PKC activation in cancer cells
- PKC ϵ / δ have been identified as mediators of ERK1/2 activation by docetaxel
- P-ERK levels in tumors are correlated with poor taxane response
- Incorporation of DHA in phospholipids is associated to a decreased PKC activity
- DHA represses ERK and Akt pathways in mammary tumors and improve taxane efficacy.

1. Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer in women with ~ 1.7 million new cases diagnosed every year. Whereas chemotherapy is an important component of current treatment, in a significant portion of the cancer carrying patient population, the efficacy of chemotherapy is limited by anticancer drug resistance. The mechanisms of resistance include efflux pumps, mutation of target proteins or overactivation of signaling pathways involved in cell survival, cell growth and cell cycle progression (reviewed in [1]).

The first-line therapy includes taxanes such as docetaxel either alone or in combination. Docetaxel is a microtubule-stabilizing agent leading to cell cycle arrest and subsequent cell death [1]. An increased activity of PI3K/Akt signalling pathway by docetaxel has been reported in prostate cancer [2]. Transfecting breast cancer cells with Akt promotes resistance to therapies commonly used in the treatment of breast cancer patients [3]. Furthermore, several studies have showed that taxanes (taxol, docetaxel) can induce a phosphorylation/activation of ERK in various tumor cell lines such as melanoma, oesophageal and mammary (MCF-7) tumor cell lines [4–6]. The combination of taxol with a MEK inhibitor resulted in increase of tumor regression in human lung tumors supporting that taxol

efficacy is potentiated by MEK inhibition [7]. However, the mechanisms by which these pathways are activated by docetaxel are not clear. Mhaidat et al. have reported that the activation of the ERK1/2 pathway by docetaxel in human melanoma cells depends on protein kinase C epsilon (PKC ϵ) [8]. On the other hand, PKC delta (PKC δ) has also been involved in ERK activation in breast cancer cells [9]. Among the 11 members of the PKC family, PKC ϵ and δ belong to the novel PKC isoform family and have been involved in drug resistance [8, 10–12]. PKC activation is well-known for being closely influenced by membrane fatty environment. Novel PKCs activation depends on membrane Diacylglycerol (DAG) and/or Phosphatidic Acid (PA), two signaling-related products cleaved from structural phospholipids : phosphatidylcholine (PC) or phosphatidylinositol (PI) [13, 14]. Previous studies have shown that the production of PA and DAG in the plasma membrane facilitates the translocation of PKC from the cytosol to the plasma membrane [15, 16]. This translocation is associated with the catalytic activation of the enzyme.

Among n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), very long chain n-3 PUFA (n-3 LCPUFA), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) have generated increasing interest due to their ability to decrease resistance to anthracyclines, taxanes or radio-therapy of experimentally obtained mammary tumors without additional side effects [17–20]. In two phase II clinical studies, dietary supplementation with n-3 LCPUFA has been associated with increased survival and chemotherapeutic efficacy without affecting the toxicity profile of conventional chemotherapies [21, 22]. Different molecular mechanisms such as the amplification of oxidative stress generated by anthracyclines or radiotherapy and increased accumulation of anticancer agents have been proposed to account for these effects [23–25]. For the mechanism involved in the chemosensitization of taxanes by n-3 LCPUFA, we have recently reported a reduction in peroxisome proliferator-activated receptor β

expression [26] and a remodeling of the tumor vasculature with a decrease of intratumoral interstitial pressure [20].

n-3 LCPUFA have some impacts on cell physiology [27] and may also interfere with membrane-based signal transduction pathways. For example DHA and/or EPA have been reported to decrease the EGFR levels in lipid rafts, to attenuate PI3K and Akt kinase activities in prostate cancer cells and mammary cancer cell lines as well as to reduce Ras localization to the plasma membrane in colon tumors [28–30]. The n-3 LCPUFA can also interfere with the PKC signaling pathway as reported in non-tumor cells or prostate cancer cells [31, 32]. All of these studies have been performed to examine the constitutive signal transduction pathways and not in the course of a chemotherapeutic treatment.

The originality of this study is to investigate the efficacy of DHA as anticancer adjuvant to interact with survival transduction pathways promoting cancer cell survival and drug resistance. This study reports for the first time that DHA is able to counteract ERK and Akt pathways induced by docetaxel chemotherapy treatment, two pathways involved in increased-cell survival and subsequent chemoresistance.

2. Methods

2.1 Antibodies and reagents

DHA (Docosahexaenoic acid) methyl ester (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was purified in our laboratory using thin layer chromatography to eliminate oxidized derivatives. DHA was then aliquoted, stored under nitrogen gas and kept at -80°C for up to three weeks. DHA was dissolved at 150 mM in 100% ethanol and was used at 30 µM, as previously described [32, 24]. Docetaxel and Enzastaurin were purchased from Sigma-Aldrich and were stored at -80°C as 1 mM solution in 100% ethanol and 10 mM solution in DMSO, respectively. GF-109203X (Enzo life Science, Villeurbanne, France) was stored at -20°C as a

10 mM solution in DMSO. Propanolol and DAG kinase inhibitor were purchased from Sigma-Aldrich and were stored at -20°C as 50 mM and 5 mM solution in DMSO, respectively. Anti-EGF Receptor, anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-ERK1/2 (L34F12), anti-phospho Akt (Ser473) (D9E), anti-Akt (40D4) and anti-MEK1/2 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-PKC ϵ (C-15), anti-PKC δ (C-20), anti-PKC α (C-20), anti-LaminA/C (636), anti-Hsc70 (B-6), HRP-conjugated goat anti-rabbit and HRP-conjugated goat anti-mouse were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phospho Ets1 (Tyr38) was purchased from Abcam (Cambridge, UK).

2.2. Cell culture and viability assay for analysis of docetaxel efficacy

Human breast cancer cell line, MDA-MB-231 was obtained from European Collection of Cell Culture (Catalogue No 92020424) and was received on 12 June 2012. This cell line has been tested and authenticated by DNA fingerprinting (Short Tandem repeat profiling) by the EACC. After reception, cells were amplified in order to make a large reserve of cryopreserved cells. Every 3 months, a new cryopreserved bulb was thawed and used for this study. MDA-MB-231 cell line was grown in Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 1% (v/v) penicillin-streptomycin in a 37°C humidified incubator with 5% CO₂.

For analysis of cell viability, cells were plated out at a density of 5,000 cells per well in 48-well plates. Twenty hours after plating, MDA-MB-231 were treated with a range of docetaxel dose (0.35, 0.5 and 0.75 nM), DHA (30 μ M), enzastaurin (1 μ M) or combinations of those compounds. All control conditions were treated with an equivalent volume of the delivery vehicle. For the cell viability of siRNA-transfected cells, the dose of docetaxel was fixed at 0.5 nM (that accounts for IC70) with or without DHA (30 μ M). The tested

compounds were renewed every day. The cells were treated for 5 days prior to MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Basal effects of DHA or enzastaurin were normalized at 100 % to represent only the potentiating effect of treatment.

2.3 Small interference RNA assay

The following small interference RNA (siRNA) duplex sequences that target PKC α , PKC ϵ and PKC δ were referred from Lønne et al. [34]: CCGAGUGAAACUCACGGACUCAAU, CACAAGUUCGGUAUCCACAACUACA, and UUUCAAGAGCUUCUCCAGGAUGUC respectively. These duplexes were ordered from Sigma-Aldrich. A non-targeting siRNA was purchased from Santa Cruz Biotechnology and used as a negative control. Adherent cells (at 60% confluence) were transfected using PepMute reagent (SignaGen, Gaithersburg, MD) with 40 nM of siRNA for 4 hours according to manufacturer's instructions. Cells were then trypsinized, re-plated and cultured for 96 h before analysis.

2.4 Western Blot analysis

Cells were treated with DHA, enzastaurin (1 μ M) or docetaxel with concentrations adapted to the duration of treatment. While docetaxel at 1 nM was used for acute treatments (15-60 min), 0.75 nM was used for chronic treatments (applications for 5 days). Cells were serum-starved overnight before protein extraction. Cells were washed in cold PBS, harvested and lysed in RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol] containing protease inhibitors (Thermo Scientific, Illkirch, France) and phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma-Aldrich) for 20 min at 4°C. Total protein extracts from rat mammary tumors were obtained with the same lysis buffer. For cytosol, membrane and nuclear proteins extractions, cells were

prepared using a subcellular fractionation kit (Thermo Scientific) with phosphatase inhibitor cocktails in each buffer according to manufacturer's instructions. Protein concentration was determined by BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a PVDF membrane (Millipore, France). Antibodies were incubated overnight and the recognized bands were detected with the Clarity ECL Western blot Substrate (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and visualized with a CCD camera (MF ChemiBIS, DNR Bio-imaging Systems, Israël). The band intensity was quantified using the Multi Gauge v3.0 software (Fujifilm, Tokyo, Japan). After phosphorylated protein analysis, the total amount of proteins ERK1/2 and Akt (pan-ERK1/2 or pan-Akt) was determined by reprobing the membranes, after stripping, with the corresponding antibody. The relative expression of P-ERK1/2/panERK1/2 or Ser473P-Akt/panAkt was determined by dividing the corresponding densitometric values. For PKC expression analysis, reversible Ponceau staining was employed as a loading control.

2.5 PKC activity

Fresh lysates of treated MDA-MB-231 were collected and protein kinase C activity was determined using a Protein Kinase C Activity Assay kit, according to the manufacturer's instructions (Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA). This quantification system is based on a solid phase ELISA that utilizes a specific synthetic peptide as a substrate for serine/threonine PKC kinases, and a polyclonal antibody that recognizes the phosphorylated form of the substrate.

2.6 Analysis of cellular phospholipid content

MDA-MB-231 (in 175 cm² flasks) were pretreated with DHA or equivalent dose of vehicle (ethanol) overnight. Then, docetaxel (10nM) was applied during 15, 20, 30 or 60 min. Total lipids from MDA-MB-231 cells and rat mammary tumors were extracted according to Bligh and Dyer [35]. For phospholipid fatty acid composition analysis, total lipids were separated using preparative silica gel thin layer chromatography (one-dimensional TLC) plates (LK5, 20x20 cm, Merck Millipore, France) and ethanol/ triethylamin/ chloroform/ water as a solvent (adapted from Doria *et al.* [36]). Phospholipids spots were scraped and collected in screw-cap glass tubes. Fatty acids from phospholipids were prepared as fatty acids methyl esters to allow for gas chromatography analysis (GC-2010plus, Shimadzu Scientific instruments, Noisiel, France) using a BPX70 capillary column (60 m, SGE, Chromoptic SAS, Courtaboeuf, France). Hydrogen was used as carrier gaz with a constant pressure (120 kPa). After an on-column injection of sample at 60°C, oven temperature increased from 60°C to 220°C. Fatty acids were detected by an Flame Ionization Detector at 255°C and identified by comparison of their retention times with commercial standards (Supelco 37 Fatty Acid Methyl Ester mix, Sigma-Aldrich, France). Fatty acids levels were expressed as the percentage of total integrated peaks area using the GC solutions software (Shimadzu, Noisiel, France).

For quantification of the phospholipid classes, total lipids were separated by High Performance-Thin Layer Chromatography (one-dimensional, HPTLC) and dedicated silica gel HP-TLC plates (10x20 cm, Merck Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) were used to improve sensitivity and allow standardization (method adapted from Arvier *et al.* [37]). The samples were separated with the same solvent described above. For this study, PA separation from the other phospholipids was set as priority. However, contrary to preparative TLC plates, HPTLC plates being shorter (10cm), the separation of the PC/PS phospholipids was restricted and they were quantified together. After staining, samples and reference standards for

phosphatidic acid (PA), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) phosphoinositides (PI), sphingomyelins (SM) and cardiolipine (CL) (Sigma-Aldrich, France) were visualized by brown coloration after carbonization using the TLC-Visualiser (Camag). Densitometric analysis was performed using the winCATS software (Camag). Standards were used to quantify phospholipids. Phospholipids levels were expressed as the percentage of total identified phospholipids weight in the sample.

2.7 In vivo model

Animal study and experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Val de Loire (France). Carcinogenesis initiation and diets were specifically described in Kornfeld *et al.* [20]. Briefly, mammary carcinogenesis was initiated in female Sprague-Dawley rats by injection of a single dose of N-nitrosomethylurea (25 mg/kg). Rats into the control nutritional group (n=14) were fed a diet containing peanut oil (8 %), rape oil (3 %) (% , g/100 g of diet) whereas rats within the n-3 LCPUFA nutritional group (n=14) were fed a diet containing peanut (8 %), rape (2 %) and fish oils (5 %). n-3 LCPUFA diet was composed of 2.5% DHA and 1% EPA. When tumors reached 2 cm² (week 0), 8 rats of both groups were treated once a week with docetaxel (Taxotere[®], Sanofi Aventis, France; 6 mg/kg/week intraperitoneal) for 6 weeks. Rats were examined weekly and tumor area variation was determined. The beginning of chemotherapy was set as the reference and tumor regression was calculated as the percentage of tumor area variation between tumor size at the beginning of docetaxel treatment (W0) and at the end of treatment (W6). Cell cycle analysis (as previously described [33]) and western blot quantification, were performed on tumors without docetaxel treatment or after 6 chemotherapy cycles (week 6).

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 4 software (La Jolla, CA). To analyze differences in protein expression (*in vitro* or *in vivo*), the Mann-Whitney test was used. The significance of *in vitro* cell viability and phospholipid analyses were assayed by Wilcoxon test for matched paired samples. Spearman test was used for correlation. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Docetaxel induces a survival signaling pathway through a PKC/ERK-dependent mechanism in the human breast cancer cell line MDA-MB-231

Subcellular fractions of MDA-MB-231 cells were prepared (cytosol, membrane, and nucleus). The relative purity of each fraction was ascertained by western blot analysis using anti-EGFR, anti-MEK, anti-LaminA/C antibodies as markers of membrane, cytosol, and nuclear fractions respectively (Supplementary Figure S1). After a 5-days exposure to docetaxel (daily treatments), P-ERK1/2 levels were increased by 60% in membrane and nuclear fractions of docetaxel-treated cells (***P<0.001) (Figure 1A). Since PKC ϵ and PKC δ were reported to be involved in chemoresistance [8, 10–12] and PKC ϵ in activation of ERK by docetaxel [8], we examined their expressions after docetaxel treatment. Their expressions were significantly increased in membrane (by 25% for PKC ϵ , ***P<0.001 and by 30% for PKC δ , **P<0.01) and in nuclear fractions (by ~30% for PKC ϵ and PKC δ , *P<0.05) (Figure 1B). We also noticed a transient increase of phosphorylated-ERK associated with an increase in membrane PKC ϵ and δ levels as early as 15 min of the first day of treatment (Figure 1C, 1D).

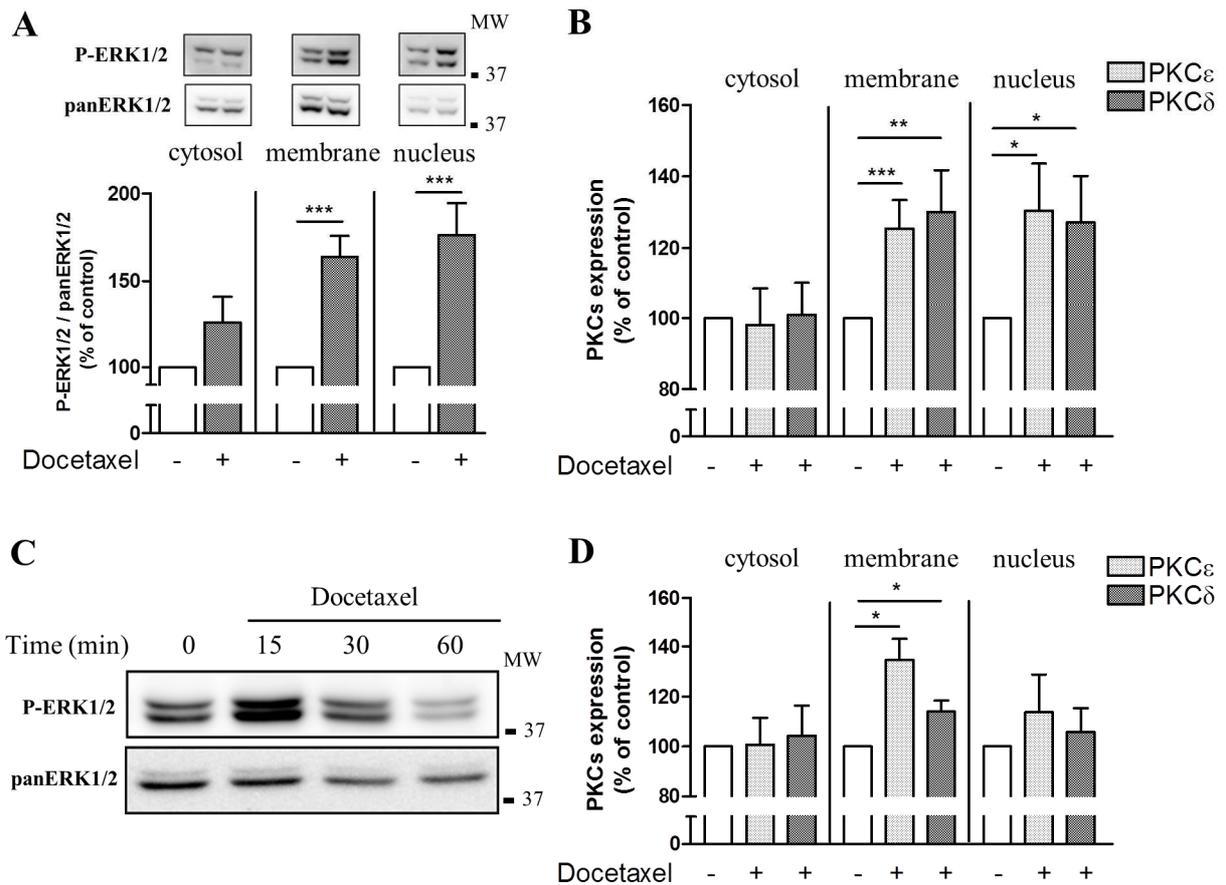


Fig.1. Docetaxel treatment of MDA-MB-231 cells increases P-ERK1/2, PKCε and PKCδ levels in membrane and nuclear fractions. (A) and (B)-Cells were treated with or without docetaxel for 5 days. Subcellular fractions were analysed by western blot and quantified by densitometry. (A) A Representative Western blot (top, MW: Molecular Weight in kDa) and relative expression of P-ERK1/2 to pan ERK1/2 (mean values \pm SEM, n=6) are presented. (B) Relative expressions of PKCε and PKCδ (mean values \pm SEM, n=4). (C) and (D)- Cells were treated with or without acute docetaxel treatment (C) The expression of P-ERK1/2 and pan ERK1/2 was determined by western blot in whole cell lysat. A representative western of 3 independent experiments is presented (MW in kDa). (D) Relative expressions of PKCε and PKCδ (mean values \pm SEM, n=4) are presented. Cells were treated with or without docetaxel for 15 min. Subcellular fractions were analysed by western blot and quantified by densitometry. Statistical differences (from no docetaxel conditions) are indicated as followed: ***P<0.001 **P<0.01 or *P<0.05 (Mann-Whitney test).

PKC activation is closely related to membrane fatty environment. Phosphatidic acid (PA) and other phospholipid classes (PC, PS, PI, PE, SM and CL) were quantified by HPTLC after the addition of docetaxel (treatment for 15, 20, 30, and 60 min) (Figure 2A). Kinetic studies identified an \sim 1.6-fold increase in PA levels at 15 (**P<0.01), 20 min (*P<0.05) and 30 min (not significant). PA levels were increased at the expense of PC/PS, as observed at 15, 20 and 30 min after the addition of docetaxel (*P<0.05). At these time points, PC/PS levels

were decreased by ~ 10% (*P<0.05). After 60 min, the percentage of PA and PC/PS returned to basal level. No change in any of the other phospholipid classes was observed at these different time points. To analyze whether P-ERK1/2 was dependent of PA/DAG induced by docetaxel, propranolol and DAG kinase inhibitor (inhibitors of the conversion of PA to DAG and of DAG to PA respectively) were used. ERK1/2 phosphorylation induced by docetaxel was blocked by inhibitors showing that the production and an appropriate balance of these second lipid messengers are required for ERK1/2 phosphorylation (Supplementary Figure S2).

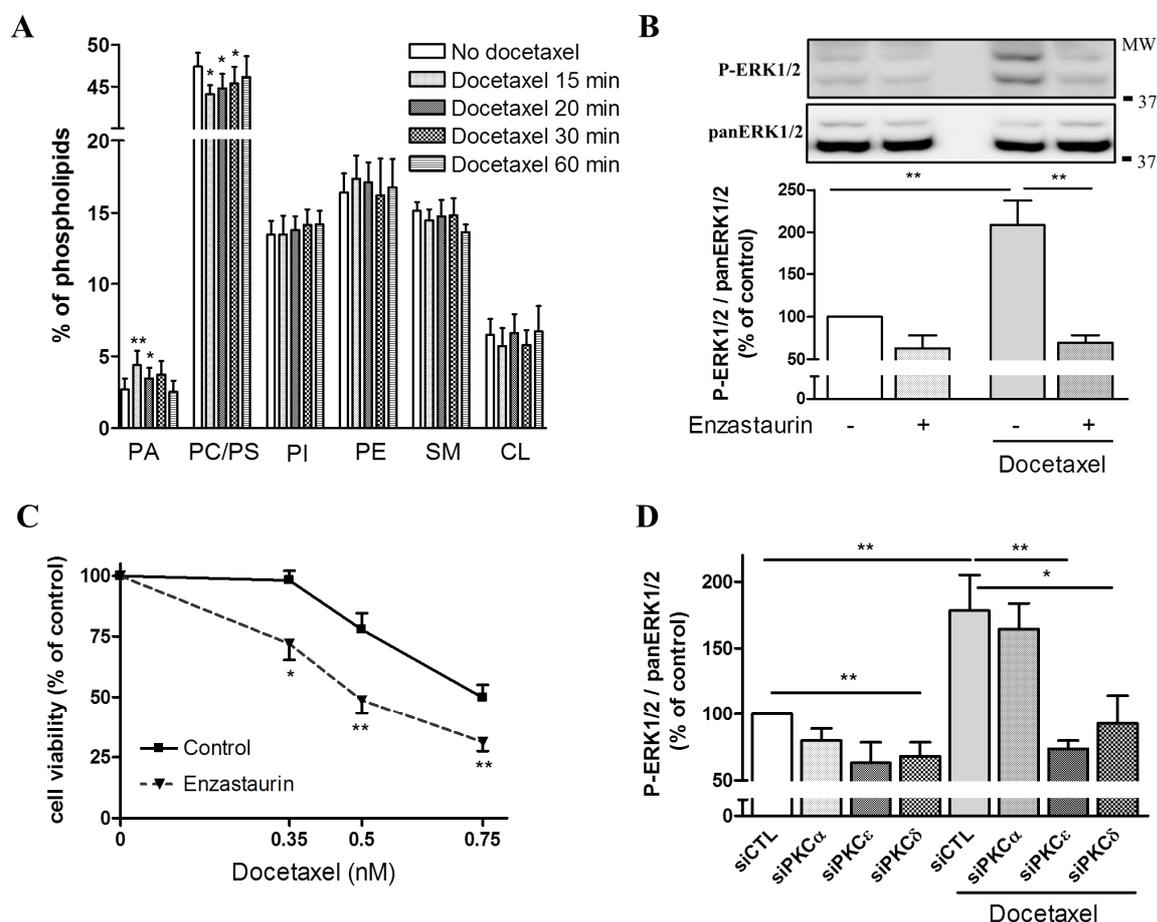


Fig.2. PKC is involved in docetaxel-induced phosphorylation of ERK1/2, and PKC inhibition increases docetaxel efficacy in MDA-MB-231 cells. (A) Relative levels (% of identified phospholipids) of phosphatidic acid (PA), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), sphingomyelin (SM) and cardiolipin (CL) after docetaxel treatment. Phospholipids were quantified by HPTLC method (mean values \pm SEM, n=8). (B) The expression of P-ERK1/2 and pan ERK1/2 was determined by western blot in whole cell lysat. Cells were pre-treated for 1h with enzastaurin followed by docetaxel treatment that was applied for 15 min. A representative western blot (top, MW in kDa) and relative expression of P-ERK1/2 to pan ERK1/2 (mean values \pm SEM, n=5) are presented. (C)

Cell viability assay: Cells were co-treated with or without enzastaurin and docetaxel for 5 days prior to MTT assay (mean values \pm SEM, n=8). **(D)** The expression of P-ERK1/2 and pan ERK1/2 was assessed by western blot in transfected cells with non-targeting siRNA (siCTL, n = 5) or directed against PKC α (siPKC α , n = 3), PKC ϵ (siPKC ϵ , n = 5), or PKC δ (siPKC δ , n = 5) (mean values \pm SEM). Statistical differences are indicated as followed: **P<0.01 or * P<0.05 (Wilcoxon paired test for A and C and Mann-Whitney test for B and D).

To determine if PKC and ERK signaling pathway were involved in cell survival, we used pharmacological PKC inhibitors and small interfering RNA targeting PKC α (a conventional PKC isoform), PKC ϵ and PKC δ (novel PKC isoforms). PKC inhibition by enzastaurin (a pan-PKC inhibitor) blocked docetaxel-induced ERK1/2 phosphorylation (**P<0.01) (Figure 2B). The inhibition of the ERK survival pathway by enzastaurin was associated with a potentiating docetaxel efficacy, as observed by cell viability assays (Figure 2C). The cell viability decreased from 98% to 72% at 0.35 nM (*P<0.05), from 78% to 49% at 0.5 nM (**P<0.01) and from 50% to 31% at 0.75 nM (**P<0.01). Enzastaurin increased docetaxel efficacy by ~30% for the tested doses. Similar results were observed with GF-109203X (1 μ M), another pan-PKC inhibitor (-29% of cell viability at 0.5 nM of docetaxel, **P<0.01). In cells transfected with siRNA-PKC ϵ or siRNA-PKC δ (Figure 2D), docetaxel was unable to induce ERK1/2 phosphorylation, demonstrating a PKC ϵ/δ -dependent ERK1/2 activation. In contrast, siPKC α did not interfere with docetaxel-induced ERK1/2 phosphorylation. Efficacy of RNA interference was controlled by western blot analysis (Supplementary Figure S3).

3.2 DHA increases the efficacy of docetaxel and blocks PKC ϵ/δ -ERK and Akt in MDA-MB-231 cell line.

The table shows fatty acids composition of phospholipids (PA, PC, PI, PE, PS and SM) in MDA-MB-231 cells with or without DHA supplementation. Analysis of phospholipids fatty acids reveals that DHA supplementation led to an increase incorporation of DHA in all phospholipid classes. The highest incorporation of DHA in phospholipid

classes was found in PI and PC, with 8 and 6 fold increases in DHA levels, respectively (**P<0.01). DHA supplementation led to an increase of DHA level by 5-fold in PA (**P<0.01), by 4-fold in PE (**P<0.01), by 3-fold in PS (*P<0.05) and 2-fold in SM (*P<0.05).

	Composition of PA		Composition of PI		Composition of PC		Composition of PE		Composition of PS		Composition of SM	
	n=5 Control	n=5 DHA	n=5 Control	n=5 DHA	n=5 Control	n=5 DHA	n=4 Control	n=5 DHA	n=3 Control	n=3 DHA	n=5 Control	n=5 DHA
Fatty acids												
Sat. ⁽¹⁾	24,0 ± 1,6	22,3 ± 1,9	33,6 ± 1,3	35,2 ± 2,2	33,5 ± 2,4	35,5 ± 3,3	21,4 ± 5,1	19,9 ± 3,3	41,6 ± 7,5	45,4 ± 4,5	56,8 ± 4,4	59,7 ± 4,0
MUFA ⁽²⁾	32,9 ± 3,3	31,8 ± 2,2	27,3 ± 1,1	25,3 ± 3,8	43,5 ± 3,8	41,3 ± 4,4	32,9 ± 6,8	31,9 ± 6,5	35,1 ± 2,4	33,8 ± 2,6	30,1 ± 4,4	30,1 ± 1,9
n-6 PUFA ⁽³⁾	10,5 ± 0,8	9,9 ± 0,7	15,1 ± 4,4	14,7 ± 3,5	4,6 ± 1,3	4,7 ± 1,2	11,2 ± 2,5	8,9 ± 1,3	3,2 ± 0,2	2,8 ± 0,7	2,4 ± 1,0	2,0 ± 0,2
n-3 PUFA												
20:5n-3 (EPA)	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	1,5 ± 0,6	2,1 ± 1,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
22:6n-3 (DHA)	0,7 ± 0,6	3,6 ± 2,7**	0,7 ± 0,2	5,5 ± 3,1**	0,5 ± 0,2	3,2 ± 1,9**	3,3 ± 1,4	13,2 ± 8,1**	0,6 ± 0,1	1,9 ± 1,5*	0,5 ± 0,2	1,1 ± 0,5*
Total ⁽⁴⁾	3,8 ± 0,8	6,2 ± 2,9*	2,1 ± 0,5	7,6 ± 3,9*	1,7 ± 0,6	4,9 ± 2,5*	7,5 ± 3,3	17,2 ± 9,7**	1,5 ± 0,3	2,8 ± 1,5	0,9 ± 0,3	1,4 ± 0,6

(1) Saturates included 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0

(2) Monounsaturates included 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1n-9c, 18:1n-7c, 20:1, 22:1, 24:1

(3) n-6 Polyunsaturates included 18:2 n-6c, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:4n-6

(4) n-3 Polyunsaturates included 18:3, 20:3n-3, 22:5n-3

Table. Fatty acid composition of phosphatidic acid (PA), phosphoinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PC) and sphingomyelin (SM) in MDA-MB-231 cells. Cells were treated with DHA (30 µM) or vehicle (ethanol) overnight. After total lipids extraction, phospholipids were separated by TLC and fatty acids composition was analysed by gas chromatography (mean values ± SEM). Statistical differences (from control conditions) are indicated as followed: **P<0.01 or *P<0.05 (Mann-Whitney test)

Analyses of P-ERK1/2/panERK1/2 level ratios in total cellular extracts showed that docetaxel-induced ERK1/2 phosphorylation was repressed in DHA-supplemented MDA-MB-231 cells (**P<0.01) (Figure 3A). The inhibition of ERK pathway by DHA was associated with an increase in docetaxel efficacy, as observed by cell viability assays (Figure 3B). Docetaxel was used at 0.35, 0.5 and 0.75 nM in unsupplemented or DHA-supplemented cells. We noticed that the docetaxel efficacy increased by ~30% for the three tested doses. For example, at 0.5 nM of docetaxel, the cell viability decreased from 77% to 53% in DHA-treated cells (**P<0.01). The potentiating effect of DHA on docetaxel efficacy was not enhanced in the presence of enzastaurin, suggesting a common mechanism of chemosensitization linked to PKC inhibition. The effect of DHA on docetaxel efficacy was further confirmed in two other breast cancer cell lines (MDA-MB-468 and SKBR3). With docetaxel (0.25 nM), the cell viability decreased from 84% to 49% in DHA-treated SKBR3 cells (*P<0.05) and from 76% to 56% in DHA-treated MDA-MB-468 cells (*P<0.05) (data not shown).

Assays for total PKC activity showed an increase in PKC activity by 30% in docetaxel-treated MDA-MB-231 cells for 5 days (*P<0.05) (Figure 3C). In DHA-supplemented cells, the increase of PKC activity by docetaxel was significantly reduced by 80 % (*P<0.05). PA production was also analyzed at various time points after docetaxel addition in DHA-supplemented-cells (Figure 3D). Whereas an increase in cellular PA level was detected during docetaxel treatment at 15 and 20 min in unsupplemented cells (as mentioned above, Figure 2A), its production was not further increased in DHA-supplemented cells after anticancer drug addition. PA level remained stable in DHA-supplemented cells during docetaxel treatment and the consumption of PC or PI (the major precursor of PA and DAG) was not observed (data not shown). Although a non-significant increase of PA was

noticed in DHA-supplemented cells compared to unsupplemented cells (no docetaxel) (Figure 3D), PKC activity was unaffected (Figure 3C).

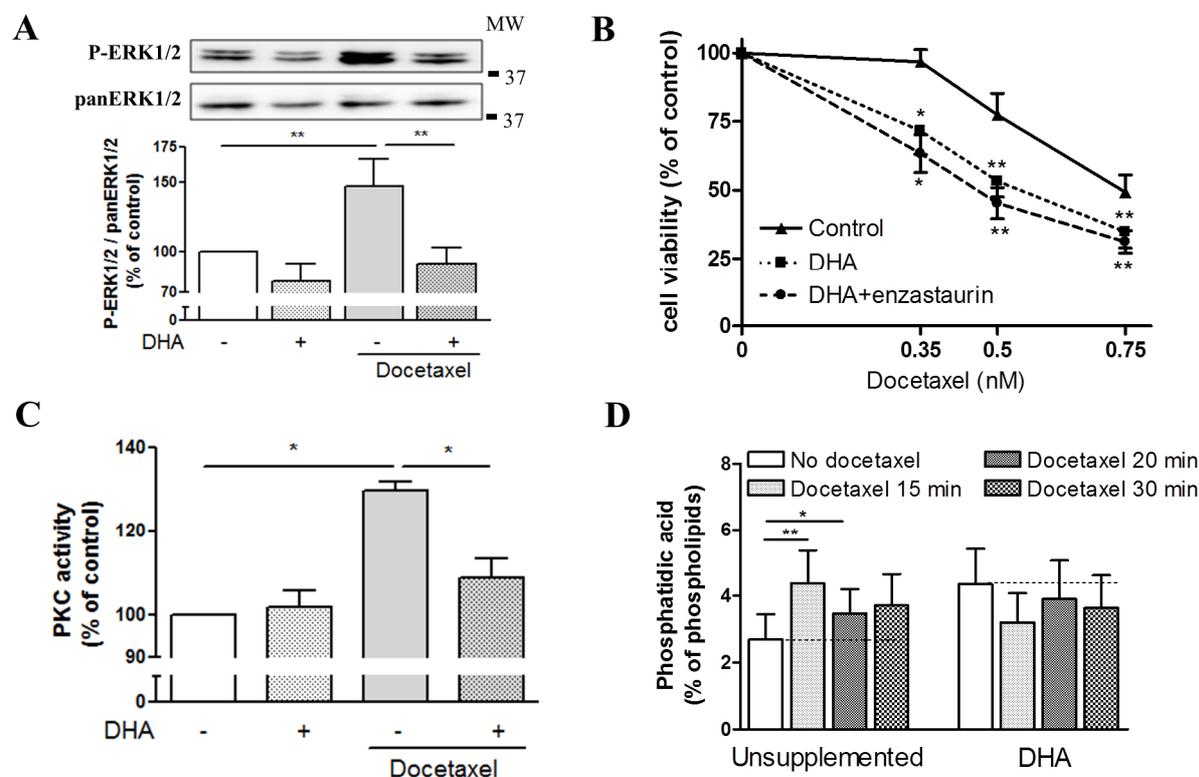


Fig.3. DHA blocks PKC/ERK signaling and chemosensitizes MDA-MB-231 cells to docetaxel. (A) A representative western blot (top, MW in kDa) and relative levels of P-ERK1/2 to pan ERK1/2 (mean values \pm SEM, n=5) were assessed by western blot in whole cell lysates. Cells were co-treated with DHA and docetaxel for 5 days. (B) Cell viability assay. Cells were co-treated with or without DHA, enzastaurin and docetaxel for 5 days prior to MTT assay (mean \pm SEM, n=4). (C) PKC activity was determined as described in Materials and Methods (mean values \pm SD, n=3) Cells were co-treated with DHA and docetaxel for 5 days (D) Phosphatidic acid levels (% of identified phospholipids) were quantified by HPTLC in cells after supplementation or not with DHA and the addition of docetaxel applied for 15, 20, and 30 min (mean values \pm SEM, n=6). Statistical differences are indicated as followed: **P<0.01 or *P<0.05 (Mann-Whitney test for A and C and Wilcoxon paired test for B and D).

As mentioned above, docetaxel increases the level of PKC ϵ and δ in the membrane and nuclear fractions (Figure 1B). However, in DHA-supplemented MDA-MB-231 cells, docetaxel was unable to modify the distribution of these PKC isoforms and ERK phosphorylation levels in these subcellular fractions (Figure 4A, the full western blot is

available in Supplementary Figure S4). The level of P-ETS1, a well-known nuclear target of activated ERK, was not increased by docetaxel in DHA-treated cells.

To determine whether DHA exerts its chemosensitizing effects through PKC ϵ and δ regulation, the effect of DHA and docetaxel was examined in siRNA PKC-transfected cells (Figure 4B). While DHA decreased cell viability by ~27% (**P<0.01) in docetaxel treated siControl or PKC α transfected cells, DHA decreased cell viability only by 18% (*P<0.05) and 17% (*P<0.05) in cells transfected with siRNA-PKC ϵ and siRNA-PKC δ respectively. These data indicate that PKC ϵ and PKC δ are targets of DHA to mediate its chemosensitization effect.

We have extended this study to Akt pathway, another signaling pathway involved in chemoresistance. Since the crosstalk between the two major survival signaling pathways ERK and Akt has been shown [38], we wondered whether the lack of the increase in the docetaxel efficacy in cells transfected with siRNA-PKC ϵ or siRNA-PKC δ in non-DHA conditions, could be attributed to an activation of Akt. In siRNA-PKC ϵ or -PKC δ transfected cells, whereas P-ERK1/2 is down-regulated (as described above in Figure 2D), we noticed an overactivation of Ser473P-Akt suggesting a survival compensatory mechanism (Figure 4C). Therefore, the analyse of Ser473P-Akt level was extended to DHA and enzastaurin treatment. As evaluated by densitometric analysis (Figure 4D), a decrease by ~ 50% of Ser473P-Akt was measured under DHA or Enzastaurin treatment (without docetaxel) (*P<0.05). Docetaxel induced phosphorylation of Ser473P-Akt by 60% (*P<0.05). DHA or Enzastaurin inhibited the activation of docetaxel induced-Akt (*P<0.05 and **P<0.01 respectively). Taken together, these data suggest that an inhibition of the both Akt and ERK pathways is required to promote an increase of docetaxel efficacy.

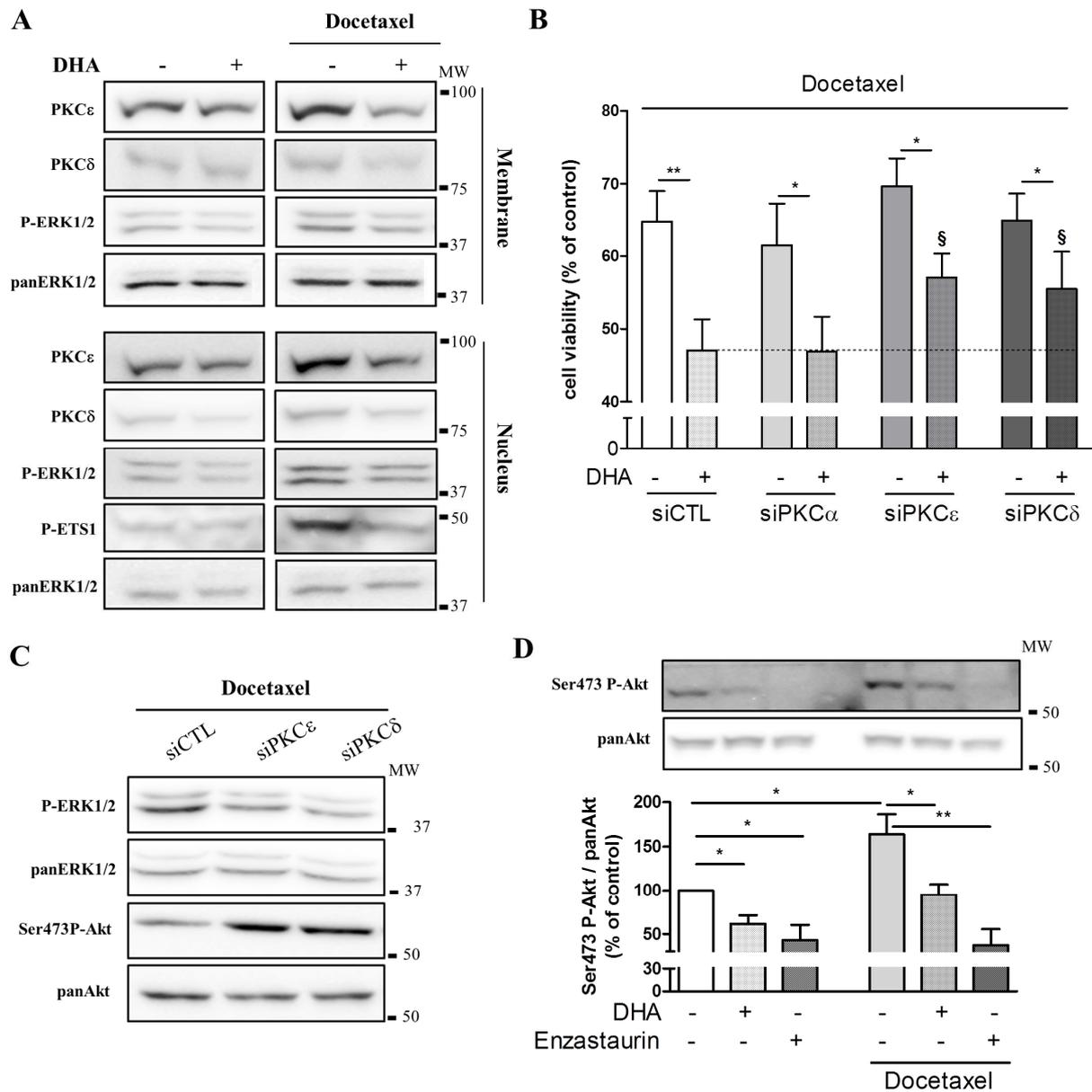


Fig.4. Downregulation of PKC ϵ / δ -ERK and Akt by DHA mediates its chemosensitizing effect. (A) Subcellular membrane and nuclear fractions were analysed by western blot for PKC ϵ , PKC δ , P-ERK1/2, panERK1/2, P-EST-1 expression. A representative western blot of 5 independent experiments is shown (MW in kDa). Cells were co-treated with DHA and docetaxel for 5 days. The figure was obtained by cropping blot image; all conditions are from the same membrane (full western blot is available in Supplementary, Figure S4) **(B)** Cell viability assay. Cells were transfected with siRNA targeting PKC α (siPKC α), PKC ϵ (siPKC ϵ), PKC δ (siPKC δ) or a non-targeting siRNA used as a control (siCTL) and were co-treated with docetaxel and DHA for 5 days prior to MTT assay (mean values \pm SEM, n=6 except for PKC α n=5). Statistical differences are indicated as followed: **p<0.01, *p<0.05 compared to the same siRNA in unsupplemented-DHA conditions; § P \leq 0.05 compared to siCTL with DHA (Wilcoxon Paired test). **(C)** The level of P-ERK1/2 and Ser473P-Akt was assayed by western blot in cells transfected with siRNA targeting PKC ϵ (siPKC ϵ), PKC δ (siPKC δ) or a non-targeting siRNA used as a control (siCTL). A representative western blot of 4 independent experiments is presented (MW in kDa) **(D)** A representative western blot (top, MW in kDa) and relative expression of Ser473P-Akt to pan Akt assayed by western blot in whole lysates. Cells were treated with DHA, docetaxel or enzastaurin for 5 days. (mean values \pm SEM, n=4). Statistical differences are indicated as followed: *P<0.05, **P<0.01 (Mann-Whitney test).

3.3 Dietary supplementation with n-3 LCPUFA prevents ERK and Akt phosphorylation induced during docetaxel chemotherapy in rat mammary tumors

Analysis of fatty acids composition in tumor phospholipids reveals that feeding rats with fish oil diet led to a strong incorporation of n-3 LCPUFA in the major phospholipids. The supplementary table 1 shows fatty acids composition of phospholipids (PC, PI, PE, PS and SM). PC and PE were the most diet-sensitive components, with 3.5 fold increase in n-3 PUFA levels. DHA was increased in the other phospholipids by ~ 2-fold, except in SM fraction.

In this study, tumor regression reached -70% in the docetaxel/n-3 LCPUFA group (**P<0.01) compared to -30% in the docetaxel/control nutritional group after 6 weeks of treatment (**P<0.01) (Figure 5A). As already observed, in the absence of docetaxel treatment, the n-3 LCPUFA diet did not modify tumor growth [20]. In order to determine whether n-3 LCPUFA were able to counteract tumor chemoresistance by regulating the ERK and Akt survival pathways, western blot and densitometric analyses were performed in mammary tumors from rats receiving a control or a n-3 LCPUFA-enriched diet before (W0) or after 6 weeks (W6) of docetaxel chemotherapy. The level of phosphorylated Akt (Figure 5B) and ERK1/2 (Figure 5C) was strongly increased by 5-fold (*P<0.05) and 2-fold (*P<0.05) respectively in tumors receiving docetaxel chemotherapy. In the n-3 LCPUFA-supplemented dietary group, the anticancer treatment did not activate the Akt and ERK signaling pathway (Figures 5B and C). Even more, a 2-fold decrease in P-ERK1/2 levels was measured in the n-3 LCPUFA tumors without chemotherapy (*P<0.05, Figure 5C). Finally, we show a significant correlation between P-ERK1/2 level and tumor regression between W0 and W6 in tumors obtained from both nutritional groups ($r^2=0.63$, **P<0.01; Figure 5D). No significant correlation between Ser473P-Akt level and tumor regression was observed. Taken together, these data suggest that tumors with increased ERK activation were more resistant to docetaxel treatment. Since ERK modulates cellular proliferation, cell cycle analysis was performed by

flow cytometry on tumors. A reduction in the number of cells in the S-phase was observed in tumors receiving docetaxel chemotherapy (-27 % compared to tumors without chemotherapy). This reduction was accentuated in docetaxel/n-3PUFA tumors (-53%, *P<0.05, Mann Whitney test) (supplementary table 2).

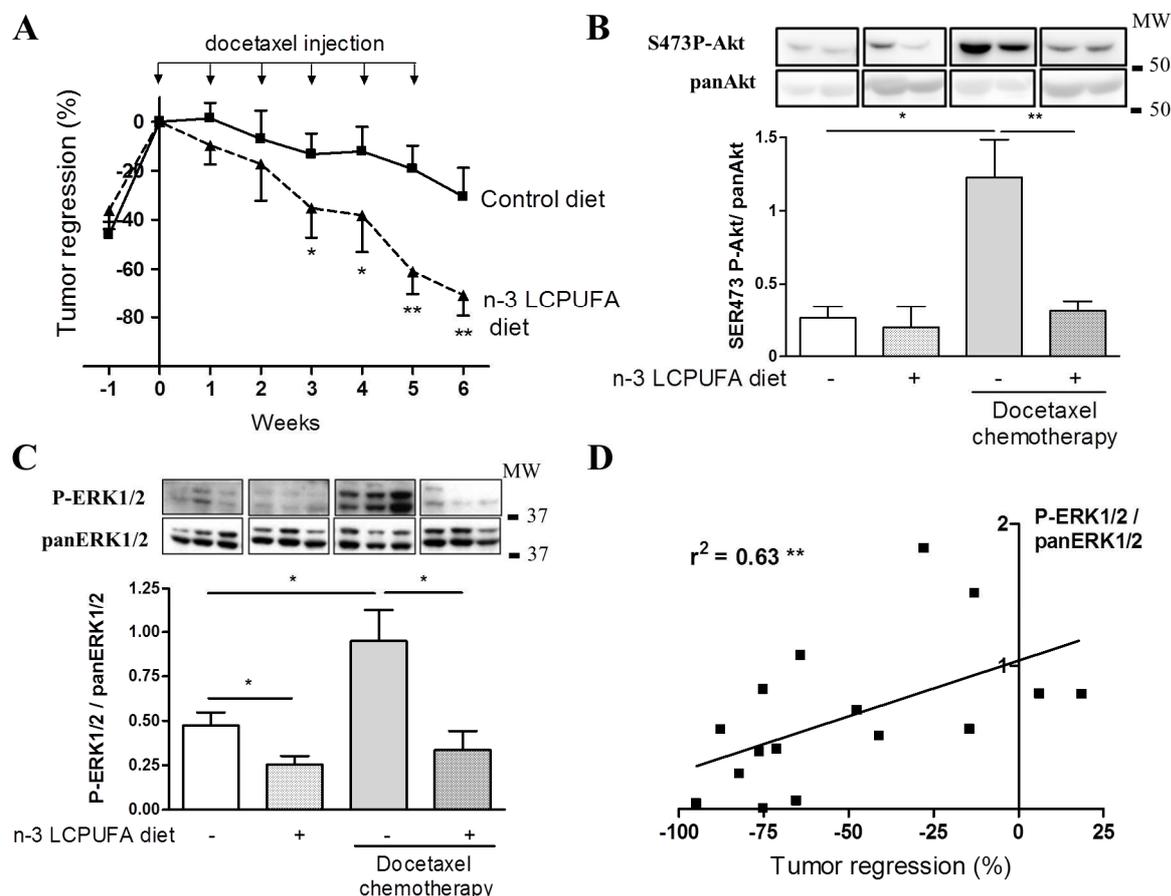


Fig.5. Dietary supplementation with n-3 LCPUFA prevents ERK1/2 and Akt phosphorylation induced by docetaxel chemotherapy in the mammary tumor rat model. Female rats carrying mammary tumors were fed a control diet (n = 14) or a n-3 PUFA enriched diet (n = 14). When tumors reached 2 cm², 8 rats per nutritional group were treated once a week with docetaxel for 6 weeks. (A) The beginning of chemotherapy was set as the reference and tumor regression was calculated as the percentage of tumor area variation between tumor size at the beginning of docetaxel treatment (W0) and at the end of treatment (W6). (B) Tumor protein extracts were analyzed by Western blot for Ser473P-Akt and pan Akt expression (MW in kDa). Results were quantified by densitometry and expressed as the ratio Ser473P-Akt to pan Akt. (C) Tumor protein extracts were analyzed by western blot for P-ERK1/2 and pan ERK1/2 expression (MW in kDa). Results were quantified by densitometry and expressed as the ratio P-ERK1/2 to pan ERK1/2. Statistical differences are indicated as followed: *p<0.05 or **p<0.01 (Mann-Whitney test) (D) Correlation between the response to docetaxel chemotherapy (% of tumor regression) and the P-ERK1/2/panERK1/2 ratio. Individual data of the 16 tumors treated with docetaxel (n=8/diet group) were used to determine the correlation (Spearman test, $r^2 = 0,63$, ** P<0,01).

4. Discussion

n-3 PUFA such as DHA have been shown to decrease resistance of experimental mammary tumors to several chemotherapeutic agents and to increase survival and chemotherapeutic efficacy in cancer patients [21, 22]. This study reports for the first time that n-3 LCPUFA are able, during docetaxel chemotherapy treatment, to interfere with ERK and Akt pathways that are involved in increased-cell survival and subsequent chemoresistance to taxanes. DHA supplementation led to decreased membrane-and nuclear-association of PKC ϵ and PKC δ in MDA-MB-231 cells treated with docetaxel and resulted in the downregulation of phosphorylated ERK1/2. Inhibition of P-ERK1/2 and Ser473P-Akt by DHA leads to subsequent sensitization of these cells to docetaxel. These antitumor effects of n-3 LCPUFA were further confirmed by a decrease of ERK and Akt activation in mammary tumors during chemotherapy with a strong impact of ERK regulation since its activation level was correlated with tumor regression.

Docetaxel treatment induced ERK activation which is involved in functions including cell proliferation and prevention of apoptosis (reviewed in [39]). This paradoxical activation of MAPK by an anticancer drug may contribute to chemoresistance by promoting survival pathway in human cancer cells. Our present study opens a promising field of research in the methods designed to improve taxane efficacy in preclinical and clinical studies. In this study, we showed increased membrane-and nuclear-associated PKC ϵ and PKC δ under docetaxel treatment alone, associated with an activation of the ERK1/2 pathway in the same compartments. Moreover, our kinetic studies identified an induction of cellular PA level during docetaxel treatment. Previous studies have reported that PA production determines the output of ERK activation and is critical for the delivery of active ERK to the nucleus of cancer cells [40]. Moreover, an increased PA level during docetaxel treatment has already been reported by Maestre et al., who also showed subsequent DAG production related to the

conversion between PA and DAG [14]. DAG production should also be induced by docetaxel, since the enzymatic activity of PKC was increased by 30% in docetaxel-treated cells. Propanolol and DAG kinase inhibitor, inhibitors of the conversion of PA to DAG and of DAG to PA respectively, blocked ERK1/2 phosphorylation induced by docetaxel showing that the production and an appropriate balance of these second messengers are required for ERK1/2 phosphorylation. Since DAG and PA are involved in the translocation of PKCs from the cytosol to the plasma membrane and their activation, the mechanism regulating PKC ϵ/δ induction by docetaxel appears to be linked to the induction of these second lipid messengers. While the actions of the various PKCs in the carcinogenesis process are controversial, PKC ϵ seems to distinguish itself by its pro-oncogenic role (reviewed in [41]). PKC ϵ may also have a role in resistance of tumor cells to anticancer agents [8, 10]. PKC δ is generally considered to have opposite effect to PKC ϵ with its growth inhibitory or pro-apoptotic effects [13]. However, several studies have shown that PKC δ could also be a pro-mitogenic kinase due to its ability to stimulate ERK in mammary tumor cell lines [9]. In the present study, PKC ϵ appears to act in concert with the δ isoform.

Our data demonstrate that DHA can inhibit the docetaxel-induced translocation of PKC ϵ and PKC δ to membranes and nucleus and therefore prevents ERK activation. The inhibitory effect of the translocation by DHA could be attributed to a lack of PA burst since docetaxel was not able to raise PA level in DHA-supplemented cells. We also show that DHA was incorporated in all phospholipids including PA and there is accumulating evidences showing that fatty acid composition of cellular membrane phospholipids (such as PI and PC) can influence intracellular signalling pathways [28, 42–44]. Fatty acid composition of DAG and PA is determined by that of the phospholipid precursors, and this can influence the translocation and activity of PKCs. Our results are according to those Madani et al. that have shown that DAG molecules containing EPA or DHA at the sn-2 position are less efficient to

activate PKC ϵ and PKC δ than those carrying arachidonic acid [45]. In this study, the n-3 LCPUFA diet used for the *in vivo* study contained both DHA and EPA. In addition to DHA, we cannot exclude a potential effect of EPA. Indeed, a chemosensitizing effect of EPA has been observed “in vitro” on MDA-MB-321 cells by our group, with a lesser efficacy compared to that of DHA (data not shown). This effect of EPA on taxane efficacy is corroborated by results already reported [46]

In addition to ERK regulation, we also show that DHA repressed docetaxel-induced Ser473-Akt phosphorylation in mammary tumor cells. Previous studies have established that phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) phosphorylates Akt at the Thr308 site [47]. The identity of the Ser473 kinase(s) has been elusive. To date several candidates have been proposed, including the mTORC2 complex [47] or PKCs. Several studies have suggested that specific PKC isoforms are required for Ser473-Akt phosphorylation. These PKCs include PKC α , the novel isoform PKC ϵ and PKC η [48–50]. We cannot rule out that one or several PKC isoforms are involved in docetaxel-induced Ser473Akt phosphorylation but PKC ϵ seems to be excluded since its downregulation upregulated Ser473P-Akt (Figure 4C). Moreover, PA or phosphatidylinositol triphosphate would be required for mTORC2 assembly or activation [51, 52]. Therefore, the incorporation of n-3 LCPUFA in membrane phospholipids could modify complex mTORC2 activity leading to Ser473P-Akt regulation.

Enzastaurin, a well-known PKC inhibitor, also targets the PI3K/Akt pathway [53]. Enzastaurin has been evaluated in phase II clinical trial to investigate the safety and efficacy of enzastaurin monotherapy in patients with anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer. However, enzastaurin, administered after chemotherapy, did not demonstrate any significant antitumor activity in this patient population [54]. Our results showing that enzastaurin can block the ERK signaling pathway and sensitized mammary tumour cells to docetaxel, may suggest that administration of enzastaurin in combination with docetaxel

chemotherapy (not in monotherapy) may improve tumor response and potentially disease-free survival in breast cancer patients.

Given the extent of overlap and interactions between the two major survival pathways that are ERK and Akt (reviewed in [38]), an emerging strategy in breast cancer therapy is to target both pathway, as reviewed by Saini et al. [55]. The major inconvenient and the main limitation of this therapeutic strategy is the cumulative toxic side effects. In that regard, our study clearly validates the use of n-3 LCPUFA to inhibit these two major survival pathways, and n-3 LCPUFA are safe alternatives that are not associated with additional side effect [17–20].

The present study reports that n-3 LCPUFA can strongly sensitize mammary cancer cells to a major anticancer agent used in breast cancer treatment by interfering with PKC-ERK and Akt survival pathways. Our preclinical data are consistent with the findings of two published Phase II trial using PUFA for patients treated for breast and lung cancer [21, 22] and reinforce the rationale for a phase III clinical trial testing the importance n-3 LCPUFA supplementation for conventional cancer treatment. Futhermore, these findings may be of potential clinical importance in treating chemotherapy-refractory cancer.

Abbreviations

CL: Cardiolipin, DAG: Diacylglycerol, DHA: Docosahexaenoic Acid, DMSO: Dimethyl sulfoxide, ECL: Enhanced Chemiluminescence, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, EPA: Eicosapentaenoic Acid, ERK: Extracellular signal-Related Kinase, HP-TLC: High Performance Thin Layer Chromatography, MEK: Mitogen Extracellular signal-regulated Kinase, MW: Molecular Weight, n-3 PUFA: n-3 PolyUnsaturated Fatty Acids, n-3 LCPUFA: n-3 Long Chain PolyUnsaturated Fatty Acids, NMU: N-Nitroso-N-methylurea, PA: Phosphatidic Acid, PBS: Phosphate Buffer Saline, PC: Phosphatidylcholine, PE:

Phosphotidylethanolamine, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine, PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase, PKC: Protein Kinase C, SD: standard deviation, siRNA: Small Interference Ribonucleic Acid, SEM; Standard Error of the Mean, Ser: Serine, SM: Sphingomyelin, Thr: Threonine, TLC: Thin Layer Chromatography, Tyr: Tyrosine.

Funding :

This work was supported by grants from « Ligue Nationale contre le Cancer » (Comités 37, 41 and 49) « Cancéropôle Grand Ouest », « Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale » (Inserm), « Fonds Européens de Développement Régional » (FEDER), and the Région Centre. Cyrille Guimaraes was the recipient of a fellowship from the Lipid project «ARD 2020 Biomédicaments ». Lucie Chauvin 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.

Acknowledgements

We thank Louise Dupoirion, Morgan Bertrand and Emilie Cagnat for their technical assistance. We thank Hélène Bénédicti for its expertise and advices on MAPK pathway.

Conflict of Interest Statement : None declared

References

1. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. (2008) Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* ,**1785**,96–132
2. Yasumizu Y, Miyajima A, Kosaka T, Miyazaki Y, Kikuchi E, Oya M. (2014) Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Sensitizes Docetaxel in Castration Resistant Prostate Cancer. *J Urol* ,**191**,227–234

3. Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. (2002) Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* ,**1**,707–717
4. Mhaidat NM, Zhang XD, Jiang CC, Hersey P. (2007) Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Clin Cancer Res* ,**13**,1308–14
5. Okano J, Rustgi AK. (2001) Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem* ,**276**,19555–64
6. Jeong EK, Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Kim CH, Kang HS. (2010) Role of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in multicellular resistance to docetaxel in MCF-7 cells. *Int J Oncol* ,**37**,655–661
7. McDaid HM, Lopez-Barcons L, Grossman A, Lia M, Keller S, Pérez-Soler R, Horwitz SB. (2005) Enhancement of the therapeutic efficacy of taxol by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 in nude mice bearing human heterotransplants. *Cancer Res* ,**65**,2854–60
8. Mhaidat NM, Thorne RF, Zhang XD, Hersey P. (2007) Regulation of docetaxel-induced apoptosis of human melanoma cells by different isoforms of protein kinase C. *Mol Cancer Res* ,**5**,1073–81
9. Grossoni VC, Falbo KB, Kazanietz MG, Bal ED, Joffe DK, Urtreger AJ. (2007) Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog* ,**46**,381–390
10. Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L. (2002) Protein kinase C- ϵ promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. *J Biol Chem* ,**277**,35305–35313
11. Diaz Bessone MI, Berardi DE, Campodónico PB, Todaro LB, Lothstein L, Bal De Kier Joffe ED, Urtreger AJ. (2011) Involvement of PKC delta (PKC δ) in the resistance against different doxorubicin analogs. *Breast Cancer Res Treat* ,**126**,577–587
12. McCracken MA, Miraglia LJ, McKay RA, Strobl JS. (2003) Protein Kinase C δ Is a Prosurvival Factor in Human Breast Cell lines. *Mol Cancer Ther* ,**2**,273–281
13. Griner EM, Kazanietz MG. (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* ,**7**,281–94
14. Maestre N, Bezombes C, Plo I, Levade T, Lavelle F, Laurent G, Jaffrézou J-P. (2003) Phosphatidylcholine-derived phosphatidic acid and diacylglycerol are involved in the signaling pathways activated by docetaxel. *J Exp Ther Oncol* ,**3**,36–46
15. Lopez-andreo MJ, Gomez-fernandez JC, Corbalan-garcia S. (2003) The Simultaneous Production of Phosphatidic Acid and Diacylglycerol Is Essential for the Translocation

of Protein Kinase C epsilon to the Plasma Membrane in RBL-2H3 Cells. *Mol Biol Cell* ,**14**,4885–4895

16. Limatola C, Schaap D, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. (1994) Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids. *Biochem J* ,**304**,1001–1008
17. Biondo PD, Brindley DN, Sawyer MB, Field CJ. (2008) The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem* ,**19**,787–96
18. Calviello G, Serini S, Piccioni E, Pessina G. (2009) Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutr Cancer* ,**61**,287–301
19. Bougnoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C, Chevalier S. (2010) Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* ,**49**,76–86
20. Kornfeld S, Goupille C, Vibet S, Chevalier S, Pinet A, Lebeau J, Tranquart F, Bougnoux P, Martel E, Maurin A, Richard S, Champeroux P, Mahéo K. (2012) Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance. *Carcinogenesis* ,**33**,260–7
21. Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. (2009) Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* ,**101**,1978–85
22. Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QSC, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC. (2011) Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* ,**117**,3774–80
23. Vibet S, Mahéo K, Goré J, Dubois P, Bougnoux P, Chourpa I. (2007) Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines. *Drug Metab Dispos* ,**35**,822–828
24. Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens J-P, Goré J, Mahéo K. (2008) Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic Biol Med* ,**44**,1483–91
25. Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, Le Floch O, Ogilvie G, Bougnoux P. (2004) Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer* ,**109**,449–54
26. Wannous R, Bon E, Mahéo K, Goupille C, Chamouton J, Bougnoux P, Roger S, Besson P, Chevalier S. (2013) PPAR β mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth. *Biochim Biophys Acta* ,**1831**,1618–25
27. Calder PC. (2012) Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* ,**142**,592S–599S

28. Gu Z, Wu J, Wang S, Suburu J, Chen H, Thomas MJ, Shi L, Edwards IJ, Berquin IM, Chen YQ. (2013) Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* ,**34**,1968–1975
29. Sato SB, Park J, Kawamoto J, Sato S, Kurihara T. (2013) Inhibition of constitutive Akt (PKB) phosphorylation by docosahexaenoic acid in the human breast cancer cell line MDA-MB-453. *Biochim Biophys Acta* ,**1831**,306–13
30. Ma DWL, Seo J, Davidson LA, Callaway ES, Fan YY, Lupton JR, Chapkin RS. (2004) n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J* ,**18**,1040–2
31. Judé S, Martel E, Vincent F, Besson P, Couet C, Ogilvie GK, Pinaulr M, De Chalendar C, Bougnoux P, Richard S, Champeroux P, Crozatier B, Le Guennec JY. (2007) Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. *Br J Nutr* ,**98**,1143–51
32. Pandian SS, Sneddon AA, Bestwick CS, McClinton S, Grant I, Wahle KW, Heys SD. (2001) Fatty acid regulation of protein kinase C isoforms in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* ,**283**,806–12
33. Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan M-L. (2006) 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* ,**38**,196–208
34. Lønne GK, Masoumi KC, Lennartsson J, Larsson C. (2009) Protein kinase Cdelta supports survival of MDA-MB-231 breast cancer cells by suppressing the ERK1/2 pathway. *J Biol Chem* ,**284**,33456–65
35. Bligh E, Dyer W. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* ,**37**,911–7
36. Dória ML, Cotrim Z, MacEdo B, Simões C, Domingues P, Helguero L, Domingues MR. (2012) Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* ,**133**,635–648
37. Arvier M, Lagoutte L, Johnson G, Dumas J-F, Sion B, Grizard G, Malthièry Y, Simard G, Ritz P. (2007) Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* ,**293**,E1320–E1324
38. Mendoza MC, Emrah Er E, Blenis J. (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* ,**36**,320–328
39. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. (2008) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase / MAP Kinase Phosphatase Regulation: Roles in Cell Growth , Death , and Cancer. *Pharmacol Rev* ,**60**,261–310

40. Zhang F, Wang Z, Lu M, Yonekubo Y, Liang X, Zhang Y, Wu P, Zhou Y, Grinstein S, Hancock JF, Du G. (2014) Temporal production of the signaling lipid phosphatidic Acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells. *Mol Cell Biol* ,**34**,84–95
41. Basu A, Sivaprasad U. (2007) Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal* ,**19**,1633–42
42. Miles E a, Calder PC. (1998) Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc* ,**57**,277–292
43. Le Guennec JY, Jude S, Besson P, Martel E, Champeroux P. (2010) Cardioprotection by omega-3 fatty acids: Involvement of PKCs? *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* ,**82**,173–177
44. Madani S, Hichami A, Cherkaoui-Malki M, Khan NA, Charkaoui-Malki M. (2004) Diacylglycerols containing Omega 3 and Omega 6 fatty acids bind to RasGRP and modulate MAP kinase activation. *J Biol Chem* ,**279**,1176–83
45. Madani S, Hichami A, Legrand A, Belleville J, Khan NA. (2001) Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J* ,**15**,2595–601
46. Menéndez JA, Mer Barbacid M, Montero S, Sevilla E, Escrich E, Solanas M, Cortés-Funes H, Colomer R. (2001) Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur J Cancer* ,**37**,402–413
47. Chan C-H, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou P-C, Logothetis C, Lin H-K. (2014) Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci* ,**4**,59
48. Partovian C, Simons M. (2004) Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal* ,**16**,951–7
49. Lu D, Huang J, Basu A. (2006) Protein kinase Cε activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-α-induced cell death. *J Biol Chem* ,**281**,22799–22807
50. Aeder SE, Martin PM, Soh JW, Hussaini IM. (2004) PKC-eta mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* ,**23**,9062–9
51. Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster DA. (2009) Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol* ,**29**,1411–20
52. Gan X, Wang J, Su B, Wu D. (2011) Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* ,**286**,10998–11002
53. Graff JR, McNulty AM, Ross Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, Sams L, Huss KL, Campbell RM, Iversen PW,

- Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, Geeganage S, Thornton D. (2005) The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res* ,**65**,7462–9
54. Mina L, Krop I, Zon RT, Isakoff SJ, Schneider CJ, Yu M, Johnson C, Vaughn LG, Wang Y, Hristova-Kazmierski M, Shonukan OO, Sledge GW, Miller KD. (2009) A phase II study of oral enzastaurin in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane containing regimen. *Invest New Drugs* ,**27**,565–570
55. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, Dancey JE, Piccart-Gebhart MJ. (2013) Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev* ,**39**,935–946

SUPPLEMENTARY MATERIAL

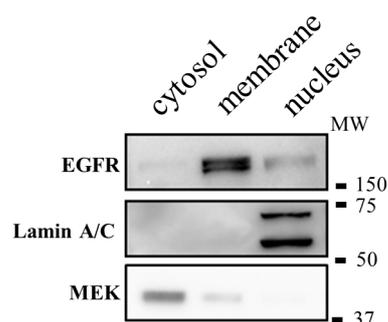


Figure S1. Relative purity of subcellular fractions. For cytosol preparations, membrane and nuclear proteins extractions, cells were prepared using a subcellular fractionation kit. The relative purity of each fraction (40 μ g) was ascertained by western blot analysis using anti-EGFR, anti-MEK, anti-LaminA/C antibodies as markers of membrane, cytosol, and nuclear fractions, respectively.

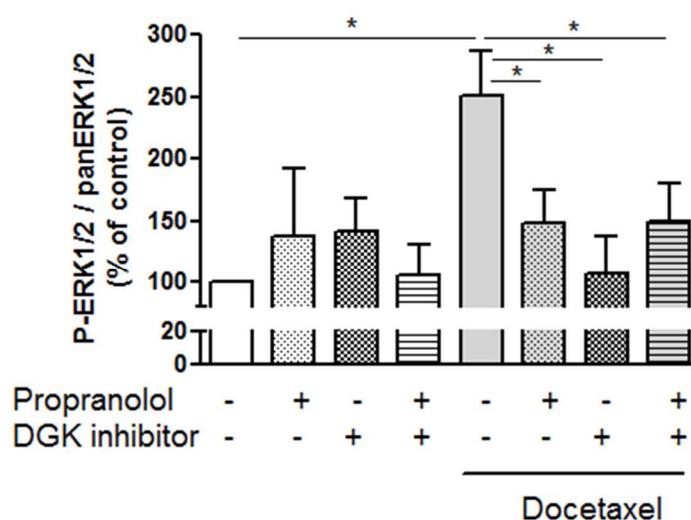


Figure S2. Inhibition of conversion between DAG and PA blocks ERK phosphorylation induced by docetaxel. Inhibitors of the conversion of PA to DAG (Propranolol) and of DAG to PA (DAG kinase inhibitor) were used. Cells were pre-treated for 1h with propranolol (50 μ M) and DGK inhibitor (10 μ M) followed by docetaxel treatment (1 nM) that was applied for 15 min. Whole cell lysate were subjected to western blot analysis for P-ERK1/2 and panERK1/2. Relative expressions of P-ERK1/2 to panERK1/2 (mean values \pm SEM, n=4) are presented. Statistical differences are indicated as followed: *P<0.05 (Mann-Whitney test).

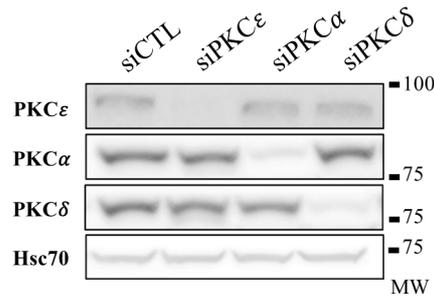


Figure S3. Efficacy of RNA interference targeting PKC isoforms in MDA-MB-231 cells. Cells were transfected with siRNA targeting PKC α (siPKC α), PKC ϵ (siPKC ϵ), PKC δ (siPKC δ) or a non-targeting siRNA used as a control (siCTL). 96H after transfection, cells were subjected to western blot analysis for PKC ϵ and PKC δ expression. After stripping, the same membrane was reprobed with PKC α antibody and with Hsc70 antibody for loading control. A representative western blot of 3 independent experiments is presented.

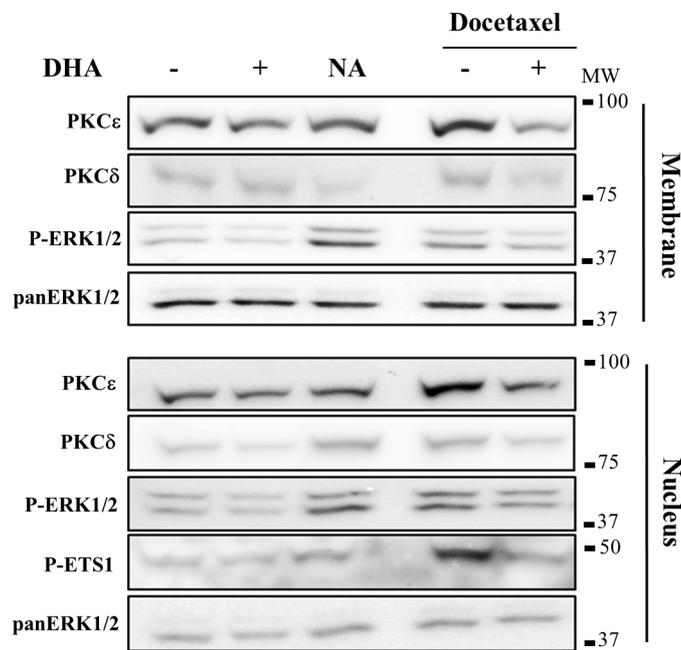


Figure S4. DHA represses docetaxel-induced P-ERK1/2, PKC ϵ , and PKC δ in membrane and nucleus. Cells were co-treated with DHA (30 μ M) and docetaxel (0.75nM) for 5 days. Subcellular membrane and nuclear fractions were analysed by western blot as described in figure legend 4A. The non-cropping western blot is shown. NA= not applicable.

	Composition of PI		Composition of PC		Composition of PE		Composition of PS		Composition of SM	
	n=6	n=5	n=5	n=3	n=4	n=6	n=4	n=5	n=4	n=6
	Control Diet	FishOil Diet	Control Diet	FishOil Diet	Control Diet	FishOil Diet	Control Diet	FishOil Diet	Control Diet	FishOil Diet
Fatty acids										
Sat. ⁽¹⁾	48,2 ± 4,3	48,5 ± 5,4	42,2 ± 5,2	44,5 ± 4,0	22,9 ± 1,9	25,4 ± 4,9	45,7 ± 2,2	47,0 ± 5,0	64,5 ± 3,3	66,1 ± 3,3
MUFA ⁽²⁾	12,4 ± 2,2	14,8 ± 3,1	26,5 ± 5,2	25,3 ± 4,4	17,7 ± 2,2	16,7 ± 2,6	29,8 ± 3,5	29,4 ± 5,4	27,0 ± 3,4	26,4 ± 4,1
n-6 PUFA ⁽³⁾	30,4 ± 6,8	26,4 ± 5,5	23,9 ± 2,2	20,3 ± 2,1	32,5 ± 2,8	28,4 ± 5,0	13,9 ± 1,7	10,8 ± 2,8	2,4 ± 1,0	1,7 ± 0,4
n-3 PUFA										
20:5n-3 (EPA)	0,1 ± 0,04	0,8 ± 0,7*	0,1 ± 0,03	1,8 ± 0,6*	0,1 ± 0,1	3,0 ± 1,5*	0,1 ± 0,05	0,5 ± 0,2**	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,1
22:6n-3 (DHA)	1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,7**	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,3*	2,7 ± 0,6	6,0 ± 2,1**	1,5 ± 0,4	3,3 ± 1,3**	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,1
Total ⁽⁴⁾	1,5 ± 0,4	3,2 ± 1,3**	1,4 ± 0,2	4,9 ± 0,8*	3,3 ± 0,5	11,5 ± 3,9**	2,0 ± 0,6	5,5 ± 1,9**	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2

(1) Saturates included 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0

(2) Monoinsaturates included 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1n-9c, 20:1, 22:1, 24:1

(3) n-6 Polyunsaturates included 18:2 n-6c, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:4n-6

(4) n-3 Polyunsaturates included 18:3, 20:3n-3, 22:5n-3

Table S1. Fatty acid composition of phosphoinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and sphingomyelin (SM) in rat tumors. After total lipids extraction, tumor phospholipids of rats fed a control or a n-3 LCPUFA-enriched diet (Fish oil diet) were separated by TLC and fatty acid composition was analysed by gas chromatography (mean values ± SEM). Statistical differences (from control conditions) are indicated as followed: **P<0.01 or *P<0.05 (Mann-Whitney test).

			Docetaxel chemotherapy	
	Control diet	n-3 LCPUFA diet	Control diet	n-3 LCPUFA diet
% of cell in S phase	6,1 ± 4,5	5,9 ± 1,2	4,5 ± 0,8	2,9 ± 0,6 (*)

Table S2 Dietary supplementation with n-3 LCPUFA accentuates the reduction in the number of cells in the S-phase in tumors under docetaxel chemotherapy. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry with propidium iodide labeling on tumor extracts from the 2 nutritional groups (mean values ± SEM). Statistical differences are indicated as followed: *P<0.05 (Mann-Whitney test).

Chapitre 3. Résultats complémentaires

1. Chimiosensibilisation au docétaxel *in vitro*

Le DHA augmente la sensibilité au docétaxel d'environ 30%. Les effets de l'EPA (autre AGPI n-3LC : 20 :5n-3) et de deux acides gras mono-insaturés : l'acide palmitoléique (16 :1n-7) et l'acide oléique (18 :1n-9) ont été testés. L'EPA (20 :5n-3) présent dans le régime alimentaire des rats de l'étude animale, sensibilise également la lignée cellulaire MDA-MB-231 au docétaxel. Cependant, comparé au DHA, son pouvoir sensibilisant semble moindre : à une dose de 0.35nM de docétaxel, l'EPA diminue la viabilité cellulaire de 11% (*p<0.05) contre une diminution de 22% (**p<0.01) en présence de DHA (**figure 39**). Les acides gras mono-insaturés testés, l'acide palmitoléique (16 :1n-7) et l'acide oléique (18 :1n-9) n'augmentent pas l'efficacité du docétaxel.

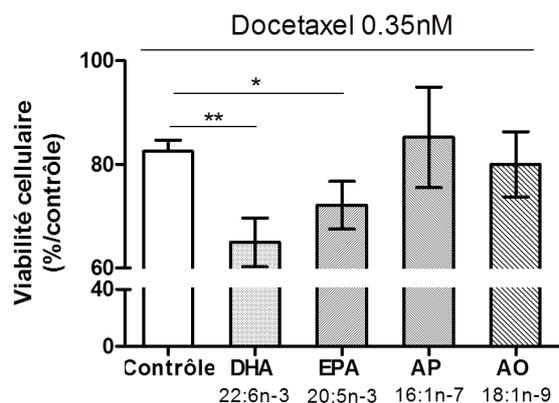


Figure 39. Comparaison de l'effet chimiosensibilisant de plusieurs acides gras à longues chaînes de carbone.

Test de chimiosensibilisation sur 7 jours. Les cellules MDA-MB-231 sont co-traitées avec 0.35 nM de docétaxel +/- 30 μ M d'acide gras. Pour chaque condition, le résultat est exprimé en % de viabilité cellulaire par rapport au contrôle approprié (non représenté sur la figure). N \geq 4, moyenne +/- SEM, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01 (Mann-Whitney)

Précédemment au laboratoire, il a été montré que le stress oxydant était impliqué dans l'effet sensibilisant des AGPI n-3LC aux anthracyclines (Colas *et al*, 2005, 2006; Germain *et al*, 1998; Vibet *et al*, 2008) et à la radiothérapie (Colas *et al*, 2004). Dans la lignée MDA-MB-231, l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine est aboli en présence d'un antioxydant, l' α -tocophérol (Germain *et al*, 1998). L'EC50 du docétaxel en présence de DHA ou d'une combinaison DHA/ α -tocophérol n'est pas modifié (respectivement, 0.27 nM et 0.29 nM) (**figure 40**).

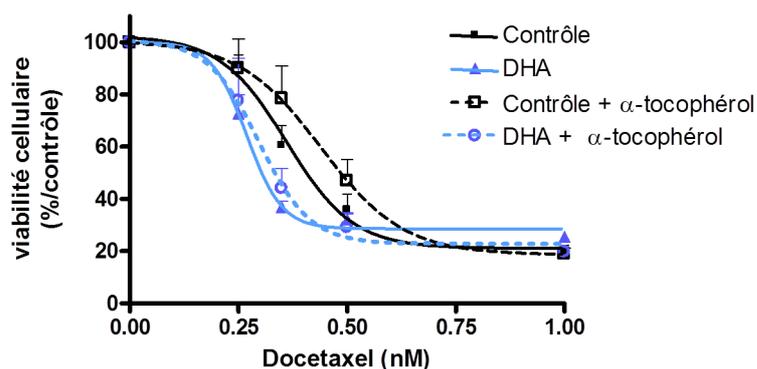


Figure 40. Effet chimiosensibilisant du DHA en présence d' α -tocophérol, molécule anti-oxydante.

Test de chimiosensibilisation sur 7 jours réalisé avec une gamme de docétaxel. Les cellules MDA-MB-231 sont co-traitées par du docétaxel +/- DHA (30 μ M) +/- α -tocophérol (10 μ M). N =3, moyenne +/- SEM.

L' α -tocophérol, connue pour ses propriétés anti-oxydantes et son effet protecteur contre la peroxydation lipidique des phospholipides (Liebler *et al*, 1986), ne modifie pas l'effet sensibilisant du DHA. Les différences de viabilité cellulaire observées sur la figure 40 entre les cellules contrôles et les cellules traitées par α -tocophérol ne sont pas statistiquement différentes. Nous pouvons noter que l' α -tocophérol tend à diminuer l'efficacité du docétaxel.

Une deuxième molécule anti-oxydante a été testée. L'ajout de thiourée (10 μ M) ne semble pas avoir d'impact sur l'effet du DHA (n=3, non montré).

Ces données suggèrent que le stress oxydant n'est pas impliqué dans la sensibilisation des cellules MDA-MB-231 au docétaxel par le DHA.

A. Effets biologiques de la chimiosensibilisation

Le MTT est un test couramment utilisé permettant d'évaluer la quantité de cellules viables. Dans notre étude, ce test réalisé en point final après 7 jours de culture, ne permet pas la distinction entre mort cellulaire et prolifération. La chimiosensibilisation est réalisée avec de faibles doses de docétaxel et une application chronique correspondant à 4 traitements avec un traitement par jour. Afin de mieux comprendre l'action du docétaxel et d'étudier l'effet du DHA dans notre modèle, nous avons évalué : i) l'apoptose en mesurant l'activité des caspases effectrices 3 et 7 et, ii) la prolifération cellulaire en évaluant l'incorporation de BrDU par ELISA.

Ces paramètres ont été évalués après chaque jour de traitement. Les résultats présentés dans la figure 40 correspondent aux effets du 2^{ème} et du 4^{ème} traitement docétaxel+/-DHA.

L'objectif étant d'étudier le mécanisme de potentialisation, les conditions docétaxel+DHA sont normalisées par rapport à la condition DHA seul. Le DHA seul, à 20µM, ne diminue pas l'incorporation de BrDU dans les cellules MDA-MB-231 et augmente l'activité caspase d'environ 20%. L'analyse des résultats se concentre sur les faibles doses de docétaxel, 0.35 nM et 0.5 nM, conditions dans lesquelles on observe l'effet sensibilisant du DHA (voir figure 32A, courbe de chimiosensibilisation).

Au deuxième jour de traitement, le docétaxel tend à augmenter la prolifération cellulaire (**figure 41A_BrDU**). Cet effet précoce du docétaxel a également été observé grâce à un système d'analyse cellulaire en temps réel (xCELLigence, Ozyme) (n=2, non montré). Un co-traitement avec du DHA tend à contrecarrer l'effet prolifératif précoce du docétaxel (**figure 41A_BrDU**). A ce temps de traitement, le docétaxel n'induit pas d'apoptose (**figure 41A_activité caspase**). Le test MTT de viabilité cellulaire, réalisé en parallèle, ne serait pas assez sensible pour traduire l'effet précoce observé sur la prolifération cellulaire (**figure 41A_viabilité cellulaire**).

Au 4^{ème} jour de traitement, aux doses de 0.35 et 0.5 nM, le docétaxel tend à diminuer la prolifération cellulaire (**figure 41B_BrDU**) et induit de l'apoptose (**figure 41B_Activité caspase**). Cela se reflète par une diminution de la viabilité cellulaire globale (**figure 38B_viabilité cellulaire**). Le DHA tend à potentialiser l'effet anti-prolifératif du docétaxel (**figure 38B_BrDU**) mais ne semble pas potentialiser l'effet sur l'apoptose induite par l'agent anti-cancéreux (**figure 38B_activité caspase**).

Ces expériences ont été réalisées avec une dose plus faible de DHA (20 µM) par rapport aux expériences de chimiosensibilisation classique (30 µM de DHA) et n'ont pas été reproduites un nombre de fois suffisant pour observer des effets robustes et significatifs. Malgré cela, ces données suggèrent que l'effet précoce du docétaxel sur la prolifération est moindre en présence de DHA alors que l'effet tardif du docétaxel sur l'apoptose n'est pas modifié en présence de DHA. Ainsi, l'effet sensibilisant du DHA serait le reflet d'une modification de la prolifération cellulaire. L'effet sensibilisant du DHA, à 20 µM, commence à être mesurable par le MTT à partir de 4 traitements.

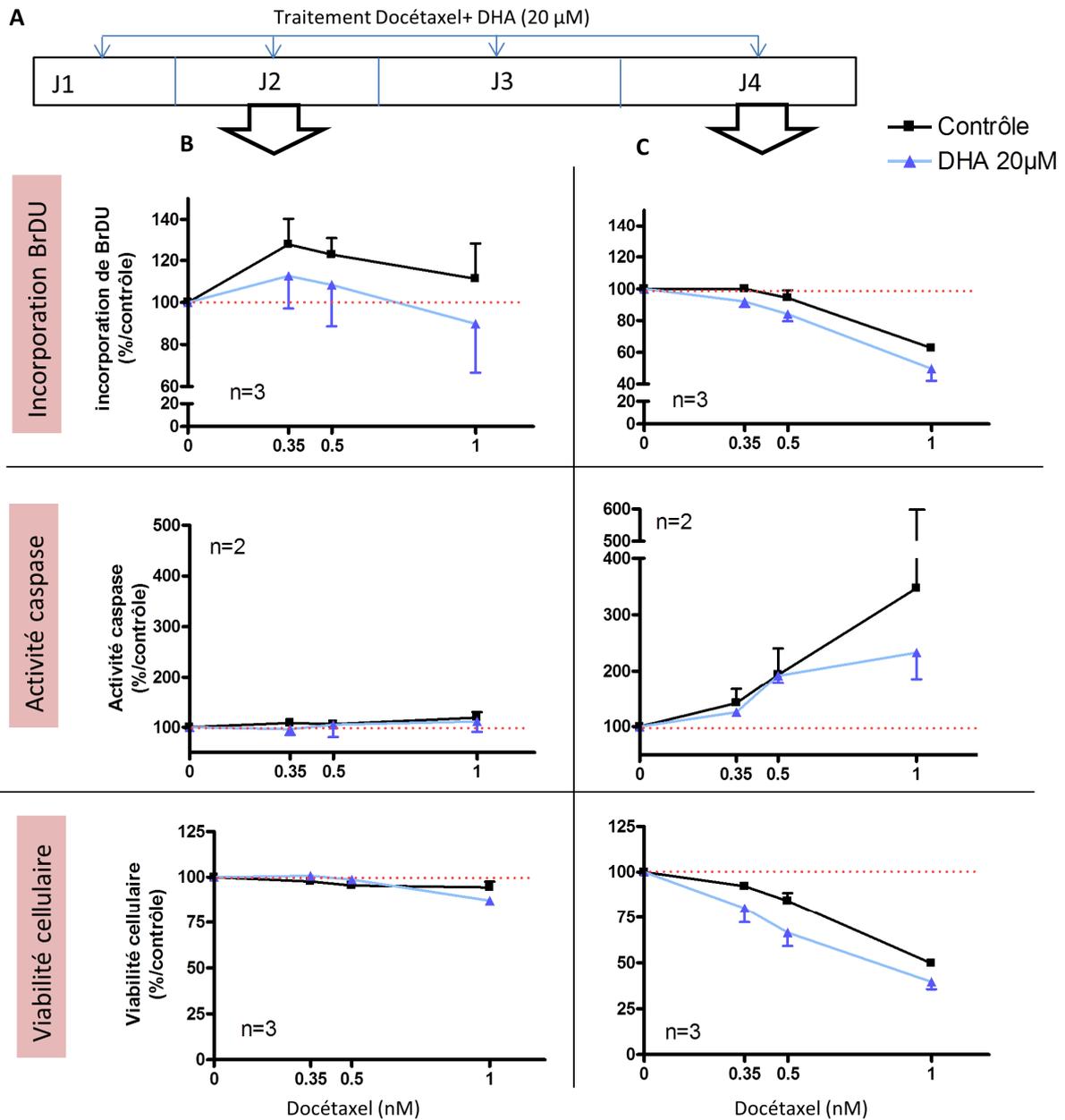


Figure 41. Evaluation de l'apoptose, de l'incorporation de BrDU et de la viabilité cellulaire au cours du protocole de chimiosensibilisation.

A_ Schéma expérimental. Les cellules MDA-MB-231 sont co-traitées avec du docétaxel et du DHA (20 μ M). La BrDU est ajoutée au milieu de culture au moment du traitement docétaxel+/-DHA et son incorporation dans l'ADN est évaluée 18 h après. L'activité caspase et la viabilité cellulaire par un test MTT sont évaluées environ 18 h après le traitement docétaxel +/-DHA. B_ Incorporation de BrDU, activité caspase et viabilité cellulaire correspondant à l'effet du 2^{ème} traitement docétaxel +/- DHA. C_ Incorporation de BrDU, activité caspase et viabilité cellulaire correspondant à l'effet du 4^{ème} traitement docétaxel +/- DHA. Moyenne +/- SD.

Le protocole de chimiosensibilisation classique correspond à 4 jours de co-traitement docétaxel +/-DHA et un test MTT réalisé à J+7 (voir matériels et méthodes). Les effets du DHA semblant précoces, nous avons conçu un protocole pour évaluer l'effet du DHA sur la chimiosensibilisation au docétaxel à chaque jour de traitement alors que le docétaxel continue d'être appliqué chaque jour (**figure 42A**).

A la dose de 0.35 nM de docétaxel, la viabilité cellulaire après 7 jours de culture est diminuée de 15% avec un seul traitement DHA (ns), de 20% avec deux traitements (ns), de 28% avec 3 traitements (* $p < 0.05$) et de 31% avec 4 traitements DHA (** $p < 0.01$) (**figure 42B**).

Les trois premiers jours de co-traitement apparaissent suffisants pour observer un effet sensibilisant maximal du DHA de 30%. Un 5^{ème} ou 6^{ème} co-traitement n'augmentent pas son effet sensibilisant (non montré, $n=3$).

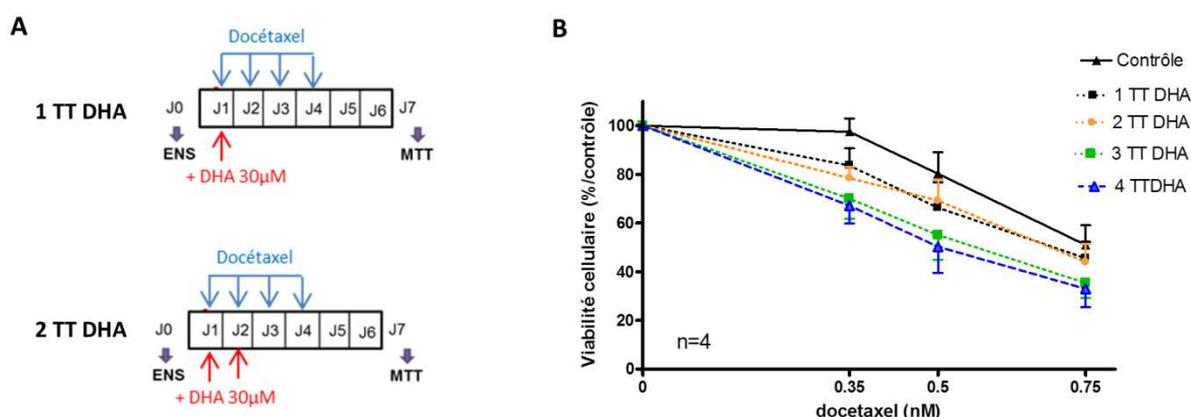


Figure 42. Chimiosensibilisation des MDA-MB-231 au docétaxel en fonction du nombre de traitements DHA.

A_ Protocole de chimiosensibilisation sur 7 jours correspondant aux conditions 1 et 2 traitements DHA. B_ Viabilité cellulaire obtenue par un test MTT à J+7. ($n=4$, moyenne +/- SEM, Test Mann-Whitney). TT : traitement

2. Etude des voies de signalisation

L'objectif de cette partie est de présenter des expériences complémentaires afin de mieux comprendre l'effet du docétaxel et du DHA sur les différentes signalisations, malgré des données parfois fragmentées et préliminaires.

Deux types d'effets et d'expériences sont à distinguer : i) des effets aigus observés après une application de docétaxel sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et

ii) des effets chroniques observés après plusieurs applications de docétaxel sur les cellules MDA-MB-231 ou dans le modèle de tumeurs mammaires *in vivo*.

A. Etude de la signalisation PKC/ERK1/2

Modèle cellulaire MDA-MB-231

Nous avons montré qu'un traitement chronique par le docétaxel mène au recrutement membranaire et nucléaire des PKC ϵ/δ et augmente l'activité kinase des PKCs, ce qui est associé à l'activation de ERK1/2. Le DHA bloque le recrutement, l'activité PKCs et la phosphorylation de ERK1/2 induits par le docétaxel. Ces données figurent dans la partie résultats et correspondent à des traitements chroniques. Nous avons vérifié que l'effet du DHA était également observable dans des conditions de traitement aigu (une application de docétaxel).

Un pré-traitement de 2 h avec 30 μM de DHA semble bloquer les effets aigus du docétaxel (1 nM de docétaxel appliqué pendant 15 min). En effet, dans ces conditions, le DHA semble inhiber i) la phosphorylation de ERK1/2 induite par le docétaxel (**figure 43A**), ii) le recrutement membranaire des PKC ϵ/δ (**figure 43A**) et iii) l'activité kinase des PKCs induite par un traitement aigu de docétaxel (**figure 43B**).

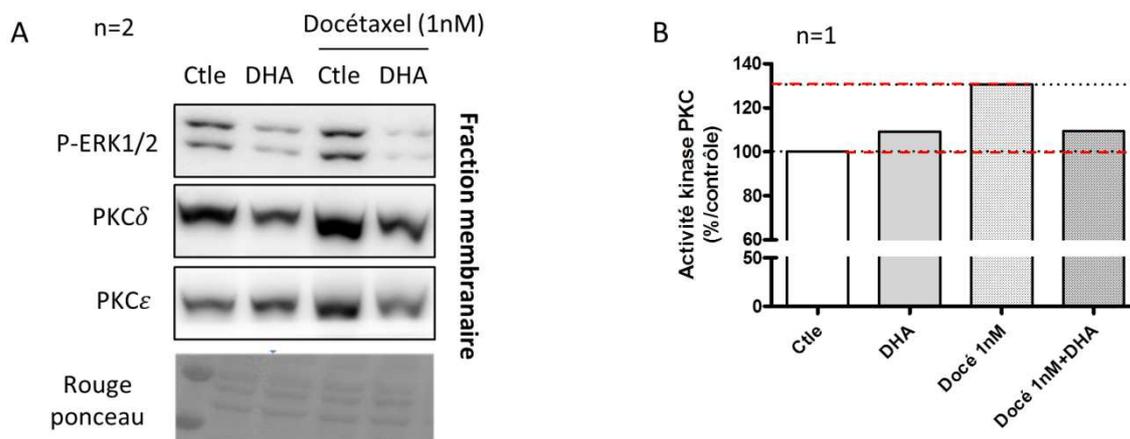


Figure 43. Effet du docétaxel et du DHA sur l'activation de ERK1/2 et des PKCs après un traitement aigu.

Les cellules MDA-MB-231 sont pré-traitées avec 30 μM de DHA pendant 2 h. Le docétaxel (1 nM) est appliqué pendant 15 min. A_ Fractionnement subcellulaire et analyse de la fraction membranaire par western blot (WB représentatif de deux expériences). B_ Activité PKC (n=1).

Modèle de tumeurs mammaires in vivo

Nous avons exploré la signalisation PKC dans le modèle de tumeurs mammaires chimioinduites chez des rats. L'expression génique des PKCs a été évaluée par PCR quantitative et la localisation subcellulaire des PKC ϵ/δ a été analysée par fractionnement subcellulaire et western blot.

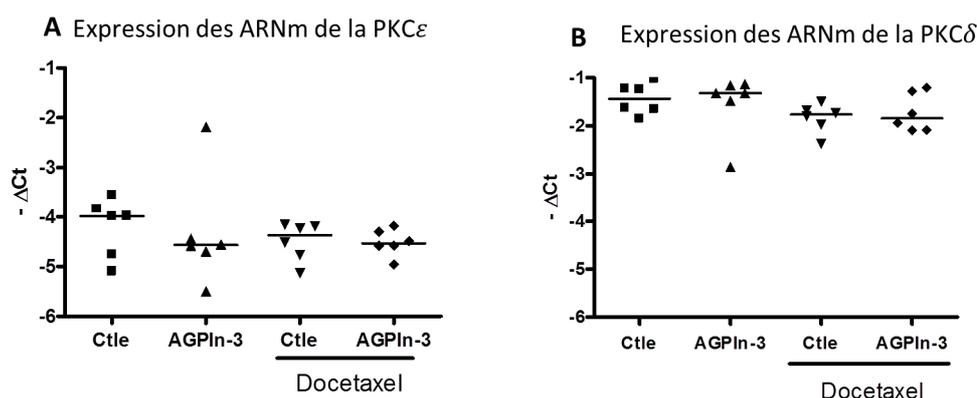


Figure 44. Expression des ARNm des PKC ϵ/δ dans les tumeurs mammaires de l'étude expérimentale chez les rats.

Après extraction des ARN des tumeurs enrichies ou non par des AGPIIn-3LC et traitées ou non par du docétaxel, l'expression des gènes d'intérêt (PKCs) est quantifiée par q-PCR puis normalisée par rapport à la moyenne des Ct des gènes de référence RPL13A et HPRT1 (dont l'expression n'est pas modifiée entre les différents groupes de rats) (n=6/groupes de rats, médiane). Voir la figure 29, p.118 pour la méthodologie de l'expérimentation animale.

Les AGPIIn-3LC ne régulent pas l'expression des ARNm codant pour les PKC ϵ/δ dans les tumeurs mammaires de rats (**figure 44**). En ce qui concerne l'expression protéique, l'expression membranaire des PKC ϵ/δ ne semble pas modifiée dans les différents groupes de rats (**figure 45**). Une tendance est à noter concernant une augmentation de la PKC ϵ membranaire sous docétaxel (p=0.154) et sa régulation par les AGPIIn-3LC (p=0.242). De plus, nous ne notons aucune modification d'expression des PKC ϵ/δ dans les fractions cytosoliques et nucléaires (non montré).

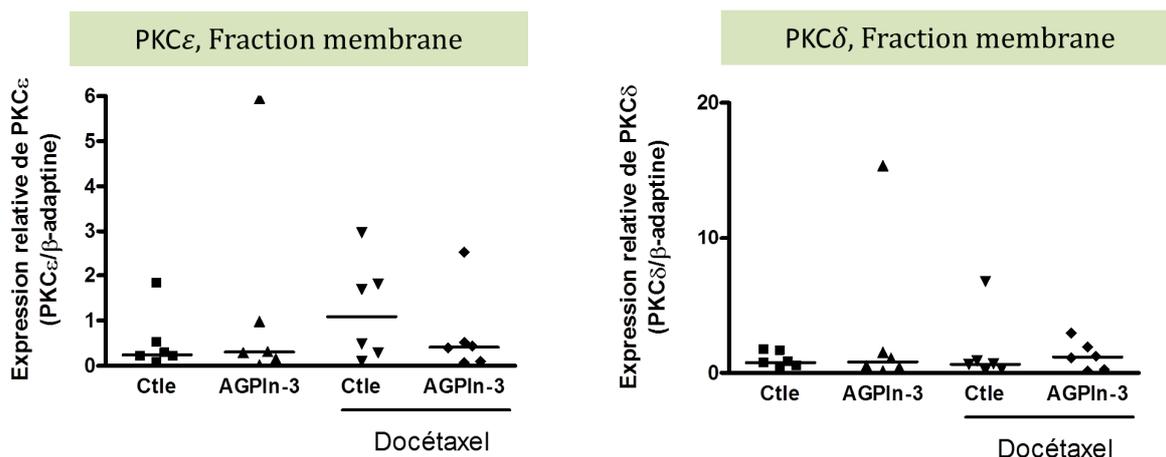


Figure 45. Expression membranaire des PKC ϵ et δ

20 mg de tissu tumoral (n=6/groupes de rats) ont été prélevés à partir de tumeurs mammaires conservées dans l'azote. Un fractionnement subcellulaire a été réalisé avec le kit « subcellular protein fractionation for cultured cells ». La qualité de l'enrichissement des différentes fractions a été validée sur quatre tumeurs choisies de manière aléatoire, en utilisant comme marqueur membranaire l'anticorps anti-EGFR, comme marqueur cytosolique l'anticorps anti-MEK1/2 et l'anticorps anti-LaminA/C comme marqueur nucléaire. L'expression membranaire des PKCs est normalisée par rapport à l'expression de la β -adaptine (médiane, test statistique Mann Whitney). La régulation de P-ERK1/2 a été validée dans ces fractionnements. Voir la figure 29, p.118 pour la méthodologie de l'expérimentation animale.

En amont de ERK1/2, nous avons également étudié l'activité de Ras (en collaboration avec H.Bénédicti, CBM Orléans) et le niveau d'expression de P-MEK1/2 dans les tumeurs mammaires. L'activité de Ras n'est pas modifiée par la chimiothérapie ou par le régime nutritionnel (**figure 46A**). De plus, dans les tumeurs mammaires ayant été exposées au docétaxel, le niveau d'expression de P-MEK1/2 n'est pas régulé par le régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC (**figure 46B**). Ainsi, alors que l'augmentation de P-ERK1/2 par le docétaxel et la régulation par les AGPIIn-3LC sont observées une semaine après la dernière injection de chimiothérapie, l'activité de Ras et l'expression de P-MEK1/2 en amont de ERK1/2 n'apparaissent pas être modifiées.

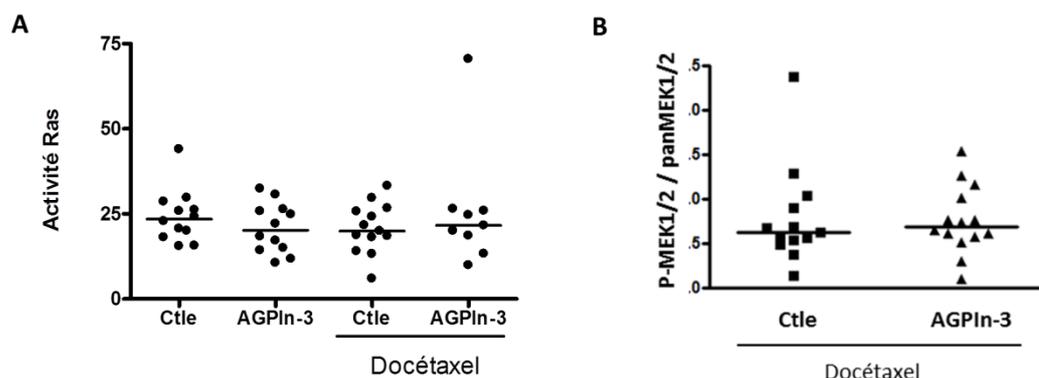


Figure 46. Activité Ras et phosphorylation de MEK dans les tumeurs mammaires in vivo.

A_ Activité Ras évaluée à l'aide du kit Millipore ELISA (ref 17-497) à partir de tumeurs mammaires conservées dans l'azote (n=12/groupe nutritionnel) B_ Niveau de phosphorylation de MEK1/2. L'expression de P-MEK1/2 et MEK1/2 est analysée par western blot à partir de lysats totaux de tumeurs mammaires. Voir la figure 29, p.118 pour la méthodologie de l'expérimentation animale.

B. Expression des phosphatases spécifiques de ERK1/2 (DUSPs/MKPs)

Les DUSPs (ou MKPs pour MAPK phosphatases) sont exprimées de manière physiologique en réponse à l'activation de ERK1/2 et participent à éteindre le signal d'activation en déphosphorylant ERK1/2. Après une chimiothérapie par le docétaxel, la diminution de l'expression de DUSP4/MKP2 dans des xénogreffes de tumeurs mammaires (MDA-MB-231) est associée à une résistance au traitement et à l'activation de la signalisation ERK1/2 (Balko *et al*, 2012). De plus, il a été montré que le DHA augmente l'expression de DUSP1/MKP1 (ARNm et protéine) dans un modèle cellulaire de cancer du poumon (Serini *et al*, 2008).

Dans notre modèle cellulaire MDA-MB-231, un traitement chronique de docétaxel induit une activation prolongée de ERK1/2 qui perdure jusqu'à 24 h après le dernier traitement (voir figure 33B). De manière similaire, dans les tumeurs mammaires, le signal ERK1/2 induit par le docétaxel perdure une semaine après la dernière injection. Notre hypothèse était que le signal ERK persistant et son inhibition par le DHA pouvait être dû à une régulation des phosphatases. Nous avons étudié trois isoformes connues pour déphosphoryler ERK1/2 : DUSP1/MKP1, DUSP4/MKP2 et DUSP6/MKP3 (Ducruet *et al*, 2005).

Traitement aigu

Suite à un traitement aigu de docétaxel, nous avons étudié l'expression protéique des DUSPs/MKPs. Il semblerait que le docétaxel induise une augmentation de l'expression de DUSP1/MKP1, DUSP4/MKP2 et DUSP6/MKP3 (**figure 47**). Ce signal physiologique serait associé à l'inactivation progressive de ERK1/2 après un traitement aigu par le docétaxel.

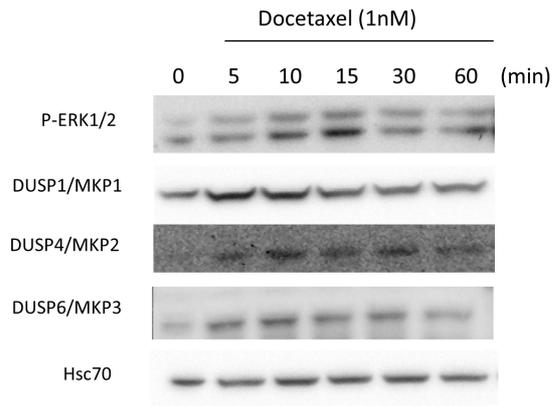


Figure 47. Expression des DUSPs/MKPs en réponse à un traitement aigu de docétaxel.

Les cellules MDA-MB-231 sont sevrées puis traitées avec 1 nM de docétaxel. L'expression des différentes DUSPs est analysée par western blot (WB représentatif, n=2).

Des expériences contrôles ont été réalisées avec une induction EGF (n=2, non montré).

Traitement chronique

La régulation de l'expression des ARNs des DUSPs/MKPs a été étudiée dans le modèle cellulaire MDA-MB-231 après un traitement chronique avec le docétaxel. Nous n'observons pas de modification de l'expression des ARNm des DUSP1/MKP1, DUSP4/MKP2 et DUSP6/MKP3 quelle que soit la condition testée (**figure 48**).

Un traitement chronique de docétaxel ne semble pas induire d'augmentation de l'expression des ARNm des DUSPs/MKPs. Contrairement à l'étude de Serini *et al.* montrant que le DHA augmente l'expression de DUSP1/MKP1 (ARNm et protéine) dans des lignées cancéreuses d'origine pulmonaires, nous n'observons pas d'effet du DHA sur la régulation de ce gène. Il conviendrait de réaliser une cinétique de traitement DHA sur le modèle cellulaire MDA-MB-231.

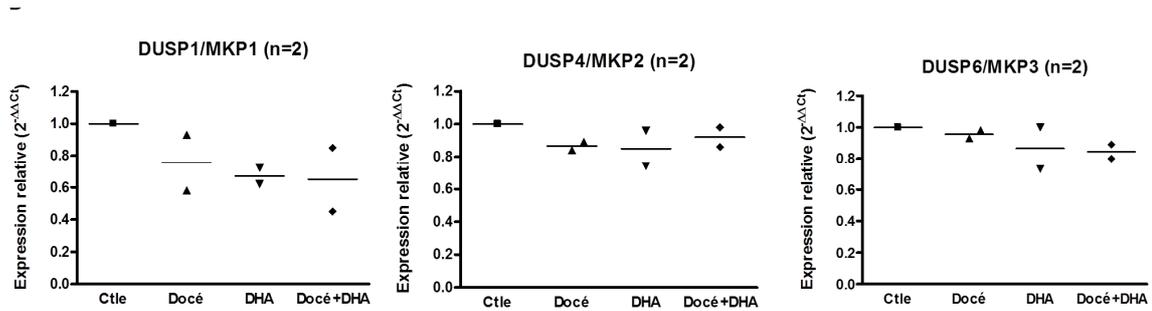


Figure 48. Expression des ARN de DUSP1, DUSP4 et DUSP6 dans le modèle cellulaire MDA-MB-231 après un traitement chronique.

Les cellules MDA-MB-231 sont traitées avec du docétaxel (0.75 nM) +/- DHA (30 μ M) pendant 4 jours et récoltées après une application de 2 h du dernier traitement. L'expression des MKPs est exprimée en valeur relative ($Q=2^{-\Delta\Delta C_t}$, gène de référence *HPRT1*) (n=2, moyenne).

Dans le modèle de tumeurs mammaires *in vivo*, après 6 semaines de chimiothérapie, le régime alimentaire enrichi en AGPI ω -3 ne modifie l'expression des ARNs d'aucune des DUSPs/MKPs étudiées (**figure 49**). L'expression protéique de DUSP1/MKP1 a également été analysée par western blot. Nous n'observons pas de différence d'expression protéique de DUSP1/MKP entre les deux régimes nutritionnels sous chimiothérapie (**figure 49**).

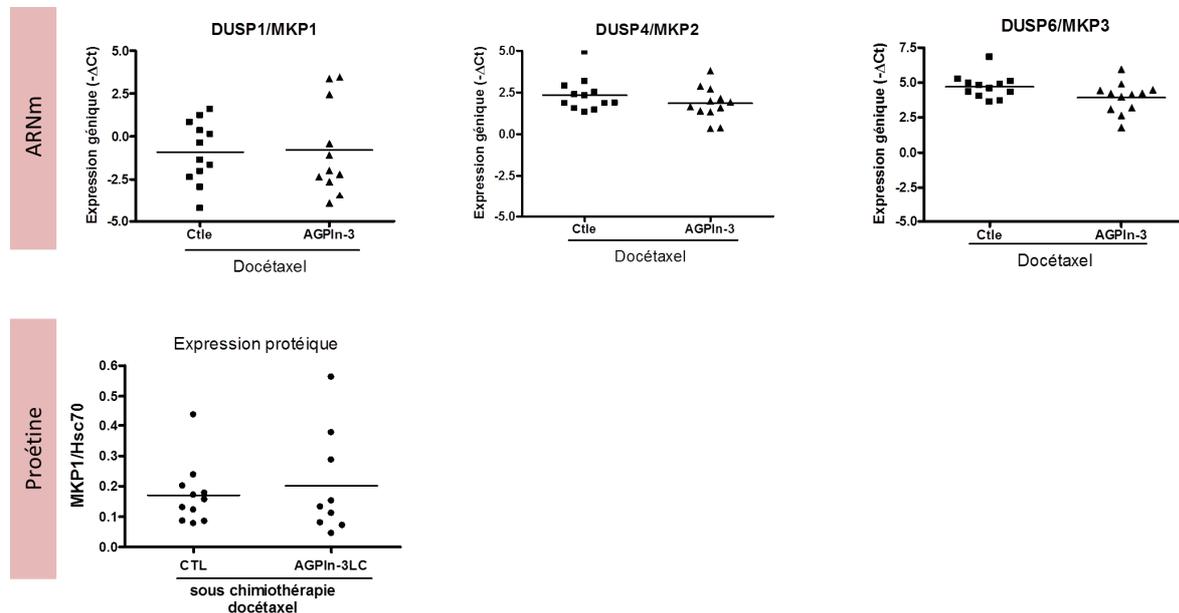


Figure 49. Expression de DUSP1, DUSP4 et DUSP6 dans le modèle de tumeurs mammaires après 6 semaines de chimiothérapie.

L'expression des DUSPs/MKPs a été évaluée par qPCR. Les résultats sont exprimés en $-\Delta C_t$ (gène référence *HPRT1*, n=12/ groupes nutritionnels, moyenne). L'expression protéique de MKP1 a été évaluée par western blot et quantifiée par densitométrie (normalisation avec le niveau d'expression de Hsc70).

Collectivement, ces données suggèrent que la régulation de P-ERK1/2 par les AGPI_n3LC n'impliquerait pas de régulation positive des phosphatases DUSPs/MKPs étudiées.

C. Etude de la signalisation PI3K/Akt

Modèle cellulaire MDA-MB-231

L'hypothèse de travail initiale ciblait la voie MAPK/ERK1/2 dans la chimiosensibilisation au docétaxel. Cependant, au cours de notre étude, nous avons mis en évidence une interconnexion entre la voie MAPK/ERK1/2 et la voie PI3K/Akt. Ainsi, dans notre modèle cellulaire, la chimiosensibilisation nécessiterait l'inhibition concomitante de ces deux voies de signalisation (voir chapitre 2 Résultats).

Un traitement aigu (une application) de docétaxel semble augmenter la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 avec une cinétique différente par rapport à la phosphorylation de ERK1/2. En effet, alors que la phosphorylation de ERK1/2 est induite par le docétaxel dans les premières minutes d'application, le docétaxel semble induire la P-Akt ser473 à partir de 30 minutes d'application (**figure 50A**).

En revanche, la phosphorylation de la ser473 d'Akt induite par le docétaxel après un traitement chronique semble perdurer de la même manière que le signal ERK1/2 (**figure 50B**).

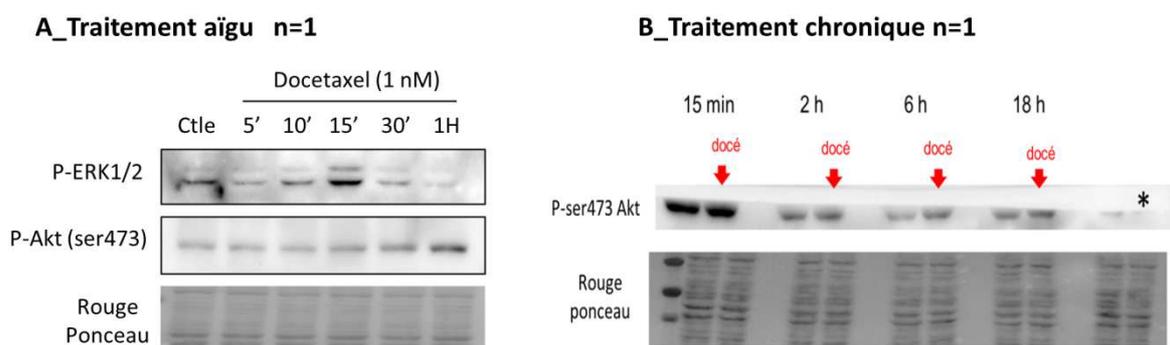


Figure 50. Activation de la phosphorylation d'Akt ser473 par le docétaxel dans les cellules MDA-MB-231. A_Le statut de phosphorylation de la ser473 d'Akt est étudié après un traitement aigu de docétaxel (n=1). B_Statut de phosphorylation de la ser473 d'Akt après un traitement chronique avec du docétaxel (4 applications, 0.75 nM, n=1) (mêmes échantillons que le western blot présenté figure 31_B1) * : membrane découpée.

Deux événements de phosphorylation majeurs sont nécessaires à l'activation maximale d'Akt : la phosphorylation de la sérine 473 via mTORC2 et la phosphorylation de la thréonine 308 via PDK1. Nous montrons que le docétaxel induit P-Akt ser473. Qu'en est-il du statut de phosphorylation de la thr308 ?

Le statut de phosphorylation d'Akt a été exploré après un traitement chronique avec du docétaxel (**figure 51**). Dans ces conditions, le docétaxel n'induit pas la phosphorylation de la thr308 d'Akt.

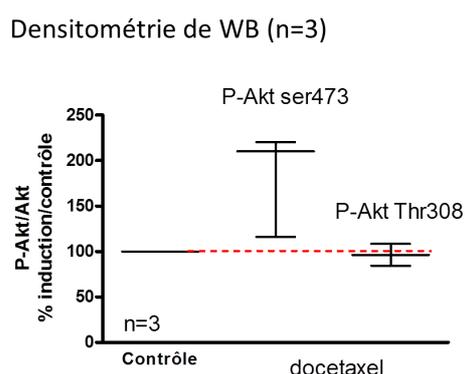


Figure 51. Statut de phosphorylation d'Akt après un traitement chronique avec du docétaxel dans les cellules MDA-MB-231.

Après 4 jours de traitement avec 0.75 nM de docétaxel, les cellules MDA-MB-231 sont récoltées 2 h après le dernier traitement et le statut de phosphorylation d'Akt (ser473 et thr308) est analysé par western blot sur lysat total (densitométrie, n=3).

Modèle de tumeurs mammaires *in vivo*

Le niveau de phosphorylation d'Akt (ser473 et thr308) a été étudié dans le modèle de tumeurs mammaires *in vivo*.

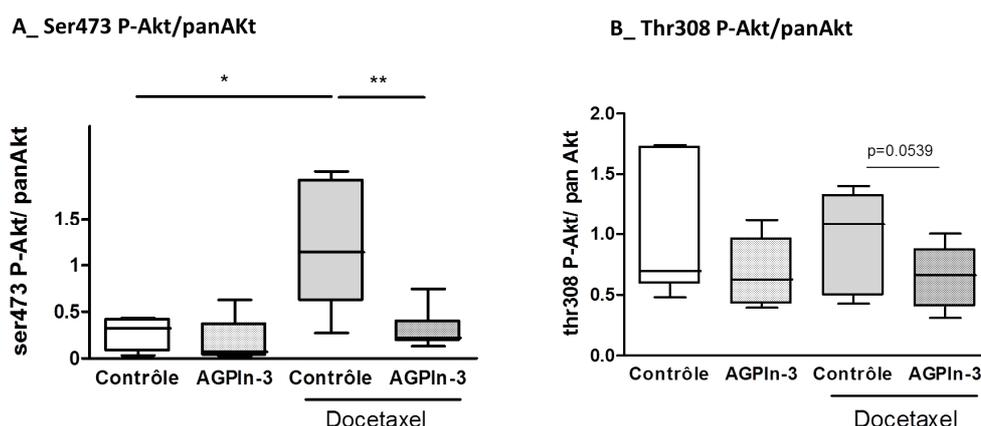


Figure 52. Statut de phosphorylation d'Akt dans le modèle de tumeurs mammaires de l'expérimentation animale chez le rat.

20 mg de tissu tumoral ont été prélevés à partir de tumeurs mammaires conservées dans l'azote (n=6/groupe nutritionnel sans chimiothérapie et n=8/groupe nutritionnel). Le lysat total a été analysé par western blot. Le niveau de phosphorylation d'Akt est normalisé par l'expression d'Akt total (Mann-Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Voir la figure 29, p.118 pour la méthodologie de l'expérimentation animale.

Le docétaxel, après 6 injections, induit la phosphorylation d'Akt ser473 et ne modifie pas le niveau d'expression d'Akt phosphorylée sur le résidu thr308. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus dans le modèle cellulaire de MDA-MB-231 (figure 50). L'induction de P-Akt ser473 est fortement inhibée dans les tumeurs de rats ayant suivi un régime alimentaire enrichi en AGPIn-3LC (figure 52A). Le niveau d'expression de P-Akt thr308 tend à être inhibé dans les tumeurs mammaires de rats ayant suivi un régime alimentaire enrichi en AGPIn-3LC sous docétaxel ($p=0.053$) (figure 52B).

3. Inhibiteurs pharmacologiques

A. Inhibiteurs pharmacologiques des PKCs

Nous avons montré que l'enzastaurine (inhibiteur pharmacologique de l'activité kinase des PKCs) augmente la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au docétaxel (voir chapitre 2, Résultats). Nous avons testé l'effet sensibilisant d'un second inhibiteur de l'activité kinase des PKCs, le GF-109203X, sur les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468. Dans la lignée MDA-MB-231, cet inhibiteur augmente l'efficacité du docétaxel de 21% à 0.35 nM ($*p<0.05$), de 28% à 0.5 nM ($**p<0.01$) et de 26% à 0.75 nM ($**p<0.01$) (figure 53A). Un nombre d'expériences inférieur a été réalisé dans la lignée cellulaire MDA-MB-468 mais le GF-109203X tend également à augmenter l'efficacité du docétaxel aux doses testées (-21%, à 0.25nM, $p=0.625$ et -18% à 0.35 nM) (figure 53B).

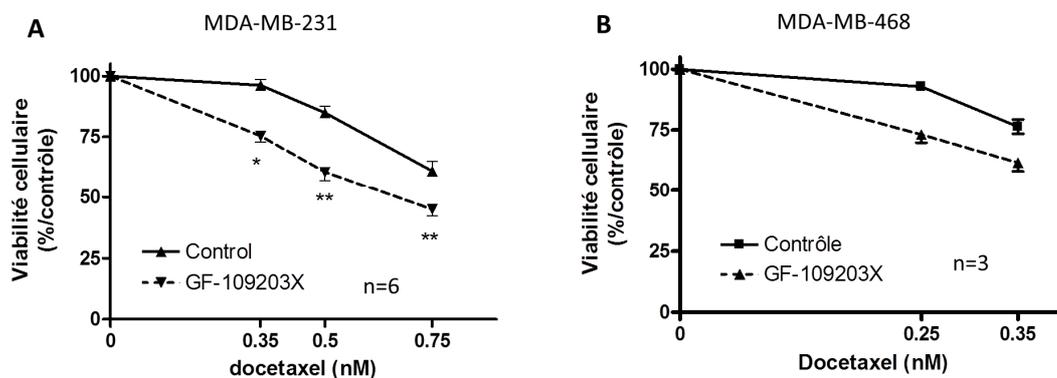


Figure 53. Chimiosensibilisation des cellules tumorales MDA-MB231 et MDA-MB-468 par un inhibiteur de PKC, le GF-109203X.

Test de chimiosensibilisation sur 7 jours en présence de GF-109203X (1 μ M). A_MDA-MB-231 (n=6, moyenne +/- SEM). B_MDA-MB-468 (n=3, moyenne +/- SEM). Test apparié Wilcoxon, $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$.

B. Inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 et d'Akt

Inhibiteur pharmacologique de MEK (PD98059)

Le PD98059 est un inhibiteur de l'activité catalytique de MEK1/2. Son effet a été étudié après un traitement aigu (une application) et après un traitement chronique (4 applications). Après une application de docétaxel, le PD98059 bloque P-ERK1/2 induit par une application aiguë de docétaxel (**figure 54A**). En revanche, le PD98059 ne bloque pas P-ERK1/2 après un traitement chronique (**figure 54B**). Dans les deux conditions de traitements (aiguë et chronique), il semblerait le PD98059 induise la phosphorylation de la ser473 d'Akt (**figure 54A/B**). Ces données suggèrent que la voie MEK/ERK1/2 exerce un contrôle négatif sur la voie Akt : l'inhibition de la voie ERK1/2 lève le contrôle négatif ce qui induit la phosphorylation d'Akt (phénomène de « cross-inhibition » décrit par Mendoza *et al*, 2011).

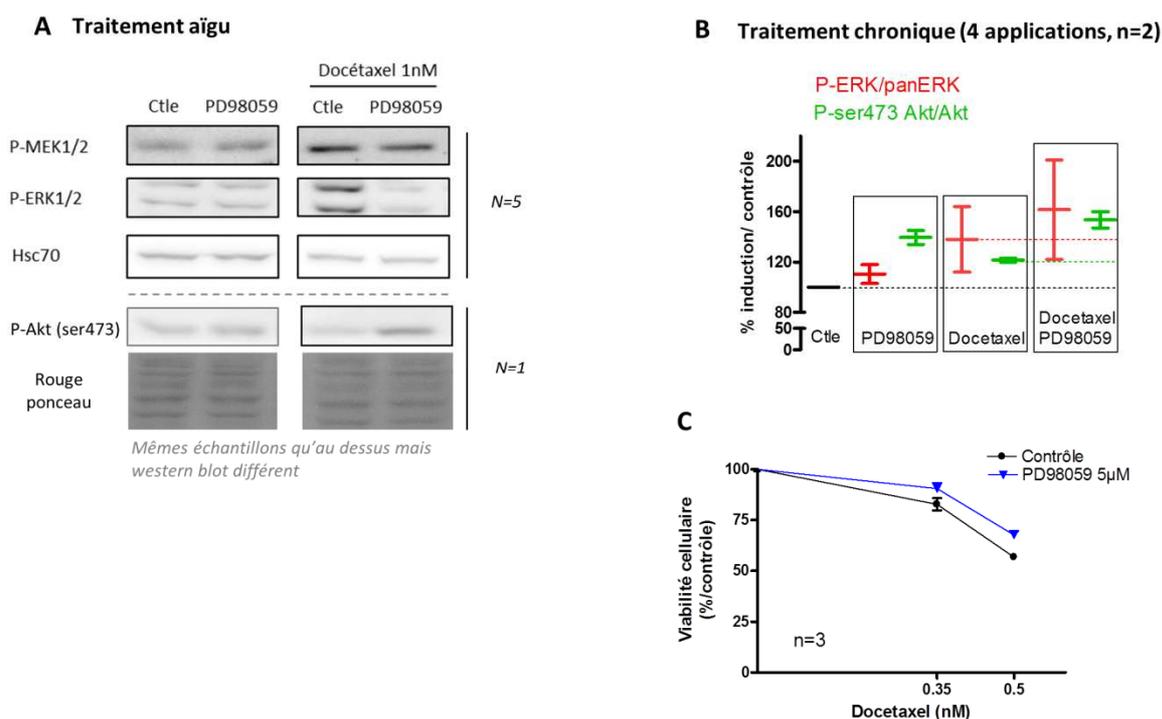


Figure 54. Effet du PD98059, inhibiteur de MEK, sur l'activation de ERK1/2 et d'Akt dans les cellules MDA-MB-231.

A_ Les cellules MDA-MB-231 sont pré-traités 1H avec le PD98059 (5µM), puis le docétaxel est ajouté pendant 15min à 1 nM (n=5 pour l'expression de MEK et de ERK1/2, n=1 pour l'expression d'Akt-P ser473, les deux western blot sont séparés par un trait pointillé). B_ Les cellules MDA-MB-231 sont co-traitées pendant 4 jours avec du docétaxel (0.75nM) +/- PD98059 (5µM). 2 h après le dernier traitement, les cellules sont récoltées. Quantification de P-ERK1/2 et de P-Akt (ser473) par densitométrie, normalisation par rapport à ERK1/2 et Akt respectivement (n=2, moyenne +/- //SD). C_ Test de chimiosensibilisation sur 7 jours (n=3, moyenne +/- SEM).

Par ailleurs, le PD98059 n'augmente pas l'efficacité du docétaxel sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 (**figure 54C**). De la même façon, un autre inhibiteur pharmacologique de MEK1/2 (UO126) n'augmente l'efficacité du docétaxel sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 (n=3, non montré).

L'absence de chimiosensibilisation au docétaxel en présence d'un inhibiteur de MEK (PD98059) pourrait être expliquée par l'augmentation de la P-ser473 d'Akt et/ou par l'absence d'inhibition de P-ERK1/2 lors d'un traitement chronique.

Inhibiteur pharmacologique d'Akt

Le MK2206 inhibe sélectivement l'activité kinase d'Akt1, 2 et 3. Dans la lignée cellulaire MDA-MB-231, l'inhibition d'Akt a été étudiée en présence de docétaxel. Le MK-2206, inhibiteur d'Akt, éteint l'expression de P-Akt ser473 en absence et en présence de docétaxel sans affecter le niveau de phosphorylation de ERK1/2 (**figure 55**). Nous n'avons pas de données d'efficacité du docétaxel en présence de cet inhibiteur.

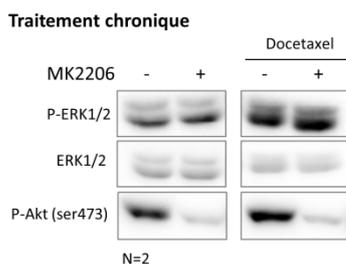


Figure 55. Effet de l'inhibiteur d'Akt MK2206 sur la phosphorylation de ERK1/2 et d'Akt.

Les cellules MDA-MB-231 sont co-traitées pendant 4 jours en présence de docétaxel (0.75nM) +/- MK2206 (0.5µM). 2h après le dernier traitement, les cellules sont récoltées puis le lysat total est analysé par western blot (n=2).

La sensibilité au docétaxel des cellules MDA-MB-231 a été évaluée en présence de l'inhibiteur VIII d'Akt, ciblant les isoformes 1 et 2 d'Akt. L'inhibiteur d'Akt VIII n'augmente pas la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 au docétaxel. L'efficacité de cet inhibiteur n'a pas été testée par western blot dans des conditions de traitement chronique.

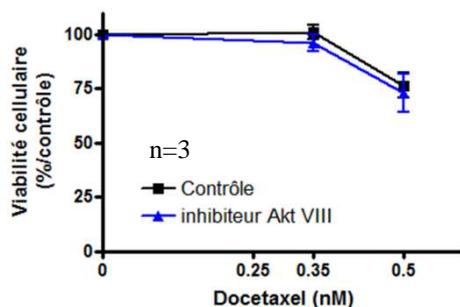


Figure 56. Effet de l'inhibiteur VIII d'Akt sur la sensibilisation des cellules MDA-MB-231 au docétaxel.

Test de chimiosensibilisation sur 7 jours, 4 co-traitements, inhibiteur d'Akt VIII utilisé à 1µM. n=3

De la même manière, la sensibilité des cellules MDA-MB-231 a été évaluée en

présence d'inhibiteur de MEK (PD98059) et d'inhibiteur VIII d'Akt. Le co-traitement des cellules avec le PD98059 et l'inhibiteur VIII d'Akt pendant 4 jours n'augmentent pas l'efficacité du docétaxel (**figure 57**).

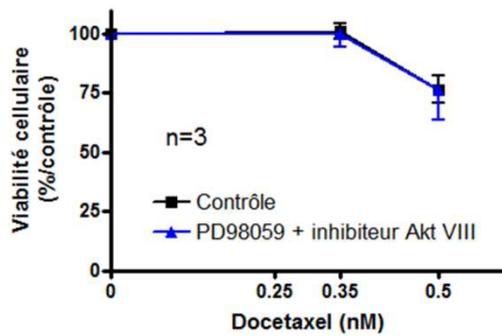


Figure 57. Effet de la combinaison PD98059 et inhibiteur VIII d'Akt sur la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au docétaxel.

Test de chimiosensibilisation sur 7 jours, 4 co-traitements, inhibiteur d'Akt VIII utilisé à 1 μ M et PD98059 à 5 μ M

Chapitre 4. Discussion et perspectives

Après six cycles de traitement par le docétaxel, un régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC augmente la régression tumorale d'environ 40% dans un modèle de tumeurs mammaires autochtones chez le rat. L'analyse du cycle cellulaire réalisée sur les tumeurs, une semaine après la dernière injection de docétaxel, montre que le docétaxel diminue le nombre de cellules en phase S et que cette réduction est accentuée par le régime AGPIIn-3LC. L'hypothèse associant l'effet sensibilisant des AGPIIn-3LC à une inhibition de la prolifération est appuyée par des données préliminaires dans le modèle cellulaire MDA-MB-231 montrant que le DHA tend à diminuer la prolifération des cellules au cours d'un traitement par le docétaxel alors que le DHA ne semble pas augmenter l'apoptose induite par le docétaxel (figure 41).

Nous avons montré que l'inhibition concomitante des signalisations ERK1/2 et Akt par les AGPIIn-3LC est nécessaire pour augmenter l'efficacité du docétaxel. Le mécanisme d'activation de la voie ERK1/2 induite par le docétaxel a été exploré dans un modèle de lignée cancéreuse mammaire *in vitro*. Collectivement, nos données montrent que l'activation précoce de ERK1/2 par le docétaxel est dépendante d'une signalisation PA/DAG/PKC ϵ - δ .

Le docétaxel induit une production de PA

Le docétaxel induit une production d'acide phosphatidique (PA) transitoire et cette synthèse s'effectue au détriment de la PC. La phosphorylation de ERK1/2 par le docétaxel dépend d'un équilibre entre les seconds messagers lipidiques DAG et PA, car l'inhibition pharmacologique de la DAG kinase et de la PA phosphatase bloque l'activation de ERK1/2. Ainsi, l'équilibre entre PA et DAG permettrait d'induire le recrutement des PKCs, leurs activités et la phosphorylation de ERK1/2 (**figure 58**). Nous pouvons envisager d'étudier l'effet de l'inhibition de la DAG kinase et de la PA phosphatase sur le recrutement membranaire des PKC ϵ / δ et sur l'activité enzymatique PKC afin de compléter l'étude.

Nous avons identifié les PKC ϵ / δ comme PKCs activées par le docétaxel, qui induit leur recrutement membranaire. De plus, leur inhibition par ARN interférents bloquent P-ERK1/2 induit par le docétaxel. Nous ne pouvons pas exclure pour l'instant que d'autres PKCs soient recrutées et activées par le docétaxel. Leur identification pourrait passer par

l'utilisation d'ARN interférents avec mesure de l'activité enzymatique des PKCs sous docétaxel.

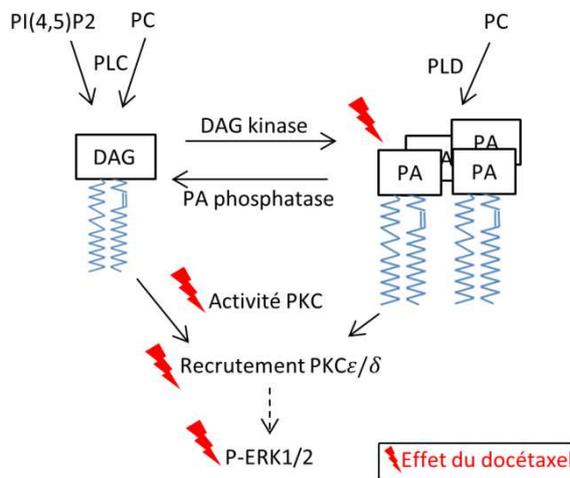


Figure 58. Effet du docétaxel sur la signalisation PA/DAG/PKC/ERK1/2.

Le PA peut être produit directement à partir de l'hydrolyse la PC par l'action de phospholipase D (PLD) ou indirectement par l'hydrolyse de la PI ou de la PC par les phospholipases C (PI-PLC et PC-PLC).

La voie métabolique conduisant à la production de PA par le docétaxel reste à éclaircir. Plusieurs enzymes, PLCs ou PLDs, peuvent être activées pour hydrolyser les PCs. Des arguments suggèrent que la PLD et la PA phosphatase sont responsables de la production du PA puis du DAG (figure 58). Premièrement, des expériences préliminaires montrent que le docétaxel n'induit pas de variation de calcium intracellulaire dans les cellules MDA-MB-231 (docétaxel 1nM et 10 nM, n=2, non montré). La production de PA ne s'effectuerait donc pas par la PI-PLC car la métabolisation du PI devrait induire la synthèse concomitante d'IP₃, conduisant à un relargage de calcium du réticulum. Ces résultats sont confortés par la quantification des phospholipides qui montrent une consommation de PC. Cependant, il existe aussi une PLC (PC-PLC) qui peut hydrolyser la PC pour obtenir du DAG et une phosphocholine. L'inhibiteur qui peut être proposé pour de futures expériences est le D609, inhibiteur de PC-PLC. Cependant, dans des cellules leucémiques, il a été montré que le docétaxel induit une production de PA suivie d'une production de DAG. Cette dernière est bloquée par un inhibiteur de PA phosphatase (propranolol) alors que l'inhibiteur de PC-PLC (D609) n'a pas d'effet (Maestre *et al*, 2003). Collectivement, ces résultats suggèrent que l'activation de PLD et non de PLC serait responsable de la production de PA.

La littérature est en faveur de cette voie métabolique. La production de PA par le docétaxel serait dépendante de l'activité PLD. En effet, il a été montré que le docétaxel induit une activité PLD (Cho *et al*, 2008a). Le mécanisme de cette activation serait lié aux

microtubules. En effet, leur perturbation module l'activité PLD (Dhonukshe *et al*, 2003; Chae *et al*, 2005). L'interaction entre la PLD2 et la tubuline libre est associée à une diminution de l'activité PLD. Le paclitaxel, en favorisant la polymérisation des microtubules, diminue la quantité de tubuline libre et augmente l'activité PLD (Chae *et al*, 2005). Ainsi, le principe même du docétaxel figeant les microtubules polymérisés induirait une production de PA. L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de PLD (e.g. BML-279, inhibiteur de PLD1 et de PLD2) pourrait permettre de le confirmer, en quantifiant le PA et/ou en évaluant le niveau de phosphorylation de ERK1/2 sous docétaxel.

Mécanisme d'inhibition de la voie PA/DAG/PKC par le DHA

Nos données montrent que le DHA bloque l'augmentation transitoire de PA, le recrutement des PKCε/δ, l'activité PKC et, *in fine*, la phosphorylation de ERK1/2 (**figure 59**).

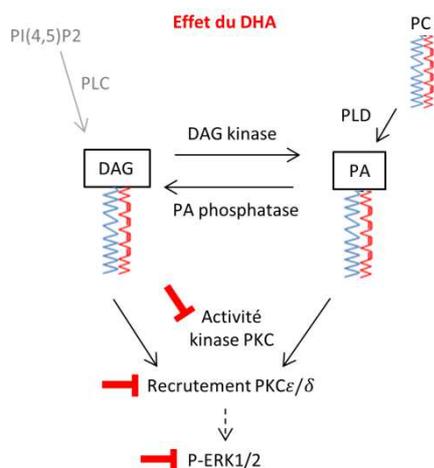


Figure 59. Effet du DHA sur la signalisation PA/DAG/PKC/ERK1/2

La première hypothèse pour expliquer ces résultats est que le DHA inhibe l'activité PLD, ce qui bloquerait la production transitoire de PA induite par le docétaxel. Il a été rapporté que l'inhibition des PLDs provoque une augmentation basale de PA par un mécanisme de compensation impliquant les DAG kinases (Antonescu *et al*, 2010; Bechoua *et al*, 1998). Dans notre modèle cellulaire, nous observons que le DHA augmente la quantité basale de PA (figure 35C). Nos données sont donc compatibles avec un effet inhibiteur du DHA sur l'activité PLD. Malgré cette hausse de PA, l'activité PKC n'est pas induite sous DHA. Cette absence d'induction pourrait être associée à un pool de PA métabolique, sans fonction de signalisation. En effet, la signalisation est déclenchée par une variation

quantitative transitoire de seconds messagers lipidiques et non par une augmentation globale et constante.

L'inhibition de la PLD par le DHA pourrait s'expliquer par la modification de la localisation membranaire de l'enzyme. Il a été montré que le DHA exclut la PLD1 des radeaux lipidiques (Diaz *et al*, 2002). Ainsi, en s'intégrant dans les phospholipides membranaires et en désorganisant les nanodomains membranaires, le DHA pourrait perturber la localisation et l'activité des PLDs. Il serait intéressant d'évaluer l'activité PLD dans notre modèle cellulaire pour confirmer l'effet du docétaxel et l'effet du DHA.

Une deuxième hypothèse est liée à la composition qualitative des phospholipides membranaires, qui pourrait également expliquer l'effet du DHA sur le recrutement des PKCs. Il est connu que la composition en acide gras du DAG modifie l'activation de la signalisation en aval (Madani *et al*, 2001, 2004). En effet, une molécule de DAG esterifiée en sn-2 avec du DHA induit une activité moindre de la PKC ϵ et de la PKC δ par rapport à une molécule de DAG contenant de l'acide arachidonique en sn-2 (Madani *et al*, 2001). Cette hypothèse est en accord avec nos données puisque le DHA est incorporé dans les phospholipides précurseurs des seconds messagers lipidiques. Par conséquent, le PA et/ou le DAG produits en réponse au docétaxel seraient enrichis en DHA, ce qui bloquerait le recrutement des PKCs.

Signalisation PI3K/Akt induite par le docétaxel et régulée par le DHA

Nous avons montré que le docétaxel induit la signalisation MAPK/ERK1/2 ainsi que la phosphorylation de la ser473 d'Akt. De manière étonnante, le docétaxel ne semble pas affecter le niveau de phosphorylation de la thr308 d'Akt. Actuellement, la littérature présente le complexe mTORC2 comme responsable de la phosphorylation de la ser473 d'Akt, mais certaines PKCs ont aussi été impliquées dans cette phosphorylation.

Des données expérimentales associées aux données de la littérature permettent d'émettre plusieurs hypothèses quant aux mécanismes de phosphorylation de la ser473 d'Akt par le docétaxel et de sa régulation par le DHA :

- i) Mécanisme lié à la production de PA : le PA serait requis pour l'assemblage du complexe mTORC2 et l'inhibition de PLD bloque la phosphorylation de la ser473

d'Akt (Toschi *et al*, 2009). Le DHA en inhibant la PLD et/ou en modifiant la composition du PA pourrait réguler négativement cet événement.

- ii) Mécanisme lié aux PKCs : certaines isoformes de PKCs ont été impliquées dans la phosphorylation de la ser473 d'Akt comme la PKC ϵ (via DNA-PK, Lu *et al*, 2006), la PKC α (Partovian & Simons, 2004) et la PKC η (Aeder *et al*, 2004). Nous avons montré que l'enzastaurine, inhibiteur de l'activité catalytique des PKCs bloque P-Akt ser473 induit par le docétaxel. Cependant, cet inhibiteur pourrait exercer une inhibition directe d'Akt, indépendante des PKCs (Graff *et al*, 2005). Il serait intéressant d'identifier toutes les isoformes de PKCs activées par le docétaxel en réalisant un criblage par ARN interférence et une mesure de l'activité PKC sous docétaxel. Dans ce contexte, le DHA pourrait inhiber la P-ser473 d'Akt en perturbant le recrutement des PKCs, comme décrit précédemment.
- iii) Des mécanismes de « cross-inhibition » entre les voies de signalisation ERK1/2 et Akt ont été décrits (Mendoza *et al*, 2011). Classiquement, ce mécanisme est révélé par l'inhibition chimique d'une voie de signalisation : le blocage d'une voie induit l'activation de l'autre (Hoeflich *et al*, 2009; Mendoza *et al*, 2011). Dans notre étude, l'inhibition de la voie ERK1/2 par un inhibiteur mène à l'augmentation du niveau de phosphorylation de la ser473 d'Akt. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la signalisation ERK1/2 exerce un rétrocontrôle négatif sur Akt. L'inhibition de ERK1/2, physiologique ou chimique, lèverait ce rétrocontrôle et conduirait à l'activation d'Akt. Notons que cette hypothèse ne semble valide que dans un contexte de traitement aigu.

Plusieurs études montrent que les AGPIIn-3LC régulent la signalisation PI3K/Akt. Cependant, les mécanismes moléculaires de cette régulation restent très élusifs. Une étude montre que les AGPIIn-3LC inhibent l'activité kinase de PI3K et d'Akt et associe cet effet à l'augmentation de l'expression de la quantité d'ARNm de PTEN (Ghosh-Choudhury *et al*, 2009). Gu *et al*. associent la régulation d'Akt-P thr308 à la relocalisation cytoplasmique du PIP3 et à l'inhibition du recrutement membranaire de PDK1 induite par le DHA (Gu *et al*, 2013). Enfin, deux études montrent que le DHA inhibe P-Akt ser473 (Schley *et al*, 2005; Sato *et al*, 2013) et suggèrent une régulation liée à l'incorporation du DHA dans les phospholipides, qui affecterait l'interaction entre Akt et la ser473 kinase.

Afin d'éclaircir le mécanisme de phosphorylation de la ser473 d'Akt par le docétaxel et d'identifier le mécanisme de régulation du DHA, il conviendrait d'identifier la kinase

responsable de cette phosphorylation dans notre modèle cellulaire. L'implication de mTORC2 et/ou de PKCs dans ce mécanisme pourrait être examinée par ARN interférence.

Dynamique et localisation du signal

Actuellement, nos données n'ont pas permis de localiser de manière précise, au niveau cellulaire les acteurs moléculaires mis en jeu (PKC, PLD, ERK, Akt). Un aspect très important de la signalisation lipidique et protéique est la localisation subcellulaire des signaux et leur dynamique. Des expériences d'immunocytofluorescence (marquage PKC) ont été réalisées sans succès. Les anticorps utilisés ne se sont pas avérés suffisamment spécifiques et/ou les techniques de fixation et de perméabilisation pas adéquates. Dans le contexte de la signalisation, l'utilisation de techniques permettant d'analyser la signalisation en temps réel sur des cellules vivantes serait plus pertinente. Ces techniques basées sur l'imagerie FRET permettent de suivre l'activation ou l'activité des kinases ERK1/2, Akt et PKC (Oldach & Zhang, 2014). Le laboratoire d'Alexandra Newton, spécialisé dans l'étude de la signalisation PKC, a également développé des sondes permettant de suivre la production de DAG au niveau des différentes membranes biologiques (plasmique, Golgi, noyau) (Gallegos & Newton, 2008; Gallegos *et al*, 2006). De tels outils demandent un effort de développement mais les avantages résultant de leur utilisation en termes de compréhension de la signalisation sont considérables.

Par rapport à nos données issues de fractionnement subcellulaire, si le terme « membrane » est associé de manière instinctive à la membrane plasmique, le fractionnement membranaire englobe les protéines associées à la membrane plasmique mais aussi aux endomembranes (réticulum endoplasmique, golgi et mitochondrie). Il serait intéressant d'étudier la localisation précise des PKCs activées par le docétaxel. En effet, il a été montré que l'activité des PKCs suit la cinétique de production du DAG : rapide et transitoire à la membrane plasmique, plus tardive et persistante à la membrane golgienne (Gallegos *et al*, 2006; Sato *et al*, 2006). De plus, il serait intéressant d'étudier la localisation des PKCs au niveau du cytosquelette. En effet, il a été suggéré que l'activation de ERK1/2 par le docétaxel pourrait être associée à la redistribution subcellulaire de la PKC ϵ induite par la stabilisation des microtubules (Mhaidat *et al*, 2007a).

Chimiosensibilisation au docétaxel

La sensibilité de la lignée cellulaire MDA-MB-231 au docétaxel est augmentée par le DHA et par l'enzastaurine. En présence de docétaxel, le DHA comme l'enzastaurine inhibent P-ERK1/2 et P-Akt ser473.

Nous n'avons pas observé d'effet sensibilisant au docétaxel en combinant un inhibiteur de MEK (PD98059) et un inhibiteur d'Akt (inhibiteur VIII sélectif d'Akt1 et d'Akt2). Afin de pallier le manque d'efficacité de l'inhibiteur de MEK, il conviendrait d'utiliser un inhibiteur de l'activité kinase de ERK1/2, récemment découvert (Morris *et al*, 2013). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur ciblant les trois isoformes d'Akt (e.g. MK-2206) serait plus judicieux, car Akt3 pourrait jouer un rôle important dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 (Iacovides *et al*, 2013; Rebecca Chin *et al*, 2015).

Les études rapportant une augmentation de l'efficacité du docétaxel (et/ou du paclitaxel) par le ciblage pharmacologique de MEK1/2 sont dans un contexte apoptotique (traitement aigu de 24/48 h avec de fortes doses de taxane, de 10 nM à 1 μ M) (Seidman *et al*, 2001; MacKeigan *et al*, 2000; Yu *et al*, 2001; MacKeigan *et al*, 2002).

Dans nos conditions, nous avons montré que l'apoptose n'est pas impliquée dans le mécanisme de sensibilisation (figure 41, Activité caspase). En effet, nous utilisons de faibles doses de docétaxel et un traitement long. Cependant, ce protocole semble pertinent par rapport à la clinique puisqu'une étude pharmacocinétique montre que 8 jours après une injection de docétaxel (35mg/m²), la concentration plasmatique de l'agent est de 1.8 nM (médiane) (Baker *et al*, 2004).

Microtubules et signalisation

Une des difficultés majeures pour étudier le mécanisme de chimiosensibilisation au docétaxel par le DHA a été la différence entre la régulation de la signalisation après un traitement aigu et un traitement chronique, illustrée par la cinétique de phosphorylation et de déphosphorylation de ERK1/2 (transitoire *versus* persistant).

La régulation de ERK1/2 induite par un traitement aigu de docétaxel semble « physiologique » avec la présence d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif, probablement via les phosphatases DUSPs/MKPs. Dans ce contexte, nous avons montré que le DHA inhibe les événements qui mènent à l'activation de ERK1/2.

Suite à un traitement chronique avec du docétaxel, l'activation des voies de signalisation semble persister dans le temps, ce qui suggère un défaut de rétrocontrôle négatif et/ou une signalisation figée, non dynamique. Nous ne pouvons pas exclure des mécanismes associés à la perturbation de la dynamique des microtubules. Il est même tentant de rapprocher l'activation persistante des signaux intracellulaires à la dynamique des microtubules qui doit être figée après plusieurs jours de traitement avec de faibles doses de docétaxel. De manière intéressante, il existe des liens entre les microtubules et les différentes signalisations étudiées (PLD, PKC/ERK et Akt).

Ainsi, comme décrit précédemment, la stabilisation des microtubules augmente l'activité PLD (Chae *et al*, 2005). La stabilisation des microtubules pourrait aussi participer à la relocalisation des PKCs (Schmalz *et al*, 1996; Mhaidat *et al*, 2007a) et à l'activation subséquente de ERK1/2 (Mhaidat *et al*, 2007a). Enfin, il a été montré que l'interaction d'Akt-P ser473 avec les microtubules protège Akt de la déphosphorylation et mène à l'activation prolongée d'Akt (Jo *et al*, 2014). Ainsi, la stabilisation des microtubules induite par un agent tubulo-affin pourrait altérer la signalisation intracellulaire en modifiant la disponibilité des protéines de signalisation (exemples de la PLD et de la PKC ϵ) et/ou en séquestrant des protéines dans un état actif (exemple d'Akt).

Nous avons montré que le DHA régule négativement les signaux persistants induits par le docétaxel. Nos analyses préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation des phosphatases spécifiques de ERK1/2 (DUSPs/MKPs). Cependant, il conviendrait de réaliser des expériences de cinétique de traitement DHA en examinant le niveau d'expression des ARN et des protéines DUSPs/MKPs. De plus, le DHA pourrait aussi réguler des phosphatases non spécifiques impliquées dans l'inactivation de ERK (e.g. PP1, PP2A) et/ou d'Akt-Pser473 (PHLPP). L'étude des phosphatases pourrait s'avérer intéressante car il a été montré que le PA diminue l'activité de PP1 et PP2A (Jones, 2002; Jones *et al*, 2005a; Gao *et al*, 2013).

Si les effets d'une modification de la composition en acides gras des PLs membranaires sur la signalisation intracellulaires sont bien documentés, à ma connaissance, il n'existe pas de données sur l'effet de la composition en acide gras des phospholipides membranaires sur la régulation de la dynamique du cytosquelette et cela ouvrirait une perspective intéressante. Le DHA limite-t-il la séquestration des protéines ERK ou Akt sur les microtubules ce qui pourrait permettre leur déphosphorylation plus active ? Au vue de la

connexion entre cytosquelette et membrane, il est envisageable d'émettre une hypothèse quant à la régulation de la dynamique des microtubules par une supplémentation en DHA.

Nos données étayent l'hypothèse que les effets du DHA sur la signalisation intracellulaire sont liés à son incorporation dans les phospholipides membranaires des cellules cancéreuses MDA-MB-231. Cette hypothèse implique un blocage de la signalisation dès son origine, à la membrane plasmique. Il est établi que plusieurs jours d'exposition au DHA mène à son incorporation dans les phospholipides membranaires dans différentes lignées de cellules cancéreuses humaines (Mahéo *et al*, 2005; Gu *et al*, 2013). Cependant, une exposition cellulaire courte (3 h) avec du DHA suffit à le retrouver sous forme estérifié dans les phospholipides membranaires (Richardson & Wurtman, 2007).

Les effets de l'incorporation du DHA dans les PLs membranaires peuvent avoir d'autres conséquences biologiques que celles décrites dans cette étude. En effet, en l'état actuel, ces travaux de thèse ne permettent pas d'exclure l'implication d'une régulation génique via les PPARs et/ou la modification du métabolisme des AGPI dans le mécanisme de sensibilisation des cellules tumorales mammaires au docétaxel par le DHA.

L'épiréguline, membre de la famille EGF, une nouvelle cible moléculaire des AGPIIn-3LC

Chapitre 1. Contexte et démarche scientifique

Une supplémentation nutritionnelle en AGPIIn-3LC améliore la réponse tumorale aux agents anticancéreux (Biondo *et al*, 2008; Calviello *et al*, 2009; Bougnoux *et al*, 2010b; Kornfeld *et al*, 2012). Il a été rapporté un effet antiangiogénique des AGPIIn-3LCLC ou de leurs dérivés métaboliques (Colas *et al*, 2006; Rose & Connolly, 1999; Szymczak *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2013). Au laboratoire, il a été montré que l'augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires à l'épirubicine (anthracycline) et au docétaxel (taxane) est accompagnée d'une diminution de la vascularisation tumorale (Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012).

Alors que la vascularisation tumorale permet la délivrance de l'agent thérapeutique, l'apparente contradiction entre l'augmentation de l'efficacité de la chimiothérapie et la diminution de la vascularisation est expliquée par le concept de normalisation vasculaire (Jain, 2005) (**figure 60**).

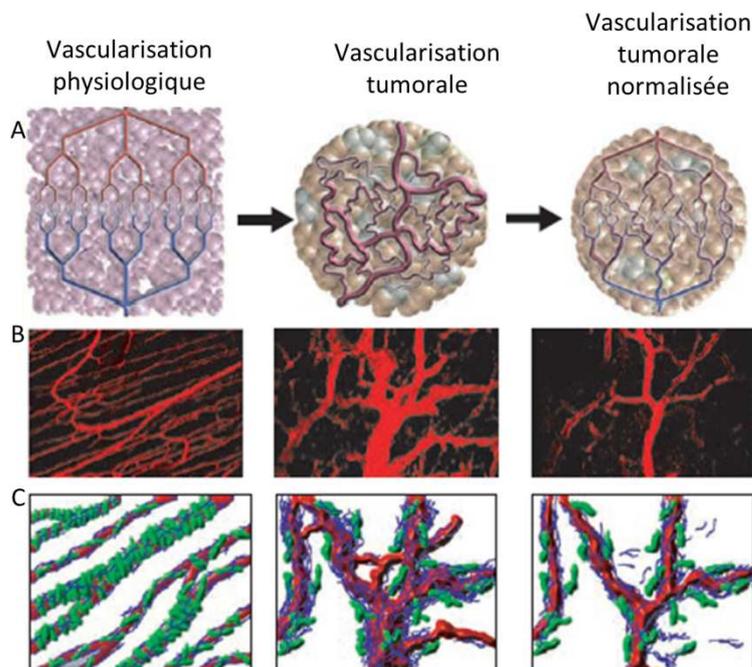


Figure 60. Modèle de normalisation vasculaire par une thérapie antiangiogénique anti-VEGFR2.

A_Modèle schématique de vascularisation. B_Microscopie bi-photonique de réseaux vasculaires. De droite à gauche : vaisseaux sanguins normaux de muscle squelettique, vaisseaux sanguins d'un carcinome colorectal humain, vaisseaux sanguins d'un carcinome colorectal humain trois jours après l'administration d'un anticorps anti-VEGFR2. C_Schéma représentant le recouvrement des vaisseaux sanguins par les péricytes (en vert) et la membrane basale (en bleue). Modifié d'après Goel et al. 2011.

Sous l'action de facteurs pro-angiogéniques entraînant une prolifération et une migration incontrôlées des cellules endothéliales, la vascularisation tumorale est moins fonctionnelle. En effet, elle présente des vaisseaux tortueux, dilatés et très perméables (Goel *et al*, 2011). A la différence d'un arbre vasculaire physiologique structuré en vaisseaux de gros calibre, en artérioles, puis en capillaires, le réseau vasculaire tumoral n'est pas hiérarchisé (**figure 60A**).

Les capillaires (micro-circulation) constituent une zone d'échanges pour les molécules comme l'oxygène, les nutriments ou encore les molécules thérapeutiques. La mauvaise qualité de la vascularisation tumorale mène à un flux sanguin hétérogène, avec des zones non perfusées, et peut affecter la délivrance des molécules thérapeutiques (Fukumura & Jain, 2007). Des données expérimentales indiquent que des traitements antiangiogéniques peuvent « normaliser » la structure et la fonction des vaisseaux tumoraux (Goel *et al*, 2011). La normalisation vasculaire est caractérisée par une diminution de la perméabilité des vaisseaux et une meilleure architecture menant à une diminution de l'hypoxie tumorale et de la pression interstitielle (qui s'oppose à la délivrance de l'agent anticancéreux) (Goel *et al*, 2011). Il a été montré que la normalisation vasculaire induite par une thérapie anti-VEGF augmente la délivrance intra-tumorale des molécules thérapeutiques (Tong *et al*, 2004; Chauhan *et al*, 2012; Jain & Stylianopoulos, 2010).

Au laboratoire, il a été montré qu'une supplémentation nutritionnelle en AGPIn3LC diminue la vascularisation tumorale avant même le début de la chimiothérapie (Colas *et al*, 2006; Kornfeld *et al*, 2012). Kornfeld *et al*. montrent que les AGPIn-3LC réduisent la pression interstitielle qui forme une barrière à la délivrance de l'agent anticancéreux, et diminuent la résistance des tumeurs mammaires au docétaxel (Kornfeld *et al*, 2012). Ces données suggèrent que les AGPIn-3LC, par leur action anti-angiogénique, pourraient réguler la vascularisation tumorale sur le plan fonctionnel et permettraient d'augmenter la délivrance des agents chimiothérapeutiques.

Dans le modèle de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU utilisé au laboratoire, la vascularisation tumorale a été explorée par une technique d'échographie avec agent de contraste au cours d'une chimiothérapie à base de docétaxel. Le développement d'une nouvelle méthode d'analyse a permis de discriminer les différents compartiments vasculaires tumoraux (micro-, médium et macro-vascularisation) (Mahéo *et al*, 2012) (Vibet, 2008, Thèse de Doctorat). Afin d'identifier des cibles moléculaires régulées par le régime

nutritionnel enrichi en AGPIn-3LC, l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans l'angiogénèse a été évaluée par puce à oligonucléotides (Kornfeld, 2011, Thèse de Doctorat). Une forte diminution du gène de l'épiréguline (EREG) a été identifiée dans les tumeurs mammaires AGPIn-3LC sous docétaxel. L'épiréguline appartient à la famille des facteurs de croissance EGF. L'étude de l'expression génique a été étendue aux membres de cette famille. Cette étude révèle également la régulation de l'expression de l'amphiréguline (AREG) dans les tumeurs mammaires AGPIn-3LC sous docétaxel.

La famille des facteurs de croissance EGF peut être subdivisée en trois groupes en fonction de leur affinité pour les récepteurs de la famille EGF (EGFR1, ERBB2, ERBB3 et ERBB4): i) l'EGF, le TGF α (« transforming growth factor »,) et l'AREG se lient spécifiquement à EGFR1, ii) la β -celluline (β -cell), l'HB-EGF (« heparin-bound EGF ») et l'EREG montrant une double spécificité pour EGFR1 et ERBB4, et iii) les neurégulines (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4) ou hérégulines se lient à ERBB3 et/ou ERBB4 (Hynes & Lane, 2005) (**figure 61**).

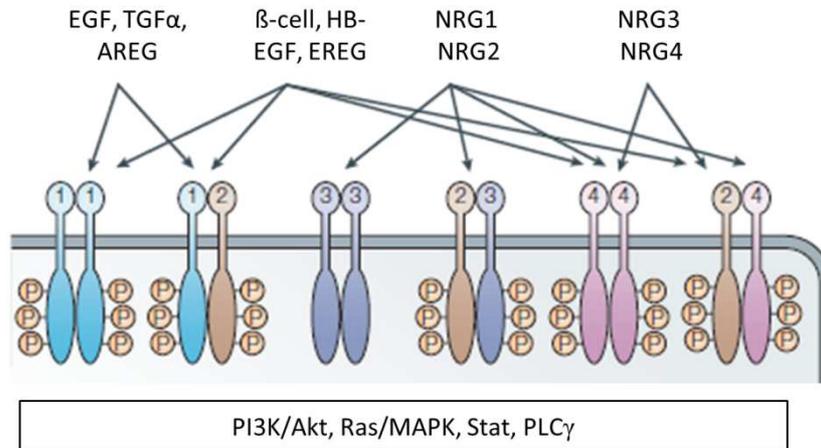


Figure 61. Ligands et récepteurs de la famille EGF

Modifié d'après Hynes & Lane 2005. Les membres de la famille EGF sont des ligands pour les récepteurs EGFR (ERBB1, « 1 »), ERBB2 (« 2 »), ERBB3 (« 3 ») et ERBB4 (« 4 »). La liaison d'un ligand-récepteur induit le changement de conformation du récepteur, son homo- ou hétéro-dimérisation et l'activation intrinsèque du domaine kinase du récepteur par autophosphorylation. Les phosphorylations de ce domaine intracellulaire sont à l'origine de l'activation de voies de signalisation (principalement les voies PI3K/Akt, Ras/MAPK, Stat et PLC). EGF : epidermal growth factor, TGF α : transforming growth factor, AREG : amphireguline, β -cell: β -celluline, NRG: neureguline., EREG:épiréguline

L'activité oncogénique de l'épiréguline et de l'amphiréguline a été décrite dans plusieurs carcinomes comme le cancer du poumon, du colon ou encore le cancer du sein (Busser *et al*, 2011; Riese & Cullum, 2014). Plusieurs études soulignent le rôle fonctionnel de l'EREG et de l'AREG dans la tumorigénèse et leurs implications dans la prolifération cellulaire, les métastases, l'angiogénèse, et la résistance aux thérapies (Busser *et al*, 2011; Riese & Cullum, 2014).

Les tumeurs sont composées de cellules cancéreuses mais aussi de cellules formant le microenvironnement tumoral (cellules vasculaires, fibroblastes et cellules immunitaires). De plus, dans le contexte mammaire, les adipocytes sont des acteurs cellulaires non négligeables du microenvironnement tumoral. Une expression de l'EREG en réponse au VEGF a été rapportée dans les cellules endothéliales (Wary *et al*, 2003). Dans les cellules tumorales, l'expression de l'EREG est sous le contrôle des signalisations MAPK/ERK1/2, p38 et PI3K/Akt (Baba *et al*, 2000; Cho *et al*, 2008b; Zhang *et al*, 2008).

Nous avons étudié l'expression de l'EREG et de l'AREG dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468 ainsi que dans un modèle de culture primaire de cellules endothéliales (HUVECs). Ces études *in vitro* ont été complétées par différents tests fonctionnels afin d'identifier l'impact de la régulation de l'EREG et de l'AREG par les AGPIIn-3LC sous docétaxel : ii) implication de l'EREG dans les propriétés angiogéniques des HUVECs et ii) implication de l'EREG et de l'AREG dans la sensibilisation des cellules tumorales mammaires au docétaxel par le DHA.

Chapitre 2. Résultats

Cette partie présente les principaux résultats de l'article "Remodelage of vascular architecture in n-3 PUFA supplemented mammary tumors increase taxane efficacy: epipegulin, a new target of n-3 PUFA ». Cet article regroupe des données obtenues et analysées avant mon arrivée au laboratoire avec certains de mes travaux de thèse. Les résultats de l'étude in vivo ont été obtenus durant les thèses de Sophie Vibet et de Sophie Kornfeld encadrées par C.Goupille et K.Mahéo. Ma participation à ce travail a été de compléter l'étude chez l'animal par une étude in vitro de la régulation de l'expression de l'EREG et de l'AREG dans des lignées tumorales mammaires et des cellules endothéliales.

1. Modèle in vivo de tumeurs mammaires

Dans le modèle de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU, la vascularisation tumorale a été explorée par échographie de contraste (Vibet, 2008, Thèse de Doctorat). L'injection de Sonovue® (microbulles d'hexafluorure de soufre) dans le réseau vasculaire puis l'analyse échographique des tumeurs mammaires permet de déterminer les paramètres dynamiques de la vascularisation tumorale (e.g. vitesse d'entrée du flux sanguin). Une nouvelle méthode d'analyse des images obtenues par échographie de contraste, nommée ARCHIVASC, a permis de discriminer les différents compartiments vasculaires (macro-, medium- et micro-circulation). Cette méthode est basée sur la quantification de l'intensité des pixels. L'accumulation des bulles de Sonovue® dans un vaisseau de gros calibre est plus importante que dans un vaisseau de petit calibre. Cette superposition de bulles conduit à une intensité plus forte des pixels de contraste dans un vaisseau de gros calibre. Ainsi, la discrimination des pixels de contraste en fonction de leur intensité permet de quantifier les vaisseaux larges (macro-circulation), les vaisseaux de diamètre moyen (medium-circulation) et les petits vaisseaux (micro-circulation). La densité globale des pixels, quelle que soit leur intensité, correspond à la densité vasculaire globale (Mahéo *et al*, 2012).

Une première analyse échographique a été réalisée sur les tumeurs mammaires des rats ayant suivi un régime alimentaire enrichi en AGPI n-3, ou contrôle, avant le début de la chimiothérapie. Dans le groupe de rats AGPI n-3, on observe une diminution de 80% de la macro-circulation (*p<0.05) et une augmentation de 30% de la micro-circulation (*p<0.05) par rapport au groupe contrôle (**figure 62A/B**). La diminution de la macro-circulation dans les

tumeurs AGPIIn-3LC est également observable dans les empreintes vasculaires tridimensionnelles (**figure 62C**). Le régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC n'affecte pas la densité vasculaire globale mais induit un remodelage de la vascularisation tumorale en faveur de la micro-circulation.

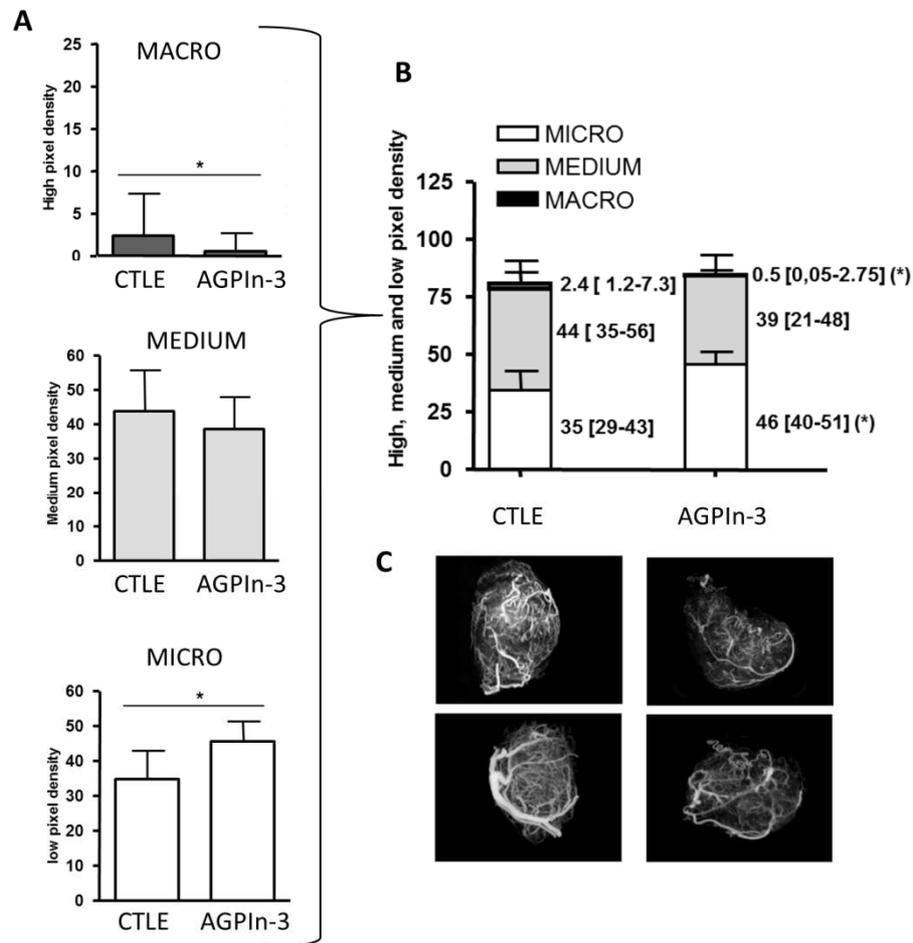


Figure 62. Le régime alimentaire enrichi en AGPIIn-3LC induit un remodelage de la vascularisation tumorale en faveur de la micro-circulation.

Analyse de la vascularisation des tumeurs mammaires de 2 cm² portées par des rats ayant suivi un régime alimentaire contrôle (n=14) ou enrichi en AGPIIn-3LC (n=14). A_ Les compartiments vasculaires sont quantifiés après échographie avec agent de contraste (médiane, interquartile Mann-Whitney, *p<0.05). B_Représentation en histogramme de la densité globale des pixels subdivisés par les trois compartiments présentés en A (médianes et interquartiles). C_Empreintes vasculaires 3D (deux tumeurs régime contrôle et deux tumeurs régime AGPIIn-3LC) obtenues après anesthésie des rats et injection d'un polymère et d'un agent de contraste pour l'acquisition rayon-X.

L'évolution des compartiments vasculaires a été suivie au cours d'une chimiothérapie à base de docétaxel. Après la deuxième semaine (W2) de traitement, le docétaxel induit une augmentation de 6 fois de la macro-vascularisation (*p<0.05) (**figure 63A** W2 comparée à

W0). Après 6 injections (W6), le docétaxel présente un effet antivasculaire avec une diminution de la densité globale de la vascularisation (-28%, *p<0.05, W6 comparée à W0, **figure 63A**). Cet effet est associé à une diminution de la macro-circulation (*p<0.05) et de la médium-circulation (**p<0.001) comparée à la vascularisation avant le début de la chimiothérapie (**figure 63A**).

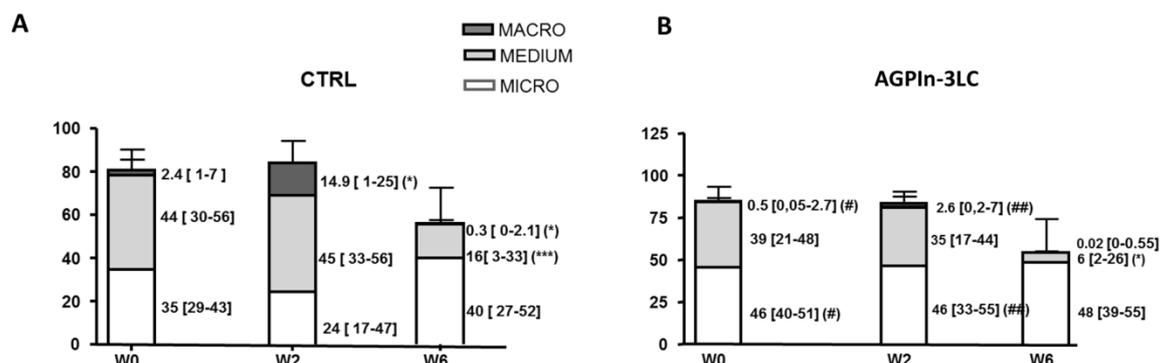


Figure 63. La micro-circulation est prépondérante dans les tumeurs AGPIn-3LC au cours de la chimiothérapie.

Analyse de la vascularisation des tumeurs mammaires portées par des rats ayant suivi un régime alimentaire contrôle (n=14, A) ou enrichi en AGPIn-3LC (n=14, B) au cours d'une chimiothérapie docétaxel (pendant 6 semaines, 1 injection par semaine). Mesures échographiques réalisées avant le début de la chimiothérapie (W0), après la deuxième injection de docétaxel (W2) et après la 6^{ème} injection de docétaxel (W6). Histogrammes représentant les différents compartiments vasculaires en % (à droite, médiane et interquartiles). Tests appariés : *p<0.05, **p<0.001 (comparé à W0 dans le même groupe nutritionnel) ; Mann whitney : #p<0.05, ##p<0.01 (comparé au régime nutritionnel contrôle à la même semaine de traitement). W : week

Comparées au régime contrôle, les tumeurs AGPIn-3LC présentent une architecture très différente après deux injections de docétaxel : la micro-circulation est augmentée de 50% (##p<0.01) et la macro-circulation diminuée de 80% (##p<0.01) (**figure 63A/B**, W2 régime AGPIn-3LC comparée à W2 régime contrôle). Dans les tumeurs AGPIn-3LC, la micro-circulation est le compartiment prépondérant tout au long du traitement docétaxel. A la fin de la chimiothérapie, l'effet antivasculaire du docétaxel est légèrement accentué dans les tumeurs AGPIn-3LC de manière non significative (W6 régime AGPIn-3LC comparée à W6 régime contrôle).

Concernant l'efficacité de la chimiothérapie, nous avons montré que les AGPIn-3LC apportés par l'alimentation augmentent la régression tumorale de l'ordre de 40% après six semaines de traitement avec le docétaxel. La micro-vascularisation avant le début de la chimiothérapie est corrélée à la taille tumorale mesurée après 6 semaines de traitement

docétaxel ($r^2=0.54$, $*p<0.05$). Ainsi, plus la micro-circulation est importante avant la chimiothérapie, plus la taille tumorale est petite à la fin de la chimiothérapie.

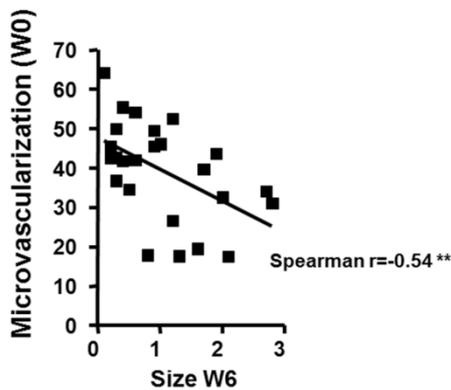


Figure 64. Corrélation entre la micro-circulation avant la chimiothérapie et la taille tumorale après 6 semaines de chimiothérapie.

Points : données individuelles (n=14 groupe contrôle + n=14 groupe AGPIn-3). Micro-circulation (%) avant le début de la chimiothérapie (W0) et taille tumorale (cm²) après 6 cycles de chimiothérapie. (Spearman, $**p<0.05$)

Les capillaires représentant la micro-circulation sont des zones d'échanges de molécules. Cette corrélation suggère que la distribution intra-tumorale du docétaxel pourrait être améliorée dans une tumeur présentant une forte proportion de micro-circulation, ce qui mènerait, *in fine*, à une augmentation de la réponse tumorale.

La concentration sérique du VEGF-A, facteur majeur de l'angiogénèse, a été dosée chez les rats du groupe contrôle et du groupe AGPIn-3LC, après six semaines de chimiothérapie. Alors que le docétaxel diminue la synthèse du VEGF, le régime nutritionnel AGPIn-3LC n'a pas d'effet sur le taux de VEGF circulant.

Pour essayer d'identifier des cibles régulées par le régime AGPIn-3LC, l'expression de plus de 80 gènes impliqués dans l'angiogénèse a été explorée par puce à oligonucléotides après 6 cycles de chimiothérapie. Une analyse exhaustive de l'expression des gènes régulés par les AGPIn-3 et identifiés par la puce à oligonucléotides a été étendue aux tumeurs non traitées par le docétaxel.

Seule la régulation du gène de l'épiréguline par les AGPIn-3 sous docétaxel a été confirmée sur un nombre plus important de tumeurs mammaires (**figure 65A**). Nous observons une diminution de 4.5 fois de l'expression de l'épiréguline dans les tumeurs du groupe AGPIn-3LC comparées aux tumeurs du groupe contrôle, sous docétaxel ($***p<0.001$, **figure 65A**). Sans chimiothérapie, le régime AGPIn-3 tend à diminuer l'expression de l'épiréguline (diminution de 1.6 fois).

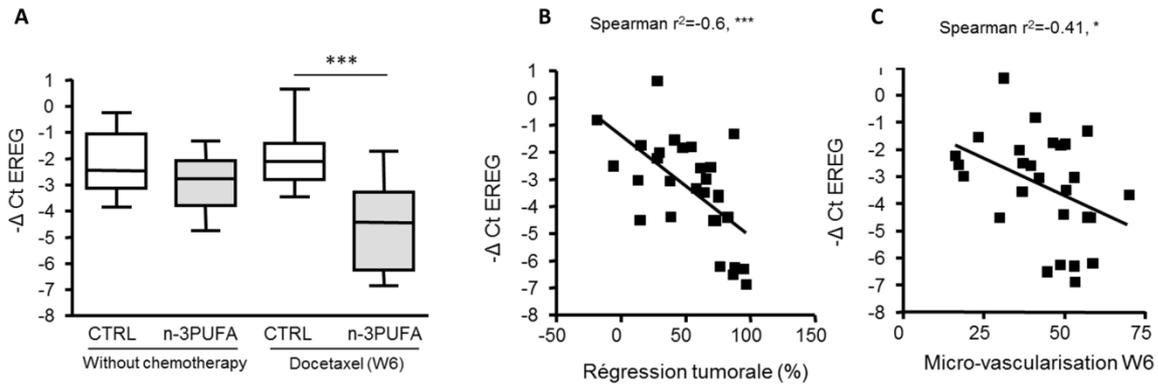


Figure 65. Régulation de l'expression de l'épiréguine dans les tumeurs mammaires de rats

A_ Analyse de l'expression de l'épiréguine par PCR quantitative exprimée en $-\Delta Ct$ (HPRT1, gène de référence pour la normalisation, $n=14$ par groupe nutritionnel avec et sans chimiothérapie, Mann Whitney, $***p<0.001$). **B et C_** Corrélation entre l'expression de l'épiréguine sous docétaxel et la régression tumorale (B) ou la micro-circulation (C) après 6 cycles de docétaxel (Spearman, $*p<0.05$, $***p<0.001$).

L'expression de l'épiréguine est fortement corrélée à la régression tumorale après six cycles de docétaxel ($r^2=-0.6$, $***p<0.001$) (**figure 65B**). Parmi les paramètres vasculaires mesurés, l'expression de l'épiréguine est uniquement corrélée à la micro-circulation ($r^2=-0.41$, $p<0.05$) (**figure 65C**). Collectivement, ces données suggèrent que la diminution de l'expression de l'épiréguine est associée à une proportion plus importante de micro-circulation dans la tumeur et à une meilleure réponse au docétaxel.

L'étude de l'expression des ARNm des tumeurs mammaires a été étendue aux autres membres de la famille EGF (EGF, amphiréguine, heparin-bound EGF, $TGF\alpha$, neuregulin 1). L'amphiréguine est le seul gène de cette famille à être régulé par les AGPI $n-3$ dans les tumeurs mammaires sous docétaxel. L'expression de l'amphiréguine est diminuée de 2 fois dans les tumeurs mammaires de rats AGPI $n-3$ sous docétaxel ($*p<0.05$, **figure 66A**). De la même manière que pour l'épiréguine, l'expression de l'amphiréguine est fortement corrélée à la régression tumorale après six cycles de docétaxel ($r^2=-0.6$, $***p<0.001$) (**figure 66B**). Il n'existe aucune corrélation entre l'expression de l'amphiréguine et les paramètres vasculaires étudiés.

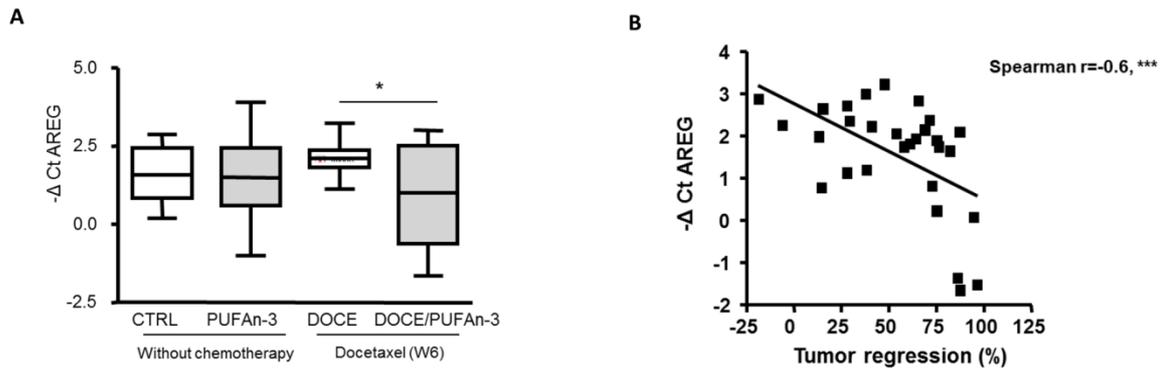


Figure 66. Régulation de l'expression de l'amphiréguline dans les tumeurs mammaires de rat

A_ Analyse de l'expression de l'amphiréguline par PCR quantitative exprimée en $-\Delta Ct$ (gène de référence pour normalisation HPRT1, n=14 par groupe nutritionnel avec et sans chimiothérapie, mann whitney, * $p < 0.05$). **B** _Corrélation entre l'expression de l'amphiréguline sous docétaxel et la régression tumorale après 6 cycles de docétaxel (Spearman, *** $p < 0.001$).

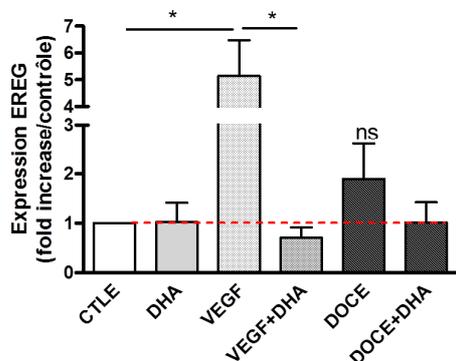
L'expression des différents membres de la famille EGF a aussi été analysée dans des tumeurs mammaires de rat après 6 cycles de chimiothérapie à base d'épirubicine (famille des anthracyclines) ayant suivi un régime alimentaire enrichi en AGPIn-3 ou un régime contrôle. Aucune différence d'expression n'a été observée (n=9/groupe nutritionnel, non montré). La régulation de l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline par les AGPIn-3 dans les tumeurs mammaires de rat semble spécifique de la chimiothérapie à base de docétaxel.

2. Modèle *in vitro* : régulation de l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les cellules endothéliales

Le potentiel anti-angiogénique du DHA a été évalué dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales issues de veines ombilicales humaines (HUVECs).

L'expression de l'épiréguline a été rapportée pour être fortement induite par le VEGF dans les cellules endothéliales (Wary *et al*, 2003). Nous avons exploré la régulation de l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF, puissant facteur pro-angiogénique. Le VEGF induit l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline, d'environ 5 fois (* $p < 0.05$) (**figure 67**). L'enrichissement en DHA bloque l'expression de l'épiréguline induite par le VEGF (* $p < 0.05$) mais n'a pas d'effet sur l'expression de l'amphiréguline. Des expériences similaires ont été réalisées sur des cellules traitées par le docétaxel. Le docétaxel n'induit pas l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les cellules endothéliales (**figure 67**).

A_ Expression des ARNm de l'épiréguline



B_ Expression des ARNm de l'amphiréguline

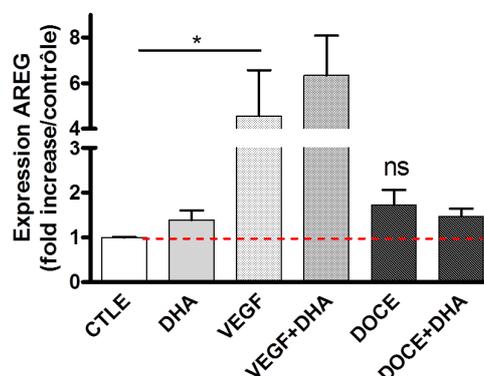


Figure 67. Expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les cellules endothéliales HUVECs

Résultats exprimés en quantité relative de mRNA ($Q=2^{-\Delta\Delta Ct}$, gène de référence HPRT1, n=3, moyenne +/- SEM, Mann-Whitney, * $p<0.05$). Les HUVECs sont cultivées sur des supports recouverts de gélatine (0.2%). Les cellules sont sevrées sur la nuit et traitées avec 30 μM de DHA (ou éthanol). Le VEGF (20 ng/ml) et le docétaxel (1 nM) sont appliqués pendant 2 h +/- DHA (30 μM) puis les cellules récoltées et les ARN purifiés avant l'analyse par qPCR.

L'effet de la régulation de l'épiréguline, dont l'expression est induite par le VEGF et inhibée par le DHA, a été évalué par un test fonctionnel de prolifération cellulaire (**figure 68**).

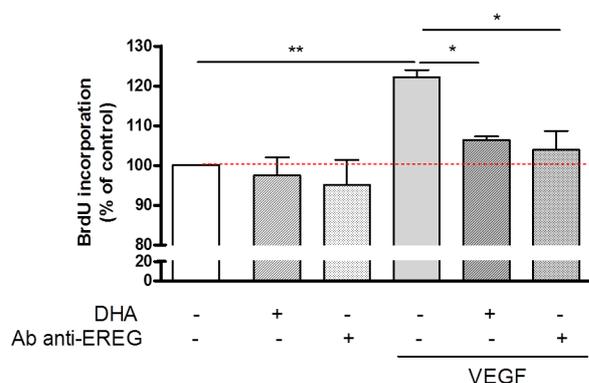


Figure 68. Le DHA et la neutralisation de l'épiréguline bloquent la prolifération cellulaire des HUVECs induite par le VEGF.

(n=3, moyenne +/-SEM, Mann Whitney * $p<0.05$, ** $p<0.01$). Les HUVECs sont sevrées pendant 4 h puis la prolifération cellulaire est évaluée par incorporation de BrDu (100 μM) pendant 24 h en présence de VEGF (20 ng/mL), de DHA (30 μM), d'anticorps neutralisant dirigé contre l'épiréguline (10 $\mu\text{g/mL}$).

Le VEGF augmente la prolifération des HUVECs de 25% (** $p<0.01$). Le DHA et l'inhibition de l'épiréguline membranaire et/ou sécrétée dans le milieu de culture bloquent la prolifération cellulaire induite par le VEGF (**figure 68**).

Dans ce modèle cellulaire, l'effet antiangiogénique du DHA a été démontré par d'autres expériences réalisées au cours de la thèse de S.Kornfeld :

- i) Le DHA diminue la formation de pseudocapillaires induite par le VEGF.

- ii) Le DHA diminue la perméabilité d'une mono-couche d'HUVECs induite par le VEGF.
- iii) Le DHA diminue la migration des HUVECs induite par le VEGF.
- iv) Le DHA bloque la migration trans-endothéliale de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 induite par le VEGF.

3. Modèles *in vitro* : régulation de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les cellules cancéreuses mammaires

Les tumeurs mammaires sur lesquelles a été réalisée l'étude de l'expression génique sont composées de cellules stromales et, majoritairement, de cellules épithéliales cancéreuses. L'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline, cibles des AGPI-3 identifiées grâce à cette étude, peut ne pas être restreinte aux cellules endothéliales. Nous avons donc exploré la régulation de leur expression dans deux lignées tumorales mammaires MDA-MB-231 (**figure 69**) et MDA-MB-468.

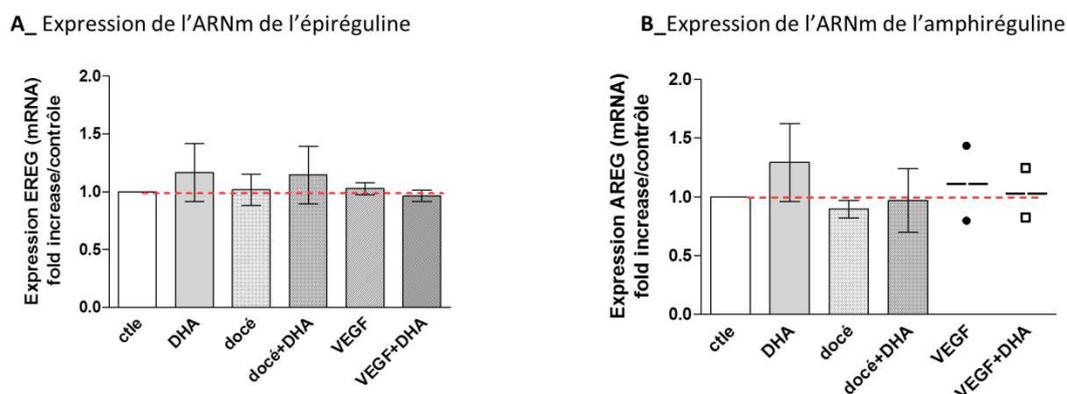


Figure 69. Expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans la lignée cellulaire MDA-MB-231.

Les résultats sont exprimés en quantité relative ($Q=2^{-\Delta\Delta Ct}$, gène de référence HPRT1) (A, Expression ARNm épiréguline : moyenne +/- SEM, n=3) (B, Expression ARNm amphiréguline : moyenne +/- SEM, n=3 sauf pour les conditions VEGF n=2). Les cellules sont sevrées sur la nuit et traitées avec 30 μ M de DHA (ou éthanol). Le VEGF (20 ng/ml) et le docétaxel (1 nM) sont appliqués pendant 2 h +/- DHA (30 μ M) puis les cellules sont récoltées et les ARN purifiés avant l'analyse par qPCR.

Le DHA, le docétaxel et le VEGF ne régulent pas l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 (**figure 69**). Aucune modification de l'épiréguline et de l'amphiréguline n'a été observée dans les cellules tumorales MDA-MB-231 quelle que soit la condition testée. Les mêmes résultats ont été obtenus sur la lignée MDA-MB-468 (n=3, non montré).

Nous avons montré que le DHA augmente la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468 au docétaxel (voir Résultat partie 1). Nous avons évalué l'efficacité du docétaxel en présence de différents anticorps neutralisants dans les cellules MDA-MB-231 (**figure 70**) et MDA-MB-468 (non montré). L'efficacité du docétaxel n'est pas modifiée par l'inhibition de l'épiréguine et de l'amphiréguine. Collectivement, ces résultats suggèrent que ces deux facteurs de croissance ne sont pas impliqués dans la sensibilisation des cellules tumorales mammaires au docétaxel par le DHA.

C_Test de chimiosensibilisation au docétaxel

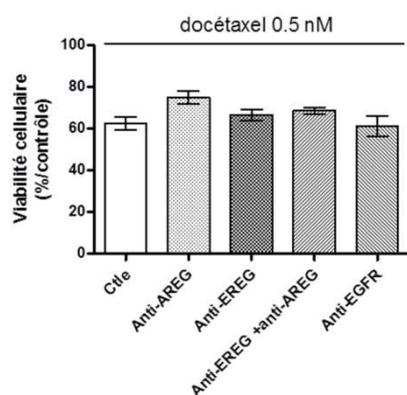


Figure 70. Test de chimiosensibilisation des cellules tumorales MDA-MB231 au docétaxel en présence d'anticorps dirigés contre l'épiréguine, l'amphiréguine et l'EGFR.

Test de chimiosensibilisation sur 7 jours en présence de d'anticorps neutralisants anti-amphiréguine (n=3, 5 µg/mL), anti-épiréguine (n=2, 5 µg/mL), anti-épiréguine + anti-amphiréguine (n=2) et anti-EGFR (erbitux®, n=4, 10 µg/mL) (moyenne +/- EC). Pour chaque condition, le résultat est exprimé en % de viabilité cellulaire par rapport au contrôle approprié (non représenté sur la figure).

Notre première analyse sur ARN tumoraux nous a permis d'identifier l'épiréguine et l'amphiréguine, cibles régulées par les AGPIn-3LC et fortement associées à la régression tumorale. Cependant, la tumeur est composée de nombreux types cellulaires. L'utilisation de modèles *in vitro* nous a permis i) de montrer une régulation de ces molécules dans les cellules endothéliales dont la réponse au VEGF est perturbée par le DHA ; ce blocage de la signalisation VEGF pourrait expliquer, en partie, les effets inhibiteurs du DHA sur les tests fonctionnels *in vitro* et l'effet antiangiogénique *in vivo* et ii) de montrer que les cellules tumorales ne semblent pas présenter de régulation pour ces gènes en réponse au docétaxel ou au VEGF, suggérant que les cellules tumorales ne sont pas impliquées directement dans la régulation de ces gènes dans les tumeurs.

Remodelage of vascular architecture in n-3 PUFA supplemented mammary tumors increase taxane efficacy : epiregulin, a new target of n-3 PUFA

Caroline Goupille*^{1,2}, Lucie Chauvin*¹, Sophie Vibet¹, Sophie Kornfeld¹, Isabelle Domingo¹,
Stephan Chevalier¹, Philippe Bougnoux^{1,2}, Karine Mahéo¹.

¹Inserm U1069 “Nutrition, Croissance et Cancer” Université François Rabelais, Tours, France;

²Hôpital “Bretonneau”, CHRU, Tours, France;

Corresponding author: Karine MAHEO

Address: INSERM U1069, “Nutrition, Croissance et Cancer”, Université François-Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Bd Tonnellé, F-37032 TOURS Cedex, France. Tél: (+33) 2 47 36 62 26. Fax : (+33) 2 47 36 62 26.

E-mail address: karine.maheo@univ-tours.fr.

Running title: n-3 PUFA potentiate docetaxel treatment by increasing microvascularization.

Keywords: n-3 LCPUFA, docetaxel, vascularization, epiregulin

Abbreviations

CEUS: Contrast-Enhanced UltraSound, DHA: Docosaheptaenoic Acid, EPA: Eicosapentaenoic Acid, n-3 LCPUFA: Long chain omega-3 Poly Unsaturated Fatty Acids,

ABSTRACT

n-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (n-3 LCPUFA) have generated increasing interest for their capacity to improve the efficacy of standard chemotherapy without additional side effects. We hypothesized that n-3LCPUFA were able to induce a remodelage of vascularization in mammary tumors in favor of microvascularization leading to a more efficient drug delivery. We used an original contrast-enhanced ultrasound method to access to the quantification of large, medium and small vessels. This vascular architecture was monitored during docetaxel treatment of mammary tumors in rats fed with two nutritional diets (control or n-3LCPUFA). A remodelage of vascular architecture was observed in the n-3LCPUFA tumors before and mainly during docetaxel treatment, with a preponderant microvascularization in n-3LCPUFA tumors (46% in docetaxel/n-3LCPUFA and 24% in docetaxel-tumors after 2 weeks of chemotherapy, $p < 0.01$). Microvascularization is correlated to an increased response to docetaxel chemotherapy ($r^2 = 0.54$, $p < 0.01$). Gene analysis with angiogenesis arrays allowed to identify new targets of n-3LCPUFA, epiregulin and amphiregulin, 2 members of EGF family known to be involved in cancer progression, resistance to cancer treatments and angiogenesis. The EREG and AREG mRNA levels were reduced by ~ 4.5 and 2-fold respectively in docetaxel/n-3LCPUFA tumors. The expression of both genes was correlated to tumor regression ($p < 0.001$). In vitro studies showed that EREG expression is strongly induced by VEGF in endothelial cells. The VEGF-induced EREG expression and its pro proliferative effect can be counteracted by the n-3LCPUFA docosahexaenoic acid (22:6n-3) supplementation. These preclinical data reported here and previously strengthen the findings that n-3 LCPUFA could be a complementary clinical strategy to improve drug delivery by remodeling vascularization and in turn decrease anticancer drug resistance.

INTRODUCTION

Among n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (n-3LCPUFA), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) have generated increasing interest for their abilities to decrease resistance of experimental mammary tumors to anthracyclines, taxanes or radio-therapy without additional side effects (reviewed in (Biondo et al., 2008; Bougnoux et al., ; Calviello et al., 2009)). It has been previously reported by us and others that n-3 LCPUFA, or their metabolites derived from lipid metabolism display an antiangiogenic effect (Colas et al., 2006; Rose & Connolly, 1999) (Szymczak et al., 2008; Zhang et al., 2013). We previously reported that the reduction in tumor vascularization was accompanied by an enhancement of tumor sensitivity to anthracyclines or taxanes (Colas et al., 2006; Kornfeld et al., 2012).

There is an apparent paradox between antiangiogenic molecule that destroy the tumor vasculature and intravenous chemotherapeutic agent administration that require adequate tumor perfusion for effective delivery. Vascular quality of tumor is recognized to be poor, with highly dilated and permeable vessels leading to high interstitial fluid pressure. Unlike normal vessels, tumor vessels lack an orderly branching hierarchy from large vessels into successively smaller vessels (microvascularization) that feed a regularly spaced capillary bed involved in the exchange of molecules such as oxygen, nutrients or therapeutic molecules. These differences affect the delivery of molecules and leave unperfused regions (Fukumura & Jain, 2007). These structural abnormalities of the tumor vasculature have far-reaching consequences for poor response to anti-cancer therapies. Several experimental evidences indicated that antiangiogenic treatments 'normalized' the abnormal structure and functions of tumor vasculature. The tumor vessels become smaller in diameter, less tortuous and are more efficient for oxygen and drug delivery (Tong et al., 2004).

In a previous study, we have demonstrated the potential of n-3 LCPUFA to reduce interstitial fluid pressure that forms a barrier to drug delivery and hence, resistance to therapy. (Kornfeld et al., 2012) These data suggested that n-3 LCPUFA were able to “normalize” tumor vascularization by an improvement in their functional efficiency. The objective of this study was to examine whether n-3LCPUFA were able to induce a remodelage of vascular architecture in mammary tumors in favor of microvascularization prior or during docetaxel chemotherapy (a major anticancer drug used in clinical practice). We used an original contrast-enhanced ultrasound method (CEUS), using SonoVue[®] (microbubbles of sulphur hexafluoride) as ultrasound contrast agent, to access to the quantification of large, medium and small vessels. Microbubbles, present a diameter equivalent or inferior to red blood cells (10 µm). Owing to the important echogenicity and specific properties of this agent, functional vessels, from large to small vessels, can potentially be visualized by CEUS. Larger vessels contained more contrast agents than the smaller ones, leading to a scaled intensity of contrast enhancement. This method of discrimination and quantification of macro-, medium- and micro-vascularization densities was validated by standard immunohistological analysis and was applied in a clinical setting to detect changes of vascular architecture during chemotherapy of human breast carcinoma. (Maheo et al., 2012). The purpose of this study was to identify genes involved in angiogenesis regulated by n-3LCPUFA and correlated to vascular parameters and anti-tumor efficacy of docetaxel in rat mammary tumors. Lastly, the relevance of the selected targets was evaluated using endothelial cells and mammary cancer cell lines for in vitro studies.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Animal study and experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Val de Loire (France). Carcinogenesis initiation and diets were specifically described in Kornfeld et al. (Kornfeld et al., 2012). Briefly, mammary carcinogenesis was initiated in female Sprague-Dawley rats by injection of a single dose of N-nitrosomethylurea (25 mg/kg). Rats into the control nutritional group (n=28) were fed a diet containing peanut oil (12 %), rape oil (3 %) (% g/100 g of diet). Rats within the n-3LCPUFA nutritional group (n=28) were fed a diet containing peanut (8 %), rape (2 %) and fish oils (5 %), that finally led to a diet composed of 2.5% DHA and 1% EPA. When tumors reached 2 cm² (week 0), 14 rats of both groups were treated once a week with docetaxel (Taxotere[®], Sanofi Aventis, France; 6 mg/kg/week intraperitoneal) for 6 weeks. Tumor area variation, measure of vascular parameters and qPCR analysis were performed on tumors without docetaxel treatment or after chemotherapy treatment.

Functional vascular quantification and determination of micro, medium and macrovascularization

Tumor vascularization was investigated with Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS). CEUS ultrasound data were acquired with a dedicated CnTI™ technology (Contrast Tuned Imaging, Esaote, Italy) using a Technos scanner equipped with a 5-10 MHz probe (LA 532, Esaote, Italy). Microbubbles of SonoVue[®] (Bracco Imaging SpA, Milano, Italy) were used as contrast agent (0.3 mL, 45µg/mL, i.v. bolus injection) (Broillet et al., 2005). In manually drawn region of interest, CEUS signal on video clip was analyzed using Visilog.6 software (Noesis, France). Two frames, one before the SonoVue arrival and one at the peak of contrast

enhancement were selected from the CEUS video clip. Pixels from the first frame (non-canceled tissue signal) were subtracted from the peak frame. All contrast-enhanced pixels were quantified and defined the global pixel density (GPD) corresponding to a vascular density. Larger vessels contained more contrast agents than the smaller ones, leading to a scaled intensity of contrast enhancement. Discrimination of the CEUS signal according to the pixel intensity under MATLAB[®] software, as described in ref (Maheo et al., 2012) allows to determine High-, Medium and Low Pixels Densities reflecting vascular architecture with large, medium and small vessels (macro, medium and microvascularization).

Casting of vascularization

Anesthetized rats were perfused (Perfusion One[™], myNeuroLab, St Louis, MO) with 50 mL of polymer PU4ii (VasQtec, Switzerland) mixed with Lipiodol (X-ray contrast agent, Guerbet, France). For the X-ray scan acquisition (Imaging Center, CIPA, Orléans, France), a desktop CT system (CT 120, General Electric Healthcare) was used with a nominal isotropic voxel size of 50 μm . The X-ray tube was operated at 70 kVp and 50 mA. Per scan, 720 projection images were acquired with an integration time of 20 ms and additional four times frame averaging for improved signal-to-noise ratio (SNR). Raw data were reconstructed with a modified Feldkamp cone-beam reconstruction algorithm, resulting in 16-bit gray-scale images, with 50 μm^3 isotropic voxels (Micro View Analysis and release 2.3.a7; GE Healthcare).

Oligonucleotide PCR arrays and real-time quantitative PCR analysis

Total RNA from tumor samples was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, France), and then, reverse transcribed using a cDNA synthesis kit (“Ready-to-go”, GE Healthcare) following the instruction provided by the manufacturer. The cDNA were used for

real-time PCR analyses with the Angiogenesis RT² ProfilerTM PCR Array (Superarray). The 84 genes of PCR arrays are involved in modulating the biological processes of angiogenesis (gene list in supplementary data 1). The expression of 84 pathway specific genes was compared between the two nutritional groups.

Total RNA from cultured cells was extracted using NucleoSpin [®]RNAII Columns (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and reverse-transcribed using PrimeScript RT Reagent kit (Takara).

Real-time qPCR was carried out with MyiQ thermocycler (Biorad, France) using Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen, France). The reaction protocol was: 10 min start at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, and 30 sec at 72°C. Relative gene expression profiles were determined according to the $-\Delta\text{CT}$ method by normalizing to the endogenous reference gene HPRT1 (rat hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) (CT gene of interest – CT HPRT1). The primer sequences for EREG, AREG, β Celluline, Heparin Binding-EGF, Tumor Growth Factor α , neuregulin1 and reference gene HPRT1 (Sigma-Aldrich) are as follows: EREG forward, 5'-CCGTGATTCTCGTTTTCTC -3' and reverse 5'-TTTACTTTTGCGATTTCTGTACCA-3'; AREG forward, 5'-GGTGAATGCAGATACATCGAGA -3' and reverse 5'-CGTTCGCCAAAGTAATCCTG -3'; β Celluline forward, 5'-TGAAACCAATGGCTCTCTTTG and reverse 5'-CGATTTCTGTCTAGGGGTGGT -3'; Heparin Binding-EGF : forward, 5'-TGGGGCTTCTCATGTTTAGG-3' and reverse 5'-CATGCCCAACTTCACTTTCTC-3', Tumor Growth Factor α : forward, 5'-TTGCTGCCACTCAGAAACAG-3' and reverse 5'-ATCTGCCACAGTCCACCTG-3', neuregulin1 : forward, 5'-CTGCTAGCCCCTTGAGGAT-3' and reverse 5'-GCTCGTACTCTTGGGTCGTTT-3', HPRT1 forward, 5'-GAC CGG TTC TGT CAT GTC G-3' and reverse 5'-ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC -3';

In vitro studies

Human breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from European Collection of Cell Culture (Catalogue No 92020424). After reception, cells were amplified in order to make a large reserve of cryopreserved cells. Every 3 months, a new cryopreserved bulb was thawed and used for this study. MDA-MB-231 cell line was grown in Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 1% (v/v) penicillin-streptomycin in a 37°C humidified incubator with 5% CO₂. Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVEC) (Promocell, Germany) were cultured in M199 media (Sigma) supplemented by 20% SVF, 100 µg/mL Heparin, 50 µg/mL endothelial cell growth supplement (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin. HUVECs were used up to the 5th passage. For qPCR and BrdU experiments, HUVECs were seeded on coated plates (0.2% gelatin) and they were cultured overnight in M199 with 10% SVF, 1% PS, 100 µg/ml heparine (without ECGS). BrdU incorporation (100 µM) was determined with Cell Proliferation ELISA BrdU Roche 24H after cell treatments. For pseudo-capillary formation, endothelial cells were seeded on Matrigel® (BD, France). Pseudo-capillaries structures were photographed (5 field) and then counted. Representative images at 10× magnification of pseudocapillary network in control cells or after VEGF and DHA treatment

DHA (Docosahexaenoic acid) methyl ester (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was purified in our laboratory using thin layer chromatography to eliminate oxidized derivatives. DHA was then aliquoted, stored under nitrogen gas and kept at -80°C for up to three weeks. DHA was dissolved at 150 mM in 100% ethanol and was used as previously described [24, 34]. VEGF was purchased from Sigma-Aldrich and was stored at -20°C as 10µg/mL solution in PBS. Anti-EREG was purchased from R&D Systems and stored at 4°C after reconstitution

in PBS (stock 0.2mg/mL). Cells were treated with DHA (10-30 μ M) or with vehicle (Ethanol), VEGF (20 ng/mL), anti-EREG (10 μ g/mL).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 4 software (La Jolla, CA). Mann-Whitney test, paired test and t test were used. Spearman test was used for correlation. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

n-3LCPUFA supplementation induced a remodelage of mammary tumor vascularization

Female rats carrying mammary tumors were fed a control diet or a n-3 PUFA enriched diet and tumor vascularization was quantified with CEUS when the tumors reached 2 cm² (Week 0 :W0, no docetaxel). Discrimination of the signal CEUS according to the pixel intensity allowed to access to vascular architecture with the quantification of large, medium and small vessels. Images of tumors of the 2 nutritional groups showing the global vascular density detected by CEUS (GPD) and high intensity-pixel density reflecting macrovascularization are presented in Figure 1A. A remodelage of mammary tumor vascular architecture was observed in the n-3LCPUFA group, with an enrichment of microvascularization by ~ 31% (p<0.05) and a decrease of macrovascularization (a 4.8 fold change between medians for larger vessels, p<0.05) compared to control diet tumors (figure 1B). Throughout the article, histograms have been chosen to represent the GPD subdivided in three compartments micro, medium and macrovascularization (median values, bar interquartiles) (Figure 1C). Two rats per nutritional group were perfused with polymer mixed with X-ray contrast agent and three dimensional vascular casting were obtained by the X-ray scan acquisition. A decrease of the larger vessels can also be observed in the two vascular casting of n-3LCPUFA tumors compared to control tumors (figure 1D).

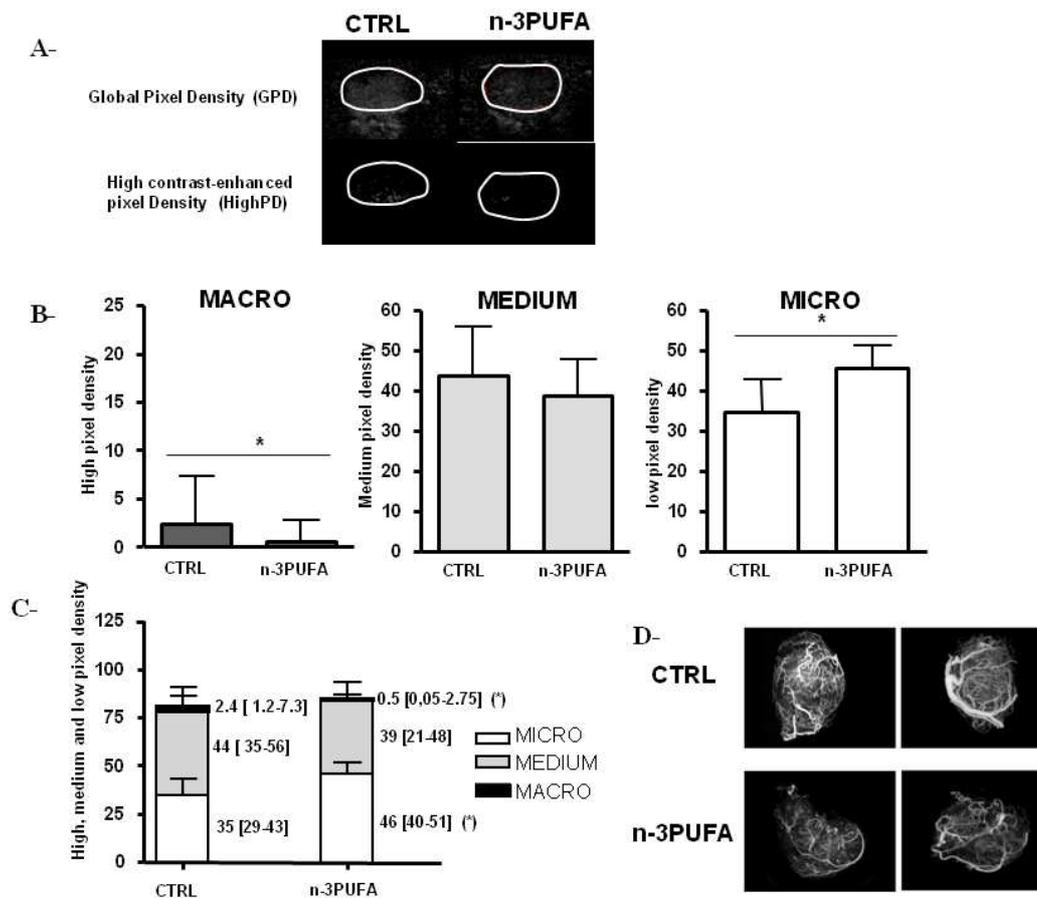


Figure 1 A n-3LCPUFA-enriched diet induces a remodeling of tumor vascularization in favor of microvascularization. Female rats carrying mammary tumors were fed a control diet or a n-3 PUFA enriched diet and tumor vascularization was quantified when the tumors reached 2 cm² (no docetaxel-W0) (n=14/nutritional group). Microbubbles of SonoVue[®] were used as contrast agent. The global vascular density was detected by contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and the % of the three vascular compartments micro, macro and microvascularisation were quantified after discrimination of the sonographic signal CEUS according to the pixel intensity under MATLAB[®] software. **A-** Example of images obtained by CEUS showing GPD (upper panel) and High intensity-pixel density reflecting macrovascularization (lower panel). **B-** The three vascular compartments micro, macro and microvascularisation were quantified in control and n-3 PUFA tumors (median values, bar interquartiles) **C-** The results are summarized by histograms representing the GPD subdivided in three compartments micro, medium and macrovascularization (median values, bar interquartiles). **D-** 3-dimensionnal images of tumor vascularization after casting of two control and two n-3LCPUFA tumors.. *P<0.05 (compared to control group, Mann-Whitney test).

Tumor microvascularization remained preponderant in n-3LCPUFA along docetaxel treatment and is correlated to tumor regression

When the tumor reached 2 cm² (W0), docetaxel was injected each week for 6 weeks and the evolution of vascular compartments was followed by CEUS after 2 and 6 weeks of chemotherapy (W2 and W6). Figure 2A shows the evolution of the size and

macrovascularization of a representative tumor of each nutritional group before treatment (W0) and at W2 and W6. As expected and as already described in a previous study (Kornfeld and al, 2012), n-3 LCPUFA improve the efficacy of taxanes by increasing tumor regression after 6 weeks of chemotherapy. In this present study, tumor regression under docetaxel chemotherapy (between W0 and W6) reached -70% in the n-3LCPUFA group compared to -40% in the control nutritional group (**P<0.01).

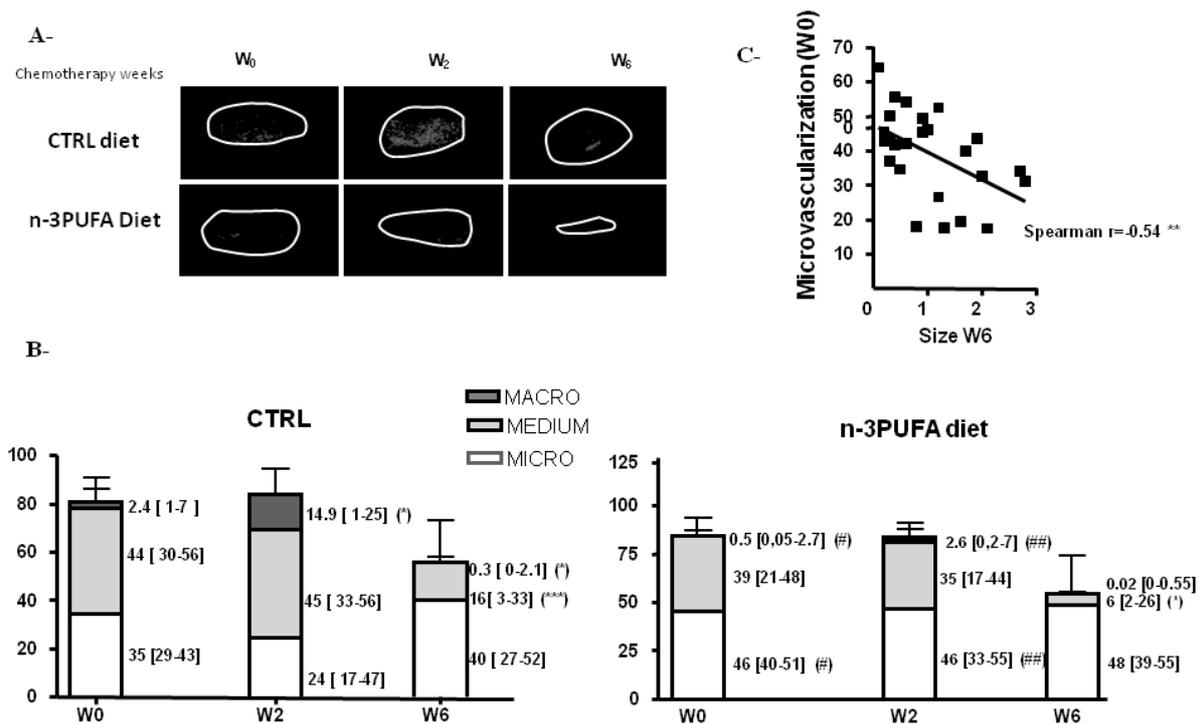


Figure 2 Microvascular compartment is preponderant in n-3LCPUFA-tumors along docetaxel treatment. When the tumor reached 2 cm², docetaxel was injected at 6mg/kg/week each week for 6 weeks and tumor vascularization was quantified by CEUS before (W0) and after two (W2), or 6 weeks (W6) of docetaxel therapy (n=14/nutritional group). **A-** Examples of CEUS-images of High intensity-pixel density reflecting macrovascularization during a tumor follow-up of each nutritional group. **B-** Histograms showing GPD subdivided in three compartments: micro, medium and macro in control and n-3LCPUFA groups at W0, W2 and W6. On the right, medians and interquartiles. *P<0.05, ***P<0.001 (compared to W₀ in the same dietary group, paired test); #P<0.05, ##P<0.01 (compared to control nutritional group at the corresponding time points, Mann-Whitney test). **C-** Correlation between microvascularization measured before chemotherapy at W0 (%) and the tumor size at the end of chemotherapy treatment (W+6). Points: individual data (Spearman test).

At W+2, docetaxel led to an enrichment in larger vessels in control nutritional group (a 6-fold median -change) (p<0.05) (Figure 2B). At W2, the tumor vascular architecture is considerably different between the tumors of the 2 nutritional groups, with a preponderant

microvascularization in n-3LCPUFA tumors compared to control nutritional group (median values : 24 in control group and 46 in n-3LCPUFA group, $p < 0.01$). After 6 weeks of chemotherapy (W+6), docetaxel induced an antivascular effect with a reduction of GPD by ~28% ($p < 0.05$) compared to W0, and a decrease of macro and medium compartments (a decreased median fold-change of 8-fold ($p < 0.05$) and of 2.8-fold ($p < 0.001$) respectively). At the end of chemotherapy, the anti-vascular effect of docetaxel on macrovascularization is slightly accentuated in n-3LCPUFA-tumors but the differences between the 2 nutritional groups observed for the three vascular compartments were not significant.

Since capillaries are involved in the therapeutic agent distribution, we wondered whether the efficacy of docetaxel was enhanced in tumors with the highest microvascularization. Without nutritional group consideration a significant negative correlation existed between tumor microvascularization at W₀ and the tumor size measured after 6 cycles of chemotherapy ($r^2 = 0,54$, $p < 0.01$, figure 2C), suggesting that tumors with an initially high microvascularization may have a better distribution of anticancer drug.

Epiregulin and amphiregulin, new molecular targets of n-3LCPUFA correlated to docetaxel efficacy

To determine angiogenesis molecular targets regulated by n-3LCPUFA involved in the therapeutic efficacy of docetaxel, we used angiogenesis PCR arrays. The 84 genes of PCR arrays are involved in modulating the biological processes of angiogenesis (growth factors and receptors, adhesion molecules and matrix proteins, proteases and their inhibitors, cytokines and chemokines) (gene list in supplementary data 1). The analysis was performed on tumors without chemotherapeutic treatment (n=4 per nutritional group) and after 6 cycles of chemotherapy (n=7 per nutritional group). No statistical difference between the 2 nutritional groups was observed by PCR arrays on the 4 tumors without chemotherapy. Under

chemotherapy treatment, the fold up or down regulation of genes in n-3LCPUFA group are presented in table 2 (supplementary data 1). The expression of the major proangiogenic factors VEGF (a, b and c) has been studied. Only VEGFb is slightly increased by 1.9 fold in n-3LCPUFA tumors ($p < 0.05$). Epiregulin (EREG), metalloprotease 3 (MMP3) and tumor necrosis factor α (TNF α) were the genes showing differences that were statistically significant and > 2 -fold between the 2 nutritional groups. EREG and MMP3 were down-regulated by 6-fold ($p = 0.0019$) and 3-fold ($p = 0.03$) respectively in n-3LCPUFA group. TNF α was upregulated by 3-fold in n-3LCPUFA ($p = 0.03$). By contrast to EREG (an EGF family member), epithelial growth factor (EGF) did not show significant differences in expression levels between the two nutritional groups. An exhaustive qPCR analysis on a larger number of tumor at W+6 has been performed ($n = 14$ per nutritional group). The exhaustive qPCR analysis on a larger number of tumors did not exhibit any significant differences in VEGFb, MMP3 and TNF α expression between the two nutritional groups at W6. By contrast, on a larger number of tumors, EREG expression remained strongly reduced by ~ 4.5 fold in n-3LCPUFA tumors compared to control diet at W6 ($p < 0.001$). Analysis was also performed on tumors without chemotherapeutic treatment and EREG expression was slightly decreased by 1.6- fold in n-3LCPUFA tumors ($p < 0.05$) (figure 3A).

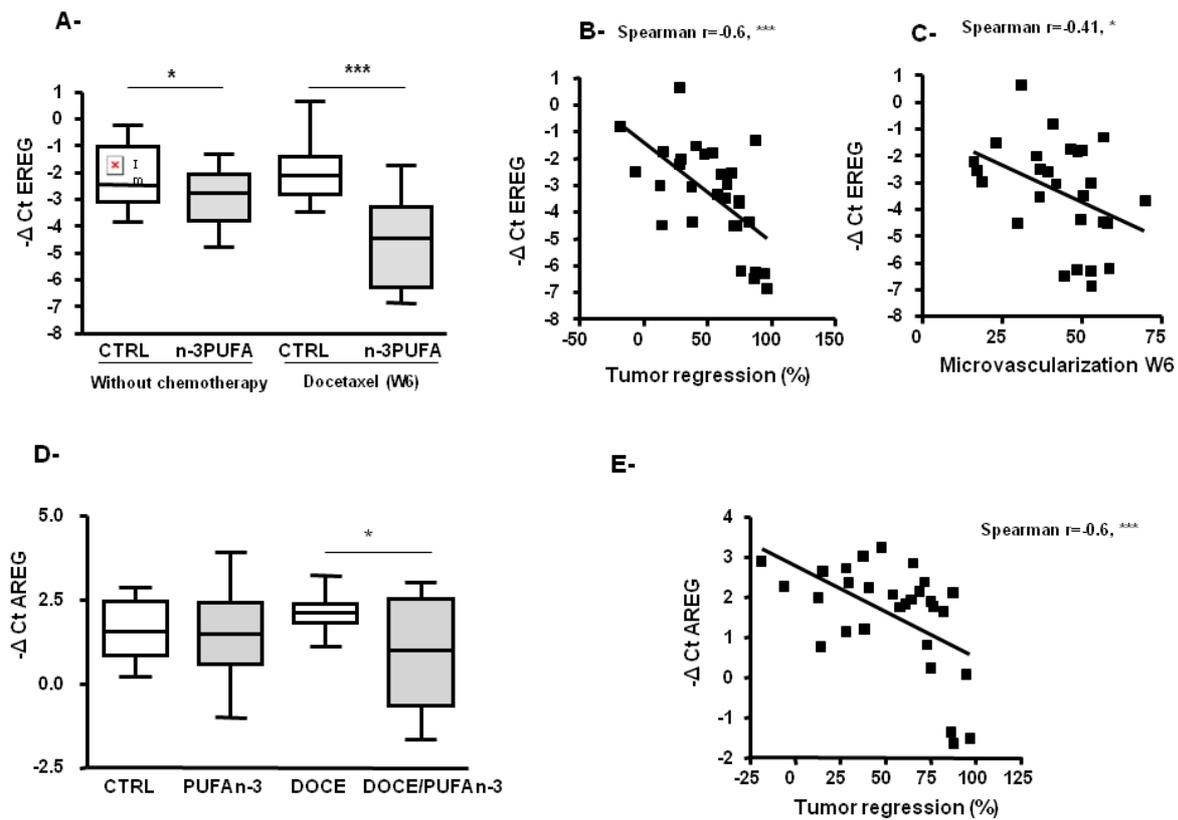


Figure 3: Epiregulin and amphiregulin, new molecular targets of n-3 PUFA correlated to docetaxel efficacy

A and D- Epiregulin (EREG) and amphiregulin (AREG) mRNA level in mammary tumors of two nutritional groups before (W0) and after docetaxel treatment (W6). qPCR results are expressed in $-\Delta Ct$, with lines as median values, $n=14$ per group. $***P<0.001$, Man Whitney. **B and E-** Correlation between the response to chemotherapy (% tumor regression) and EREG (B) or AREG (E) mRNA level at W6. The beginning of chemotherapy was set as the reference and tumor regression was calculated as the percentage of tumor area variation between tumor size at the beginning of docetaxel treatment (W0) and at the end of treatment (W6). Points: individual data (Spearman test, $*** p<0.001$) **C-** Correlations between the microvascularization and EREG mRNA level at W6. Microvascularization was obtained by CEUS. Points: individual data (Spearman test, $* p<0.05$).

Correlation of EREG expression at W6 with tumor regression or vascular parameters has been studied. A significant negative correlation existed between EREG expression and tumor regression between W0 and W6 in tumors in both nutritional groups ($r^2=0.6$ $p<0.001$, figure 3B). Among the vascular parameters measured with CEUS at W6, EREG was only correlated with microvascular compartment (spearman coefficient $r^2=-0.41$, $p<0.05$). Taken together,

these data suggest that tumor EREG expression is associated to a lower microvascularization and poor response to docetaxel.

This study was extended to the other EGF family members. No change of mRNA level expression was detected for heparin-bound EGF (HB-EGF), β cellulline, tumor growth factor α (TGF α) and neuregulin1 (supplementary data 2). Only Amphiregulin (AREG) expression was down regulated in docetaxel/n-3LCPUFA tumors by 2-fold compared to docetaxel-tumors ($p < 0.05$) (Figure 3D). A significant negative correlation existed between AREG expression and tumor regression between W0 and W6 in tumors in both nutritional groups ($r^2 = 0.6$ $p < 0.001$, figure 3E). No correlation was found between the vascular parameters measured and AREG expression.

DHA blocked VEGF-induced expression of EREG in endothelial cells and displayed in vitro antiangiogenic activity

The expression of EREG has been reported to be strongly induced by VEGF in endothelial cells (Wary et al., 2003). The regulation of EREG and AREG expression by VEGF and docetaxel was studied in DHA-supplemented-endothelial cells. VEGF strongly induced the expression of EREG (by ~5-fold, $p < 0.05$ ok) and AREG (by ~4-fold, $p < 0.05$ ok) in endothelial cells (Figure 4A) whereas docetaxel had no effect on EREG and AREG expression. DHA blocked only the VEGF -induced EREG expression and not AREG expression. The study of EREG and AREG expression was extended in the MDA-MB-231 mammary tumor cell line. VEGF and docetaxel did not induce the expression of these 2 EGF family members and no variation of their expression was observed whatever the conditions tested (data not shown).

Endothelial cell proliferation measured by BrdU incorporation was increased by 20% in presence of VEGF during 24h ($p < 0.001$) (Figure 4B) The increased proliferation by VEGF

was significantly reduced by 70 % ($p < 0.01$) in DHA-supplemented cells. In presence of a neutralizing antibody against EREG, the increase of proliferation by VEGF was significantly reduced by 80 % ($p < 0.05$).

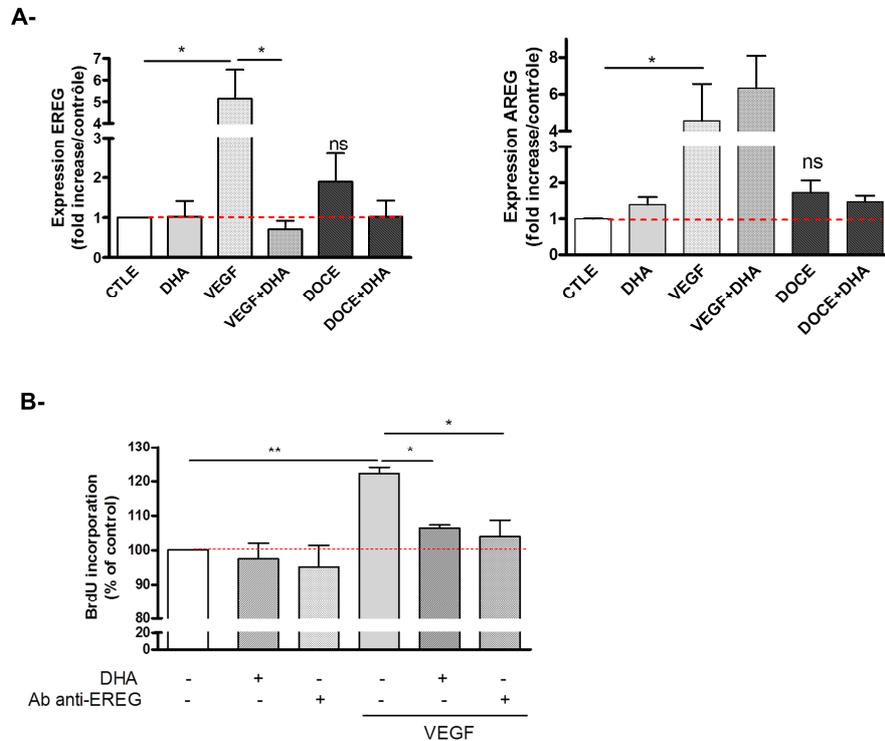


Fig. 4: DHA blocked the VEGF-induced EREG expression in endothelial cells

A- EREG and AREG mRNA expression in endothelial cells. Cells were treated DHA (30 μ M) during 24h and VEGF (20 ng/ml) and docetaxel (1nM) were added for the 2 last hours. EREG mRNA amount was expressed, relatively to HPRT1 mRNA expression and control condition, as relative quantity $Q = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (mean values \pm SEM, $n=3$, mann whitney) **B-** BrdU incorporation in endothelial cells. HUVECs treated with DHA (30 μ M), VEGF (20ng/mL), antiEREg (10 μ g/ml) and BrDu (100 μ M) for 24h. (mean values \pm SEM, $n=3$, man-whitney)

The anti-angiogenic potential of DHA was evaluated using conventional *in vitro* pseudo-capillaries formation assay. Endothelial cells grown on Matrigel are able to form pseudo-capillaries spontaneously. The capacity of HUVEC to elaborate pseudo-capillaries on Matrigel was evaluated 4 hours after cell-seeding in DHA-supplemented or control cells. As expected, VEGF stimulates the formation of pseudo-capillaries by \sim 4-fold in control cells. By contrast, VEGF was not able to induce pseudo-capillary formation in DHA-supplemented HUVEC. Representative images on pseudocapillary network in control- and DHA-cells are shown in Figure 5.

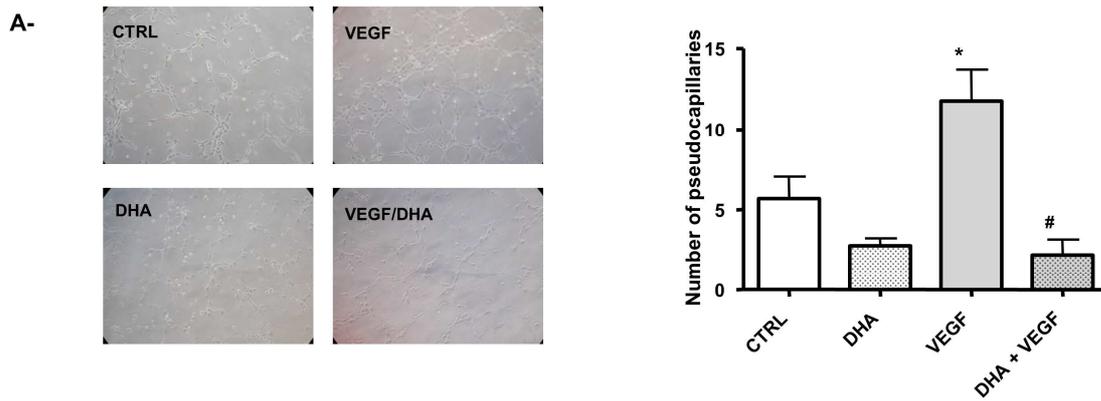


Fig. 5: DHA blocked the VEGF-induced HUVEC pseudo-capillary formation Pseudo-capillary formation. . HUVECs were pretreated with vehicle or DHA (5 μ M) for 5 days and then reseeded in BD Matrigel matrix. Pseudo-capillaries structures were photographed (5 field) and then counted. Representative images at 10 \times magnification of pseudocapillary network in control cells or after VEGF and DHA treatment

Discussion

In this study, we used an original contrast-enhanced ultrasound method to access to the quantification of large, medium and small vessels. This method allowed to demonstrate that n-3LCPUFA are able to induce a remodelage of vascular architecture in favor of microvascularization. This effect was particularly clear after 2 weeks of docetaxel chemotherapy. At this time, an enrichment in larger vessels was observed in docetaxel-treated tumors of rats fed with control nutritional group. In human breast carcinomas, docetaxel chemotherapy induced a similar sequential effect, with vessel enlargement after two cycles of docetaxel treatment (Maheo et al., 2012). The vessel enlargement can be attributed to a vasodilator effect of docetaxel on tumor vessels, as previously mentioned by us and others (Griffon-Etienne et al., 1999) (Giustiniani et al., 2009; Su et al., 2002) (Kornfeld et al., 2012). Interestingly, in n-3LCPUFA nutritional group treated by docetaxel, the vessel enlargement induced during docetaxel treatment was not detected in mammary tumors. As previously described, the effect of n-3LCPUFA can be attributed to a decreased of endothelial NO synthase activity and subsequently NO production that is known for its vasodilator properties. (Kornfeld et al., 2012).

Inadequate drug delivery and hypoxia are the major causes of drug resistance. Jain et al brought several experimental evidences that the “quality” of tumor vascularization is more important than the “quantity”. It was proposed by Jain et al that agents could transiently normalize the abnormal structure and function of tumor vessels, so they provide improved blood flow and more efficient local delivery of oxygen and therapeutic agents to tumor cells, thereby increasing their sensitivity to chemotherapy (Fukumura & Jain, 2007; Jain, 2005). VEGF and its mediator NO are the key mediator of angiogenesis in cancer and they increase both vessel density, vessel diameter and vessel hyperpermeability. Vessels can be normalized with restoring nitric oxide gradients (Fukumura et al., 1997). In this study, tumor microvascularization remained preponderant in n-3LCPUFA along docetaxel treatment and is correlated to an increased response to docetaxel chemotherapy. (Kashiwagi et al., 2008; Stylianopoulos & Jain, 2013) It is well established that anti-VEGF agents decrease vascular density and vessel diameter and reverse functional abnormalities in tumor vessels. In turn, the anti-VEGF are able to improve tumor vessel perfusion and chemotherapy efficacy (Jain, 2005). Some studies have reported a reduced quantity of vessels in n-3LCPUFA-enriched tumors (Colas et al., 2006; Rose & Connolly, 1999) Concerning the quality of tumor vascularization, a decrease in interstitial fluid pressure and an improvement of tumor oxygenation were reported in mammary tumors of rats fed with n-3LCPUFA diet (Kornfeld et al., 2012). Taken together, these observations are in favor of tumor vascular normalization by n-3LCPUFA diet. The use of n-3LCPUFA as an adjuvant to chemotherapy could be a complementary clinical strategy to improve drug delivery in mammary tumors and decrease anticancer drug resistance.

Among molecular targets of angiogenesis analyzed, EREG, a member of the EGF family, has been identified to be strongly reduced in docetaxel-treated tumors in n-3LCPUFA nutritional group. Its weak expression is correlated to a better response to docetaxel

chemotherapy. Among EGF family members, only EREG and AREG in the lesser extent were down-regulated by n-3LCPUFA in tumors. The oncogenic activity of AREG and EREG has already been described in the most common human epithelial malignancies, such as lung, breast, colorectal, and prostate carcinomas (Riese & Cullum, 2014) (Busser et al., 2011). Various studies have highlighted the functional role of AREG and EREG in several aspects of tumorigenesis, including self-sufficiency in generating growth signals, metastasis, angiogenesis, and resistance to various chemotherapeutic agents (Riese & Cullum, 2014) (Busser et al., 2011; Farooqui et al., 2015) (Eckstein et al., 2008). These 2 members have also a clinical relevance since their mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer (Jacobs et al., 2009).

The *in vivo* data showing that EREG was correlated with microvascular compartment in mammary tumors data suggested a potential role of EREG in vascular effect of n-3LCPUFA. In endothelial cells, the expression of the both members is strongly induced by VEGF, but only the induced EREG expression is down regulated by DHA supplementation. The neutralization of EREG by antibody decreased the proliferative effect of VEGF. These data indicate that EREG which acts as an autocrine/paracrine factor can mediate the proliferative activity of VEGF. The *in vitro studies* were also extended to mammary tumor cell lines cells and the expression of EREG or AREG remained unchanged. These data suggest that EREG regulation by n-3LCPUFA observed in mammary tumors may affect only the endothelial cells and not the cancer cells.

A wealth of functional data indicates that EREG plays important roles in angiogenesis and vascular remodeling, particularly during inflammation (Riese & Cullum, 2014). Gupta et al. showed that EREG, together with the other three genes (cyclooxygenase COX2, and the matrix metalloproteinases 1 and 2) have reported to facilitate the assembly of new tumor blood vessels in mammary tumors and mediates breast cancer metastasis to the lungs (Minn et

al., 2005) (Gupta et al., 2007). In the combined knockdown tumours, the blood vessels have smaller lumens and the vascular permeability was attenuated. In addition to EREG, we cannot exclude a potential role of COX2 in n-3LCPUFA vascular effects. Indeed, COX2 is known to be down-regulated by n-3LCPUFA (mRNA and protein expression) (Hamid et al., 1999). (Rose & Connolly, 1999; Szymczak et al., 2008). In this study, we quantified the expression of COX2 at the mRNA level and no difference was observed in mammary tumors between both nutritional groups. The lack of Cox2 regulation in this study can not exclude the involvement of a decrease of pro-angiogenic 6-series prostaglandins produced by COX2 from arachidonic acid. Indeed, as previously described, fatty acids composition of tumor phospholipids showed that n-3LCPUFA enrichment is counterbalanced by a decrease of n-6 PUFA especially arachidonic acid (Kornfeld et al., 2012).

In conclusion, this study reports that n-3 LCPUFA displayed an effect of vascular normalization in mammary tumors. The down-regulation by n-3LCPUFA of two new targets with clinical relevance have been identified and are known to be involved both in cancer progression, resistance to cancer treatments and angiogenesis. Despite the major clinical advances provided by cytotoxic, hormonal and targeted therapies, the median survival after diagnosis of metastatic breast cancer with visceral organ invasion remains less than 2 years. n-3LCPUFA could be a complementary clinical strategy to improve drug delivery in mammary tumors and decrease anticancer drug resistance. The preclinical data reported here and previously strengthen the findings of two published Phase II trial using n-3LCPUFA for patients treated for breast and lung cancer (Bougnoux et al., ; Murphy et al.) and reinforce the rationale for a phase III clinical studies testing n-3LCPUFA supplementation during conventional cancer treatment.

REFERENCES

- Biondo, P.D., Brindley, D.N., Sawyer, M.B. & Field, C.J. (2008). The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem*, **19**, 787-96.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C. & Chevalier, S. (2011). Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res*, **49**, 76-86.
- Broillet, A., Hantson, J., Ruegg, C., Messenger, T. & Schneider, M. (2005). Assessment of microvascular perfusion changes in a rat breast tumor model using SonoVue to monitor the effects of different anti-angiogenic therapies. *Acad Radiol*, **12 Suppl 1**, S28-33.
- Busser, B., Sancey, L., Brambilla, E., Coll, J.L. & Hurbin, A. (2011). The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1816**, 119-31.
- Calviello, G., Serini, S., Piccioni, E. & Pessina, G. (2009). Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutr Cancer*, **61**, 287-301.
- Colas, S., Maheo, K., Denis, F., Goupille, C., Hoinard, C., Champeroux, P., Tranquart, F. & Bougnoux, P. (2006). Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin Cancer Res*, **12**, 5879-86.
- Eckstein, N., Servan, K., Girard, L., Cai, D., von Jonquieres, G., Jaehde, U., Kassack, M.U., Gazdar, A.F., Minna, J.D. & Royer, H.D. (2008). Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem*, **283**, 739-50.
- Farooqui, M., Bohrer, L.R., Brady, N.J., Chuntova, P., Kemp, S.E., Wardwell, C.T., Nelson, A.C. & Schwertfeger, K.L. (2015). Epieregulin contributes to breast tumorigenesis through regulating matrix metalloproteinase 1 and promoting cell survival. *Mol Cancer*, **14**, 138.
- Fukumura, D. & Jain, R.K. (2007). Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res*, **74**, 72-84.
- Fukumura, D., Yuan, F., Endo, M. & Jain, R.K. (1997). Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol*, **150**, 713-25.
- Giustiniani, J., Couloubaly, S., Baillet, A., Pourci, M.L., Cantaloube, I., Fourniat, C., Paul, J.L. & Pous, C. (2009). Basal endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation on Ser(1177) occurs in a stable microtubule- and tubulin acetylation-dependent manner. *Exp Cell Res*, **315**, 3509-20.
- Griffon-Etienne, G., Boucher, Y., Brekken, C., Suit, H.D. & Jain, R.K. (1999). Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res*, **59**, 3776-82.
- Gupta, G.P., Nguyen, D.X., Chiang, A.C., Bos, P.D., Kim, J.Y., Nadal, C., Gomis, R.R., Manova-Todorova, K. & Massague, J. (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*, **446**, 765-70.

- Hamid, R., Singh, J., Reddy, B.S. & Cohen, L.A. (1999). Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int J Oncol*, **14**, 523-8.
- Jacobs, B., De Roock, W., Piessevaux, H., Van Oirbeek, R., Biesmans, B., De Schutter, J., Fieuws, S., Vandesompele, J., Peeters, M., Van Laethem, J.L., Humblet, Y., Penault-Llorca, F., De Hertogh, G., Laurent-Puig, P., Van Cutsem, E. & Tejpar, S. (2009). Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, **27**, 5068-74.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, **307**, 58-62.
- Kashiwagi, S., Tsukada, K., Xu, L., Miyazaki, J., Kozin, S.V., Tyrrell, J.A., Sessa, W.C., Gerweck, L.E., Jain, R.K. & Fukumura, D. (2008). Perivascular nitric oxide gradients normalize tumor vasculature. *Nat Med*, **14**, 255-7.
- Kornfeld, S., Goupille, C., Vibet, S., Chevalier, S., Pinet, A., Lebeau, J., Tranquart, F., Bougnoux, P., Martel, E., Maurin, A., Richard, S., Champeroux, P. & Maheo, K. (2012). Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance. *Carcinogenesis*, **33**, 260-267.
- Maheo, K., Chevalier, S., Vibet, S., Bougnoux, P., Richard, S., Serriere, S., Bleuzen, A., Tranquart, F. & Goupille, C. (2012). Non-invasive quantification of tumor vascular architecture during docetaxel-chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, **134**, 1013-25.
- Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L. & Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, **436**, 518-24.
- Murphy, R.A., Mourtzakis, M., Chu, Q.S., Baracos, V.E., Reiman, T. & Mazurak, V.C. (2011). Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*.
- Riese, D.J., 2nd & Cullum, R.L. (2014). Epiregulin: roles in normal physiology and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, **28**, 49-56.
- Rose, D.P. & Connolly, J.M. (1999). Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *Int J Oncol*, **15**, 1011-5.
- Stylianopoulos, T. & Jain, R.K. (2013). Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 18632-7.
- Su, Y., Zharikov, S.I. & Block, E.R. (2002). Microtubule-active agents modify nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **282**, L1183-9.
- Szymczak, M., Murray, M. & Petrovic, N. (2008). Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood*, **111**, 3514-21.
- Tong, R.T., Boucher, Y., Kozin, S.V., Winkler, F., Hicklin, D.J. & Jain, R.K. (2004). 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*, **64**, 3731-6.
- Wary, K.K., Thakker, G.D., Humtsoe, J.O. & Yang, J. (2003). Analysis of VEGF-responsive genes involved in the activation of endothelial cells. *Mol Cancer*, **2**, 25.

Zhang, G., Panigrahy, D., Mahakian, L.M., Yang, J., Liu, J.Y., Stephen Lee, K.S., Wettersten, H.I., Ulu, A., Hu, X., Tam, S., Hwang, S.H., Ingham, E.S., Kieran, M.W., Weiss, R.H., Ferrara, K.W. & Hammock, B.D. (2013). Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 6530-5.

Funding :

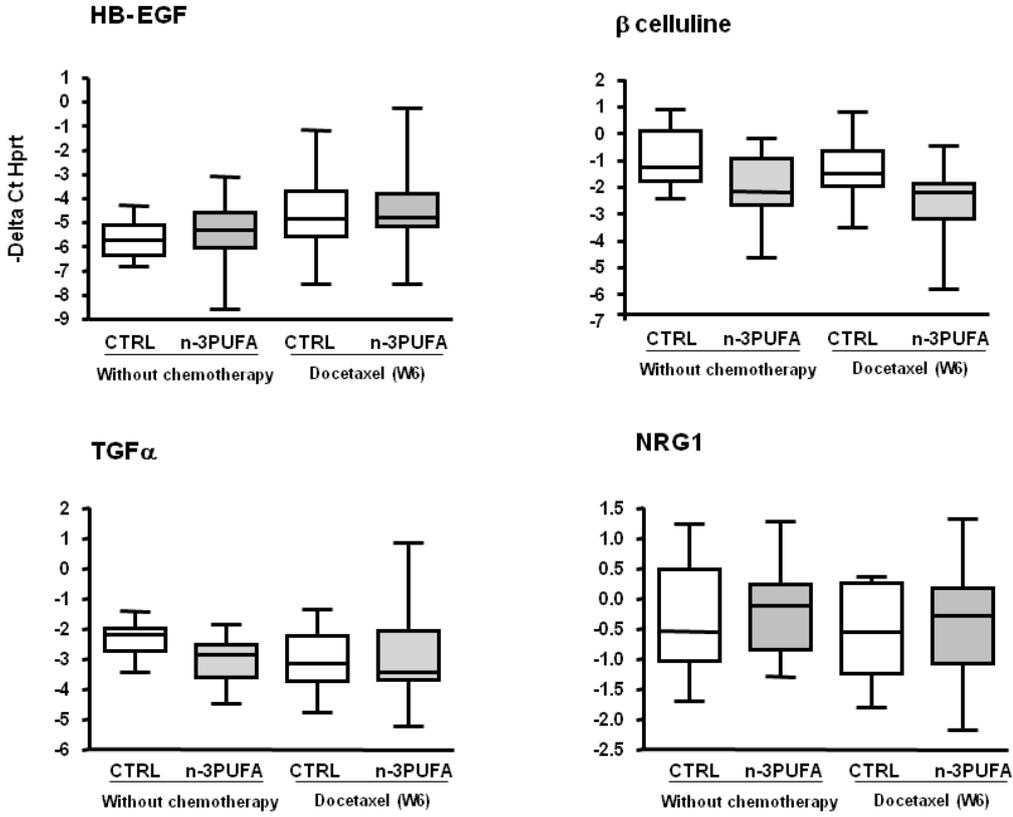
This work was supported by grants from « Ligue Nationale contre le Cancer » (Comités 37, 41 and 49) « Cancéropôle Grand Ouest », « Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale » (Inserm), « Fonds Européens de Développement Régional » (FEDER), the Région Centre and the « Association Nationale de la Recherche Technique » (ANRT) (convention CIFRE of Sophie Kornfeld).. Lucie Chauvin and Sophie Vibet were 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.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data 1: Gene list of angiogenesis PCR arrays and fold-up or down regulation of gene expression in n-3LCPUFA tumors compared to control tumors at W6. (n=7/group). If the fold change is positive, it means up-regulation. If the fold change is negative, it means down-regulation.

Symbol	Gene name	Fold Up- or Down-Regulation	t-TEST p value
Angpt2	Angiopoietin 2	2,16	0,3756
Akt1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	1,78	0,0289
Angpt1	Angiopoietin 1	-1,18	0,5561
Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	1,69	0,5352
Bai1_predicted	Similar to Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 precursor (LOC362931), mRNA	1,90	0,0404
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-1,02	0,9799
Cdh5_predicted	Cadherin 5 (predicted)	1,52	0,4340
Col18a1	Collagen, type XVIII, alpha 1	-1,26	0,6348
Col4a3	Collagen, type IV, alpha 3	-3,53	0,0819
Ctgf	Connective tissue growth factor	1,07	0,8843
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1,24	0,7312
Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1,81	0,5694
Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	1,15	0,9043
Ecgf1	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	1,15	0,5416
Edg1	Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	1,40	0,4984
Efna1	Ephrin A1	1,60	0,5404
Efna2	Ephrin A2	1,92	0,0646
Efna5	Ephrin A5	1,30	0,3729
Egf	Epidermal growth factor	2,06	0,0987
Eng	Endoglin	1,66	0,0944
Epas1	Endothelial PAS domain protein 1	1,80	0,1275
Ereg	Epiregulin	-6,18	0,0019
F2	Coagulation factor 2	-1,10	0,8435
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	-2,14	0,4921
Fgf16	Fibroblast growth factor 16	1,89	0,3439
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	1,72	0,1996
Fgf6	Fibroblast growth factor 6	1,59	0,0520
Fgfr3	Fibroblast growth factor receptor 3	1,26	0,7778
Figf	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	-1,15	0,8079
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	1,22	0,8092
Fn1	Fibronectin 1	-1,12	0,7910
Fzd5	Frizzled homolog 5 (Drosophila)	1,20	0,6217
Hgf	Hepatocyte growth factor	1,00	0,9964
Hif1a	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	1,01	0,9474
Id1	Inhibitor of DNA binding 1, helix-loop-helix protein (splice variation)	-1,06	0,9043
Id3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	1,65	0,3728
Ifna1	Rattus norvegicus similar to Interferon alpha-1 precursor (LOC298210)	1,59	0,0543
Ifnb1	Interferon, beta 1	1,59	0,0520
Ifng	Interferon gamma	1,56	0,3019
Igf1	Insulin-like growth factor 1	1,01	0,9931
Il1b	Interleukin 1 beta	1,16	0,7178
Il6	Interleukin 6	-2,12	0,2142
Itga5	Integrin alpha 5	1,39	0,1351
Itgav_predicted	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51) (predicted)	-1,20	0,4721
Itgb3	Integrin beta 3	1,91	0,0933
Jag1	Jagged 1	1,05	0,8681
Kdr	Kinase insert domain protein receptor	1,42	0,4083
Lama5	Laminin, alpha 5	1,19	0,7167
Lect1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	1,08	0,8598
Lep	Leptin	1,08	0,9388
Mapk14	Mitogen activated protein kinase 14	1,02	0,9774
Mdk	Midkine	1,31	0,5223
Mmp19_predicted	Matrix metalloproteinase 19 (predicted)	-1,19	0,5645
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	-1,00	0,9944
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3	-3,38	0,0362
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	2,77	0,1003
Npr1	Natriuretic peptide receptor 1	1,28	0,4819
Nrp1	Neuropilin 1	1,18	0,6640
Nrp2	Neuropilin 2	1,72	0,1285
Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha	2,02	0,0734
Pdgfb	Platelet derived growth factor, B polypeptide	1,18	0,9176
Pecam	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	1,79	0,1559
Pgf	Placental growth factor	-1,03	0,9323
Plau	Plasminogen activator, urokinase	1,18	0,7891
Plg	Plasminogen	-1,49	0,4100
Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-1,08	0,8337
Serpnb5	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 5	-1,63	0,2476
Serpfn1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1	1,17	0,8138
Sphk1	Sphingosine kinase 1	2,12	0,0582
Tbx4_predicted	T-box 4 (predicted)	-1,47	0,2583
Tek	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase	1,60	0,3283

Supplementary Data 2 : heparin-bound EGF, β celluline, tumor growth factor α and neuregulin1 mRNA level in mammary tumors of two nutritional groups before (W0) and after docetaxel treatment (W6). qPCR results are expressed in $-\Delta Ct$, with lines as median values, n=14 per nutritional group



Chapitre 3. Discussion et perspectives

La distribution inadéquate des agents chimiothérapeutiques est une cause de résistance aux traitements, et les stratégies favorisant la distribution des molécules dans les tumeurs solides présentent un intérêt dans le traitement des cancers (Jain & Stylianopoulos, 2010). Le réseau vasculaire tumoral est décrit comme anarchique avec une architecture de l'arbre vasculaire perturbée, des vaisseaux dilatés et hyperperméables ce qui conduit à une fonctionnalité diminuée du réseau vasculaire. Les thérapies antiangiogéniques peuvent normaliser le réseau vasculaire tumoral ce qui améliore la « qualité » vasculaire et favorise la délivrance intra-tumorale de molécules (Tong *et al*, 2004; Kornfeld *et al*, 2012). La normalisation vasculaire est caractérisée par (Goel *et al*, 2011):

- i) Une diminution de la perméabilité vasculaire.
- ii) Une diminution de l'hypoxie tumorale.
- iii) Une diminution de la pression interstitielle.
- iv) Une meilleure architecture vasculaire.

Dans l'étude de Kornfeld *et al*. et dans l'étude présentée dans cette thèse, le DHA ou un régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC agissent sur les différents paramètres de la normalisation. Ainsi, le régime nutritionnel enrichi en AGPIIn-3LC diminue l'expression d'une enzyme induite par l'hypoxie (anhydrase carbonique IX) dans les tumeurs mammaires sous docétaxel, la pression intra-tumorale du liquide interstitiel est rapidement et durablement réduite dans le groupe AGPIIn-3LC après une injection de docétaxel, et le DHA diminue la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales HUVECs (Kornfeld *et al*, 2012). Dans l'étude présentée dans cette thèse, il est montré que les AGPIIn-3LC modifient l'architecture vasculaire en faveur de la micro-circulation.

Collectivement, ces données suggèrent fortement que les AGPIIn-3LC apportés par l'alimentation normalisent la structure des vaisseaux tumoraux. Il aurait été intéressant de compléter ces travaux en approfondissant l'étude de l'architecture des vaisseaux par immunohistologie, afin d'évaluer le recouvrement vasculaire par les péricytes et la membrane basale, décrit pour être plus continu et structuré après une normalisation vasculaire.

Sur le plan mécanistique, il a été montré que le docétaxel induit l'activation de la NO synthase endothéliale dans les tumeurs mammaires et dans les cellules endothéliales

(Kornfeld *et al*, 2012). Cette voie de signalisation mène à la production de NO, médiateur impliqué dans la dilation et la perméabilité des vaisseaux (Morbidelli *et al*, 2003). Après deux semaines de chimiothérapie, une forte augmentation de la proportion des gros vaisseaux est observée. Plus qu'une augmentation du nombre de ces vaisseaux, notre hypothèse est que nous mesurons plutôt une vasodilatation des vaisseaux. En effet, l'activation de la NO synthase endothéliale par le docétaxel pourrait expliquer son effet vasodilatateur observé à la deuxième semaine de chimiothérapie chez le rat (figure 63A) ainsi qu'après deux cycles de chimiothérapie dans des tumeurs mammaires humaines (Mahéo *et al*, 2012). En bloquant l'activation de la NO synthase endothéliale, les AGPIn-3LC limiteraient la vasodilatation induite par le docétaxel et permettraient de conserver une micro-vascularisation dominante.

L'étude de l'expression génique des tumeurs mammaires chimioinduites chez le rat nous a permis d'identifier deux cibles moléculaires régulées par les AGPIn-3LC, l'épiréguline et l'amphiréguline. Seule l'expression de l'épiréguline est associée à la micro-circulation. Plusieurs études fonctionnelles associent l'épiréguline à l'angiogénèse et au remodelage vasculaire et, plus particulièrement, pendant l'inflammation (Riese & Cullum, 2014).

Epiréguline et cellules endothéliales

In vitro, la régulation de l'expression des ARNm de l'épiréguline par le DHA est retrouvée dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. Dans ce modèle cellulaire, le VEGF est connu pour activer les signalisations PI3K/Akt, PLC γ , Raf/MEK/ERK1/2 et Src (Olsson *et al*, 2006). Suivant les modèles cellulaires, la transcription de l'épiréguline a été montrée sous la dépendance des voies MAPK ou PI3K/Akt (Baba *et al*, 2000; Cho *et al*, 2008b; Zhang *et al*, 2008). Il a aussi été montré que l'inhibition des PKCs bloque l'activation de ERK induite par le VEGF dans les cellules endothéliales (Wu *et al*, 2003; Takahashi *et al*, 1999).

Une expérience préliminaire montre que l'enzastaurine bloque l'expression de l'épiréguline induite par le VEGF dans les HUVECs (n=1, non montré). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les AGPIn-3LC, en bloquant la signalisation PKC/ERK1/2 et Akt, inhibent l'expression de ce gène induit par le VEGF (**figure 70**).

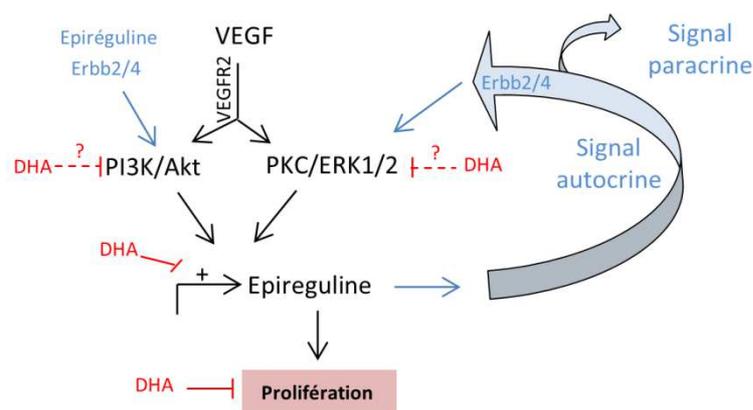


Figure 71. Modèle d'action de l'épiréguiline sur les cellules endothéliales.

Modèle hypothétique réalisé d'après les données *in vitro* obtenues sur les HUVECs. Nous avons montré que le DHA bloque la transcription de l'épiréguiline induite par le VEGF et que ce facteur est impliqué dans la prolifération des HUVECs en réponse au VEGF.

Dans le modèle de cellules endothéliales *in vitro*, nous montrons que le DHA ainsi que la neutralisation de l'épiréguiline, bloque la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF. Ces données montrent que l'action autocrine ou paracrine de l'épiréguiline est impliquée dans la prolifération cellulaire stimulée par le VEGF. En effet, les HUVECs expriment les récepteurs ErbB2, ErbB3 et ERbb4 (Amin *et al*, 2006). Le DHA diminue la transcription de l'épiréguiline mais des mesures de prolifération avec un co-traitement anticorps neutralisant anti-épiréguiline plus DHA permettraient de suggérer un mécanisme d'action commun.

In vitro, la modélisation de la vascularisation tumorale est incomplète et peut paraître encore insatisfaisante. Cependant, plusieurs études fonctionnelles ont été mises en place avec l'étude de la perméabilité d'une monocouche endothéliale, la prolifération ou la formation de pseudocapillaires avec un modèle cellulaire de cellules endothéliales humaine d'origine ombilicale (HUVECs). L'utilisation de cellules endothéliales dérivées de tumeurs mammaires serait un modèle plus pertinent pour étudier l'effet du DHA *in vitro*. En effet, ces cellules présentent des caractéristiques différentes comparées aux cellules endothéliales ayant pour origine un environnement non tumoral (e.g. résistance à l'apoptose, surexpression du récepteur au VEGF et à l'EGF) (Hida *et al*, 2011; Amin *et al*, 2006). De plus, suite à l'identification d'une cible moléculaire du DHA telle que l'épiréguiline, il conviendrait d'étudier son rôle dans les processus angiogéniques induits par le VEGF (e.g. formation de pseudocapillaires, migration des cellules endothéliales, perméabilité).

L'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales par les AGPIIn-3LC pourrait contribuer à la normalisation vasculaire observée dans les tumeurs mammaires. En inhibant l'expression de facteurs solubles, les AGPIIn-3LC pourraient atténuer le signal pro-angiogénique au niveau de la tumeur. Cependant, l'expression de l'épiréguline dans les tumeurs mammaires n'est que faiblement corrélée à la micro-circulation après 6 cycles de chimiothérapie. Le remodelage de l'architecture vasculaire des tumeurs mammaires par AGPIIn-3LC résulte probablement d'une combinaison de plusieurs effets moléculaires dans le contexte du microenvironnement tumoral. Par exemple, les cellules du stroma tumoral (fibroblastes et cellules immunitaires) jouent aussi un rôle important dans l'angiogénèse et l'inflammation (Quail & Joyce, 2013) et sont des cibles cellulaires potentielles des AGPIIn-3LC.

Régulation de l'expression génique de l'épiréguline et de l'amphiréguline par les AGPIIn-3

Une hypothèse, impliquant les eicosanoïdes dans la régulation de l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les tumeurs mammaires, semble particulièrement pertinente au vu de la littérature.

COX2 et les eicosanoïdes dérivés des AGPIIn-6 semblent particulièrement impliqués dans le signal pro-angiogénique et sa persistance (Greene *et al*, 2011; Hugo *et al*, 2015). La prostaglandine E2, eicosanoïde dérivé de l'acide arachidonique (AGPIIn-6), est un facteur pro-inflammatoire impliqué dans le signal angiogénique et la vasodilatation (Finetti *et al*, 2009; Ricciotti & FitzGerald, 2011). Plusieurs études montrent que la prostaglandine E2 induit l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline (Shao *et al*, 2003; Oshima *et al*, 2011), notamment dans un modèle de cellules murines épithéliales mammaires (Chang *et al*, 2005). De plus, un ensemble de données suggère que les signalisations EGFR et COX2 sont interconnectées (Dannenberg *et al*, 2005).

Les AGPIIn-3LC sont connus pour diminuer la production de PGE2 et/ou l'activité de COX2 (Sawyer & Field, 2010; Szymczak *et al*, 2008). Ainsi, on peut raisonnablement imaginer que la modification du métabolisme des AGPI soit impliquée dans la régulation de l'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans les tumeurs mammaires.

Epiréguline et amphiréguline dans le contexte du microenvironnement tumoral

L'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline est fortement corrélée à la régression des tumeurs mammaires sous docétaxel. Plusieurs études soulignent le rôle fonctionnel de l'épiréguline et de l'amphiréguline dans la tumorigénèse et leurs implications dans la prolifération cellulaire, les métastases et la résistance aux thérapies (Busser *et al*, 2011; Riese & Cullum, 2014).

Nous avons étudié leur implication dans la sensibilisation des cellules tumorales mammaires au docétaxel. L'hypothèse de travail était que l'épiréguline et l'amphiréguline seraient impliquées dans la résistance des cellules tumorales au docétaxel et que les AGPIn-3LC augmenteraient la sensibilité des tumeurs mammaires au docétaxel en inhibant une signalisation autocrine EGFR/ERK1/2/Epiréguline-Amphiréguline. Ni le docétaxel ni le DHA ne régule l'expression de ces deux facteurs dans les deux lignées tumorales mammaires étudiées (MDA-MB-231 et MDA-MB-468). La neutralisation de l'épiréguline et de l'amphiréguline par des anticorps ne sensibilise pas les lignées tumorales MDA-MB-231 et MDA-MB-468 au docétaxel. A l'état basal, ces facteurs semblent être peu synthétisés par les cellules tumorales car les anticorps neutralisants n'inhibent que ~10% de la prolifération cellulaire (données non montrées). Il aurait été intéressant d'étudier l'effet d'un apport exogène d'épiréguline et/ou d'amphiréguline sur la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires au docétaxel. Actuellement, les données *in vitro* sur les cellules cancéreuses seules ne permettent pas d'exclure l'implication de ces deux facteurs dans la sensibilisation au docétaxel des cellules tumorales au sein des tumeurs mammaires par les AGPIn-3LC. L'épiréguline et l'amphiréguline pourraient être produits par le microenvironnement tumoral et agir comme facteurs paracrines pour favoriser la prolifération et la survie des cellules tumorales.

En effet, les cellules du stroma tumoral jouent un rôle important dans la progression tumorale (Quail & Joyce, 2013). Les tumeurs sont composées de plusieurs types cellulaires (par ordre quantitatif) : cellules tumorales, fibroblastes associés aux tumeurs, cellules immunitaires, cellules endothéliales.

Les fibroblastes ont été identifiés comme étant responsables de la production de l'épiréguline dans des néoplasmes colorectaux (Neufert *et al*, 2013) et de VEGF dans des tumeurs autochtones murines (Fukumura *et al*, 2001). De plus, il a été montré que l'amphiréguline produit par des fibroblastes joue un rôle essentiel dans la croissance tumorale en exerçant un effet autocrine sur les fibroblastes (prolifération, recrutement, activation) et un

effet paracrine en favorisant la survie des cellules tumorales mammaires (Rajaram *et al*, 2013).

D'après les données de la littérature, les fibroblastes associés aux tumeurs seraient un type cellulaire particulièrement intéressant à étudier dans le contexte de la sensibilisation des tumeurs mammaires aux chimiothérapies. En effet, il a été suggéré que les fibroblastes contribuent à la chimiorésistance des cancers du sein (Loeffler *et al*, 2006; Andre *et al*, 2010). Le ciblage spécifique des fibroblastes associés à la tumeur augmente l'efficacité de la chimiothérapie dans un modèle de xénogreffes de cellules tumorales mammaires résistantes et améliore la délivrance intra-tumorale de la chimiothérapie (Loeffler *et al*, 2006). De plus, après un traitement de docétaxel, les cellules cancéreuses mammaires cultivées en présence de fibroblastes montrent des capacités invasives et prolifératives augmentées (Rong *et al*, 2013).

Perspectives générales et conclusion

Améliorer l'efficacité des agents cytotoxiques, sans majorer leurs effets secondaires, constitue un objectif prioritaire dans le traitement du cancer du sein, afin d'améliorer la survie et de préserver la qualité de vie des patientes. Collectivement, les données du laboratoire suggèrent que les AGPIIn-3LC possèdent ce potentiel thérapeutique, sans toxicité additionnelle, puisqu'ils augmentent l'efficacité des chimiothérapies sans majorer les effets secondaires délétères (Colas *et al*, 2004, 2006; Bougnoux *et al*, 2009; Kornfeld *et al*, 2012). Deux études cliniques de phase II menées sur des patientes atteintes de cancer du sein métastatique et chez des patients souffrant de cancer pulmonaire avancé (Bougnoux *et al*, 2009; Murphy *et al*, 2011) ont confirmé l'effet chimiosensibilisant des AGPIIn-3LC sur les tumeurs, et ce sans majorer les effets secondaires liés à la toxicité des chimiothérapies. Ainsi, l'environnement lipidique, et pas seulement la nature des altérations génomiques de la tumeur, contribue à la sensibilité de celle-ci aux agents anticancéreux utilisés (Bougnoux *et al*, 2010a). Alors que les mécanismes moléculaires de chimiosensibilisation des AGPIIn-3LC impliquaient le stress oxydant pour des agents thérapeutiques générant un stress oxydatif (chimiothérapie par anthracyclines ou radiothérapie), peu de données étaient disponibles en ce qui concerne les agents tubulo affins. L'objectif de mes travaux de thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels les AGPIIn-3LC augmentent l'efficacité du docétaxel, afin d'apporter des arguments complémentaires et appuyer leur utilisation clinique en tant que molécules adjuvantes aux principaux agents anticancéreux utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein.

Nous avons identifié un effet direct des AGPIIn-3LC sur les cellules tumorales mammaires au cours d'une chimiothérapie avec du docétaxel. L'incorporation des AGPIIn-3LC dans les phospholipides membranaires apparaît comme un mécanisme majeur pour bloquer les signalisations PKC ϵ - δ /ERK1/2 et Akt activées par un traitement docétaxel. L'inhibition de ces signalisations, qui sont impliquées dans la prolifération et la résistance aux traitements, est associée à une augmentation de l'efficacité du docétaxel.

Plusieurs essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité des taxanes en combinaison avec des inhibiteurs de voies de signalisation comme ERK1/2 et PI3K/Akt. Alors que l'utilisation individuelle d'inhibiteur fait apparaître des mécanismes d'échappement (Carracedo *et al*, 2008; Hoeflich *et al*, 2009; Serra *et al*, 2011), la combinaison des inhibiteurs

augmente le risque d'additionner les toxicités individuelles des inhibiteurs (Shimizu *et al*, 2012; Saini *et al*, 2013). Les AGPIn-3LC exercent une action pléiotrope en tant que modulateurs de la signalisation intracellulaire et permettraient de limiter les mécanismes de compensation et/ou d'échappement souvent rapportés lors de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'une kinase effectrice. De ce fait, ils présentent des avantages certains comparés à des inhibiteurs ciblés de transduction du signal. L'absence de toxicité et l'inhibition combinée des signalisations PKC/ERK1/2 et Akt par les AGPIn-3LC représenteraient de réels atouts.

Une supplémentation nutritionnelle en AGPIn-3 ne majore pas les effets secondaires liés aux chimiothérapies conventionnelles (Bougnoux *et al*, 2009; Murphy *et al*, 2011). Les mécanismes impliqués dans la sensibilisation sélective du tissu tumoral par les AGPIn-3LC ne pas sont élucidés. Ils refléteraient des différences entre la biologie du tissu tumoral et celle du tissu sain (Hajjaji & Bougnoux, 2012). Des différences d'expression et d'activation de voies de signalisation pourraient contribuer à expliquer cette observation. Au-delà de la compréhension des mécanismes, explorer cet aspect pourrait mettre en évidence des différences de fonctionnement entre tumeurs et tissus sains exploitables à des fins thérapeutiques.

La mortalité associée au cancer du sein résulte principalement d'une résistance aux traitements et/ou de rechutes métastatiques. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel chimiosensibilisant des AGPIn-3LC sur des modèles de cancers résistants. En effet, les cibles moléculaires des AGPIn-3LC identifiées au cours de ces travaux, et plus particulièrement la PKC ϵ et l'amphiréguline, contribuent à la résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies (pour revue, Busser *et al*, 2011; Totoñ *et al*, 2011). Ces deux facteurs ont principalement été impliqués dans la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses. D'autre part, la vascularisation tumorale contrôle l'oxygénation et la délivrance des agents anticancéreux, deux causes majeures de chimiorésistance dans les tumeurs solides (Goel *et al*, 2011). En normalisant le microenvironnement vasculaire de la tumeur, les AGPIn-3LC améliorent l'oxygénation tumorale (Kornfeld *et al*, 2012) et augmenteraient la délivrance de l'agent anticancéreux.

La chimiorésistance et la rechute métastatique sont souvent liées. Aujourd'hui, les cellules souches cancéreuses semblent être impliquées dans la récurrence de tumeurs résistantes plus agressives après chimiothérapie (Pinto *et al*, 2013; Chuthapisith *et al*, 2010).

Les cellules souches cancéreuses ont un faible index mitotique, ce qui les rend moins sensibles aux chimiothérapies qui ciblent les cellules en prolifération. Après un traitement néoadjuvant de docétaxel, le tissu tumoral mammaire résiduel est enrichi en cellules présentant un phénotype de cellules souches cancéreuses (Creighton *et al*, 2009). Il serait intéressant d'étudier l'effet des AGPIn-3LC sur les signalisations Wnt/ β -caténine, Notch et Sonic hedgehog, qui semblent impliquées dans la chimiorésistance des cellules souches cancéreuses (Abdullah & Chow, 2013).

Il n'existe que peu de données sur les AGPIn-3LC et la prévention des métastases (Rose *et al*, 1995; Mandal *et al*, 2010; Hawcroft *et al*, 2012). Collectivement, les données du laboratoire et celles de la littérature suggèrent que le DHA pourrait réguler les étapes précoces du processus métastatique en modifiant la perméabilité et le remodelage vasculaires ainsi que la migration transendothéliale des cellules cancéreuses (Kornfeld, 2012, Thèse de Doctorat). Sur le plan moléculaire, la régulation de l'épiréguline et de la NO synthase pourrait avoir un fort impact sur la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. L'activité de la NO synthase est corrélée à l'apparition de métastases (Fukumura *et al*, 2006). De plus, dans un modèle murin de cancer mammaire, Gupta *et al.* ont montré que l'inhibition conjointe de l'épiréguline et de COX2 inhibe fortement l'établissement de métastases pulmonaires (Gupta *et al*, 2007). Là encore, l'action pléiotrope des AGPIn-3LC pourrait être une alternative efficace et non toxique à une thérapie combinatoire. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les AGPIn-3LC pourraient prévenir le développement de métastase en régulant ces différents facteurs au niveau des cellules tumorales et du microenvironnement

Des approches visant à optimiser la délivrance tumorale des molécules chimiothérapeutiques sont actuellement développées (Ojima *et al*, 2012). Ces systèmes sont basés sur la conjugaison d'une molécule ciblant la tumeur à un agent cytotoxique, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité thérapeutique de l'agent anticancéreux. Dans des modèles précliniques, le conjugué DHA-paclitaxel (Taxoprexin[®]) présente une pharmacocinétique différente du paclitaxel, ce qui associée à une meilleure activité anti-tumorale (Bradley *et al*, 2001). D'autres conjugués, comme le DHA couplé à la doxorubicine (anthracycline) (Wang *et al*, 2006b), le DHA couplé à la gemcitabine (anti-métabolite) (Li *et al*, 2014) ainsi que le DHA couplé au SB-T-1214 (taxoïde) (Kuznetsova *et al*, 2006), exercent tous une activité anti-tumorale supérieure à l'agent thérapeutique classique dans des modèles précliniques. Deux études associent ces effets à une augmentation du conjugué DHA dans les tumeurs, ce dans

les premières 24 h post-injection (Li *et al*, 2014) ainsi que dans les six jours post-injection (Bradley *et al*, 2001). De plus amples études expérimentales et cliniques sont nécessaires pour, respectivement, éclaircir le mécanisme d'action de ces conjugués et confirmer leur efficacité.

La stratégie actuelle du laboratoire est d'utiliser la nutrition pour apporter les AGPIn-3LC, avec une délivrance quotidienne pour permettre une bonne imprégnation tissulaire. Collectivement, la littérature suggère que les AGPIn-3LC ont un fort potentiel en tant qu'adjuvant aux chimiothérapies conventionnelles. Ils pourraient prévenir de complications secondaires liés aux traitements anticancéreux (Vaughan *et al*, 2013; Aguiar Pastore Silva *et al*, 2015). De plus, la sensibilisation des tumeurs à la chimiothérapie par une supplémentation nutritionnelle en AGPIn-3LC a été décrite dans de nombreux modèles précliniques et dans deux études cliniques de phase II (Bougnoux *et al*, 2009; Murphy *et al*, 2011). Cette approche est simple à réaliser, peu coûteuse et pourrait être proposée à de nombreux patients.

A l'heure actuelle, seul un essai de phase III pourra valider l'utilisation en clinique des AGPIn-3LC en traitement adjuvant des traitements chimiothérapeutiques ou radiothérapeutiques.

Bibliographie

- Abdullah LN & Chow EK-H (2013) Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* **2**: 3
- Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH & Murphy LC (2002) Activated Mitogen-activated Protein Kinase Expression during Human Breast Tumorigenesis and Breast Cancer Progression. *Clin. Cancer Res.* **8**: 1747–1753
- Aeder SE, Martin PM, Soh JW & Hussaini IM (2004) PKC-eta mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* **23**: 9062–9
- Aguiar Pastore Silva J, Souza Fabre ME & Waitzberg DL (2015) Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and / or radiotherapy : A systematic review. *Clin. Nutr.* **34**: 359–366
- Aksamitiene E, Kiyatkin A & Kholodenko BN (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* **40**: 139–146
- Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) The lipid bilayer. Dans "Molecular biology of the cell, 4th edition". New York, Garland Science.
- Alessi D, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse S & Cohen P (1995) Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol.* **5**: 283–95
- Allen-Petersen B, Carter CJ, Ohm AM & Reyland ME (2014) Protein kinase C delta is required for ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis and negatively correlates with prognosis in human breast cancer. *Oncogene* **33**: 1306–1315
- Alli E, Yang J-M, Ford JM & Hait WN (2007) Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **71**: 1233–1240
- Almena M & Mérida I (2011) Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 593–603
- Alvarez B, Martínez-AC, Burgering BM & Carrera AC (2001) Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* **413**: 744–747
- Amin DN, Hida K, Bielenberg DR & Klagsbrun M (2006) Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res.* **66**: 2173–2180
- Andre F, Berrada N & Desmedt C (2010) Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Curr. Opin. Oncol.* **22**: 547–51
- Antal C & Newton A (2014) Tuning the signalling output of protein kinase C. *Biochem. Soc. Trans.* **42**: 1477–83
- Antal C, Violin J, Kunkel M, Skovso S & Newton A (2014) Intramolecular conformational changes optimize protein kinase C signaling. *Chem. Biol.* **21**: 459–469
- Antal CE, Hudson AM, Kang E, Zanca C, Wirth C, Stephenson NL, Trotter EW, Gallegos LL, Miller

- CJ, Furnari FB, Hunter T, Brognard J & Newton AC (2015) Cancer-Associated Protein Kinase C Mutations Reveal Kinase ' s Role as Tumor Suppressor. *Cell* **160**: 489–502
- Antonescu C, Danuser G & Schmid S (2010) Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **21**: 2944–2952
- Arish M, Husein A, Kashif M, Sandhu P, Hasnain SE, Akhter Y & Rub A (2015) Biochimie Orchestration of membrane receptor signaling by membrane lipids. *Biochimie* **113**: 111–124
- Arterburn L, Hall E & Oken H (2006) Distribution, interconversion, and dose response of n– 3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**(Suppl):1467S-76S
- Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61–70
- Avraham R & Yarden Y (2011) Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 104–117
- Baba I, Shirasawa S, Iwamoto R, Okumura K, Tsunoda T, Nishioka M, Fukuyama K, Yamamoto K, Mekada E & Sasazuki T (2000) Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res.* **60**: 6886–9
- Babina IS, Donatello S, Nabi IR & Hopkins AM (2011) Lipid Rafts as Master Regulators of Breast Cancer Cell Function. Dans "Breast Cancer - Carcinogenesis. Cell Growth and Signaling. Pathways. Prof. Mehmet Gunduz (Ed.), p401–428
- Baker SD, Zhao M, Lee CKK, Verweij J, Zabelina Y, Brahmer JR, Wolff AC, Sparreboom A & Carducci MA (2004) Comparative Pharmacokinetics of Weekly and Every-Three-Weeks Docetaxel. *Clin. Cancer Res.* **10**: 1976–1983
- Balko JM, Cook RS, Vaught DB, Kuba MG, Miller TW, Bhola NE, Sanders ME, Granja-Ingram NM, Smith JJ, Meszoely IM, Salter J, Dowsett M, Stenke-Hale K, González-Angulo AM, Mills GB, Pinto JA, Gómez HL & Arteaga CL (2012) Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. *Nat. Med.* **18**: 1052–9
- Balko JM, Giltane JM, Wang K, Schwarz LJ, Christian D, Cook RS, Owens P, Sanders ME, Kuba MG, Sánchez V, Kurupi R, Moore PD, Pinto JA, Doimi FD, Pietenpol A, Ross JS, Palmer GA, Yelensky R, Cronin M, Miller V, Stephens PJ, Arteaga CL (2014) Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.* **4**(2): 232–245
- Balko JM, Jones BR, Coakley VL & Black EP (2009) MEK and EGFR inhibition demonstrate synergistic activity in EGFR-dependent NSCLC. *Cancer Biol. Ther.* **8**: 522–530
- Balmanno K & Cook SJ (2009) Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* **16**: 368–77
- Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P & Jourdan M-L (2006) 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.* **38**: 196–208

- Bauer JA, Chakravarthy AB, Rosenbluth JM, Mi D, Seeley EH, Granja-Ingram NDM, Olivares MG, Kelley MC, Mayer IA, Meszoely IM, Means-powell JA, Johnson KN, Tsai J, Ayers GD, Sanders ME, Schneider RJ, Formenti SC, Caprioli RM & Pietenpol JA (2010) Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin. cancer Res.* **16**: 681–690
- Bayir H, Fadeel B, Palladino MJ, Witasz E, Kurnikov IV, Tyurina YY, Tyurin VA, Amoscato AA, Jiang J, Kochanek PM, DeKosky ST, Greenberger JS, Shvedova AA & Kagan VE (2006) Apoptotic interactions of cytochrome c: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1757**: 648–659
- Bechoua S, Dubois M, Némoz G, Lagarde M & Prigent AF (1998) Docosahexaenoic acid lowers phosphatidate level in human activated lymphocytes despite phospholipase D activation. *J. Lipid Res.* **39**: 873–83
- Bekier ME, Fischbach R, Lee J & Taylor WR (2009) Length of mitotic arrest induced by microtubule-stabilizing drugs determines cell death after mitotic exit. *Mol. Cancer Ther.* **8**: 1646–1654
- Benes CH, Wu N, Elia AEH, Dharia T, Cantley LC & Soltoff SP (2005) The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* **121**: 271–80
- Berrieman H, Lind M & Cawkwell L (2004) Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol.* **5**: 158–164
- Bhalla US, Ram PT, Iyengar R (2002) MAP Kinase Phosphatase As a Locus of Flexibility in a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Network. *Science* **297**: 1018–1023
- Bijman MNA, van Nieuw Amerongen GP, Laurens N, van Hinsbergh VWM & Boven E (2006) Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. *Mol. Cancer Ther.* **5**: 2348–2357
- Biondo PD, Brindley DN, Sawyer MB & Field CJ (2008) The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J. Nutr. Biochem.* **19**: 787–96
- Bissery M (1995) Preclinical pharmacology of docetaxel. *Eur. J. Cancer* **31A**: S1–6
- Bivona TG, Pérez De Castro I, Ahearn IM, Grana TM, Chiu VK, Lockyer PJ, Cullen PJ, Pellicer A, Cox AD & Philips MR (2003) Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* **424**: 694–698
- Blagosklonny M, Chuman Y, Bergan R & Fojo T (1999) Mitogen-activated protein kinase pathway is dispensable for microtubule-active drug-induced Raf-1/Bcl-2 phosphorylation and apoptosis in leukemia cells. *Leukemia* **13**: 1028–36
- Blagosklonny M, Schulte T, Nguyen P, Trepel J & Neckers L (1996) Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res.* **56**: 1851–4
- Blanckaert V, Ulmann L, Mimouni V, Antol J, Brancquart L & Chénais B (2010) Docosahexaenoic acid intake decreases proliferation, increases apoptosis and decreases the invasive potential of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Int. J. Oncol.* **36**: 737–742

- Bligh E & Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911–7
- Blumberg P (1980) In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1. *Crit. Rev. Toxicol.* **8**: 153–97
- Bonnefoi H (2009) Les signatures dans le cancer du sein : pourquoi pas tout de suite ? *La Lett. du sénologue* **45**: 4–7
- Bougnoux P, Germain E, Chajès V, Hubert B, Lhuillery C, Le Floch O, Body G & Calais G (1999) Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Br. J. Cancer* **79**: 1765–9
- Bougnoux P, Giraudeau B & Couet C (2006) Diet, Cancer, and the Lipidome. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**: 416–421
- Bougnoux P, Hajjaji N & Couet C (2010a) Lipides et cancer du sein : de la prévention au traitement. *Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète* **45**: 42–47
- Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C & Le Floch O (2009) Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br. J. Cancer* **101**: 1978–85
- Bougnoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C & Chevalier S (2010b) Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog. Lipid Res.* **49**: 76–86
- Bradley MO, Webb NL, Anthony FH, Devanesan P, Witman PA, Hemamalini S, Chander MC, Baker SD, He L, Horwitz SB & Swindell CS (2001) Tumor Targeting by Covalent Conjugation of a Natural Fatty Acid to Paclitaxel. *Clin. cancer Res.* **7**: 3229–3238
- Brandão RD, Veeck J, Van de Vijver KK, Lindsey P, de Vries B, van Elssen CH, Blok MJ, Keymeulen K, Ayoubi T, Smeets HJ, Tjan-Heijnen VC & Hupperets PS (2013) A randomised controlled phase II trial of pre-operative celecoxib treatment reveals anti-tumour transcriptional response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* **15**: R29
- Brito D & Rieder C (2006) Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* **16**: 1194–1200
- Brown DA & Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533–544
- Brown JM & Wouters BG (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* **59**: 1391–1399
- Bruntz RC, Lindsley CW & Brown HA (2014) Phospholipase D Signaling Pathways and Phosphatidic Acid as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmological Reviews* **66**: 1033–1079
- Buchanan FG, McReynolds M, Couvillon A, Kam Y, Holla VR, Dubois RN & Exton JH (2005) Requirement of phospholipase D1 activity in H-RasV12-induced transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 1638–1642
- Bullock K & Blackwell K (2008) Clinical efficacy of taxane-trastuzumab combination regimens for HER-2-positive metastatic breast cancer. *Oncologist* **13**: 515–525

- Bunney TD & Katan M (2010) Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat. Rev. Cancer* **10**: 342–352
- Burns C & North J (1986) Adriamycin transport and sensitivity in fatty acid-modified leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* **888**: 7–10
- Busser B, Sancey L, Brambilla E, Coll J-L & Hurbin A (2011) The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1816**: 119–131
- Cacace AM, Ueffing M, Philipp A, Han EK, Kolch W, Weinstein IB (1996) PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene* **13**(12):2517-26
- Cai J, Abramovici H, Gee S & Topham M (2012) Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **179**: 942–948
- Calder PC (2012) Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* **142**: 592S–599S
- Calder PC (2013) N-3 Fatty Acids, Inflammation and Immunity: New Mechanisms To Explain Old Actions. *Proc. Nutr. Soc.* **72**: 326–36
- Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N, Triangali G, Navarra P, Ranelletti FO & Palozza P (2004) 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* **25**: 2303–2310
- Calviello G, Serini S, Piccioni E & Pessina G (2009) Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutr. Cancer* **61**: 287–301
- Cao W, Ma Z, Rasenick MM, Yeh S & Yu J (2012) N-3 Poly-Unsaturated Fatty Acids Shift Estrogen Signaling to Inhibit Human Breast Cancer Cell Growth. *PLoS One* **7**: e52838
- Cargnello M & Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 50–83
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J & Pandolfi PP (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* **118**: 3065–3074
- Carrasco S & Mérida I (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 27–36
- Casar B, Arozarena I, Sanz-Moreno V, Pinto A, Agudo-Ibáñez L, Marais R, Lewis RE, Berciano MT & Crespo P (2009) Ras subcellular localization defines extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 substrate specificity through distinct utilization of scaffold proteins. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 1338–1353
- Casar B, Pinto A & Crespo P (2008) Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol. Cell* **31**: 708–21
- Castellano E & Downward J (2011) RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* **2**: 261–274

- Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD & Cook SJ (2015) MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nature Reviews Cancer* **15**(10): 577–592
- Cenni V, Döppler H, Sonnenburg ED, Maraldi N, Newton AC & Toker A (2002) Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem. J.* **363**: 537–45
- Chae Y, Lee S, Lee H, Heo K, Kim J, Kim J, Suh P & Ryu S (2005) Inhibition of muscarinic receptor-linked phospholipase D activation by association with tubulin. *J. Biol. Chem.* **280**: 3723–3730
- Chajès V & Bounoux P (2003) Omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acid ratio and cancer. *World Rev. Nutr. Diet.* **92**: 133–51
- Chajès V, Lanson M, Fetissof F, Lhuillery C & Bounoux P (1995) Membrane fatty acids of breast carcinoma: Contribution of host fatty acids and tumor properties. *Int. J. Cancer* **63**: 169–175
- Chajès V, Thiebaut a. CM, Rotival M, Gauthier E, Maillard V, Boutron-Ruault M-C, Joulin V, Lenoir GM & Clavel-Chapelon F (2008) Association between Serum trans-Monounsaturated Fatty Acids and Breast Cancer Risk in the E3N-EPIC Study. *Am. J. Epidemiol.* **167**: 1312–1320
- Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J & Lenormand P (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1773**: 1299–1310
- Chan C-H, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou P-C, Logothetis C & Lin H-K (2014) Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci.* **4**: 59
- Chan MM (2005) Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* **26**: 1343–1353
- Chang S-H, Ai Y, Breyer RM, Lane TF & Hla T (2005) The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia. *Cancer Res.* **65**: 4496–9
- Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, Chen O, Kamoun WS, Bawendi MG, Fukumura D & Jain R (2012) Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat. Nanotechnol.* **7**: 383–388
- Chen D, Gould C, Garza R, Gao T, Hampton RY & Newton AC (2007) Amplitude control of protein kinase C by RINCK, a novel E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **282**: 33776–33787
- Chen HW, Yang JJ, Tsai CW, Wu JJ, Sheen LY, Ou CC & Lii CK (2001) 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.* **131**: 1438–1443
- Chen Z, Zhang Y, Jia C, Wang Y, Lai P, Zhou X, Wang Y, Song Q, Lin J, Ren Z, Gao Q, Zhao Z, Zheng H, Wan Z, Gao T, Zhao A, Dai Y, Bai X (2014) mTROC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene* **33**(37):4548-57
- Chénais B & Blanckaert V (2012) The janus face of lipids in human breast cancer: how polyunsaturated Fatty acids affect tumor cell hallmarks. *Int. J. Breast Cancer* **2012**: 712536
- Cho JH, Hong SK, Kim EY, Park SY, Park CH, Kim JM, Kwon OJ, Kwon SJ, Lee KS & Han JS (2008a) Overexpression of phospholipase D suppresses taxotere-induced cell death in stomach cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**: 912–923

- Cho SJ, Chae MJ, Shin BK, Kim HK & Kim A (2008b) Akt- and MAPK-mediated activation and secretion of MMP-9 into stroma in breast cancer cells upon heregulin treatment. *Mol. Med. Rep.* **1**: 83–8
- Choi HJ & Han JS (2012) Overexpression of phospholipase D enhances Bcl-2 expression by activating STAT3 through independent activation of ERK and p38MAPK in HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**: 1082–1091
- Chumsri S, Nakanishi T, Natarajan K, Phatak P, Humburger A, Ross D, Burger A (2007) Overexpression of HER2/neu in breast cancer cell lines is associated with an increased side population, presence of ABC transporters, and clonogenicity. *Cancer Res(AACR Annual Meeting, Abstract)* **67**;1278
- Chung AS, Lee J & Ferrara N (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**: 505–514
- Chuthapisith S, Eremin J, El-Sheemey M & Eremin O (2010) Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol* **19**: 27–32
- Clark AS, West K, Streicher S & Dennis PA (2002) Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **1**: 707–717
- Clemons M, Joy A a., Abdulnabi R, Kotliar M, Lynch J, Jordaan JP, Iscoe N & Gelmon K (2010) Phase II, double-blind, randomized trial of capecitabine plus enzastaurin versus capecitabine plus placebo in patients with metastatic or recurrent breast cancer after prior anthracycline and taxane therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **124**: 177–186
- Cognault S, Jourdan M, Germain E, Pitavy R, Morel E, Durand G, Bougnoux P & Lhuillery C (2000) Effect of an alpha-linolenic acid-rich diet on rat mammary tumor growth depends on the dietary oxidative status. *Nutr. Cancer* **36**: 33–41
- Colas S, Germain E, Arab K, Maheo K, Goupille C & Bougnoux P (2005) Alpha-tocopherol suppresses mammary tumor sensitivity to anthracyclines in fish oil-fed rats. *Nutr. Cancer* **51**: 178–83
- Colas S, Mahéo K, Denis F, Goupille C, Hoinard C, Champeroux P, Tranquart F & Bougnoux P (2006) Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin. Cancer Res.* **12**: 5879–86
- Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, Le Floch O, Ogilvie G & Bougnoux P (2004) Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int. J. Cancer* **109**: 449–54
- Conklin KA (2004) Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr. Cancer Ther.* **3**: 294–300
- Corbalan-garcia S, Sanchez-Carillo S, Garcia-Garcia J & Gomez-Fernandez JC (2003) Characterization of the Membrane Binding Mode of the C2 Domain of PKC. *Biochemistry* **42**: 11661–11668
- Costa M, Marchi M, Cardarelli F, Roy A, Beltram F, Maffei L & Ratto GM (2006) Dynamic

- regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *J. Cell Sci.* **119**: 4952–4963
- Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov A a, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, et al (2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 13820–13825
- Cully M, You H, Levine AJ & Mak TW (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 184–192
- D'Souza K & Epand RM (2014) Enrichment of phosphatidylinositols with specific acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**: 1501–1508
- Dann SG, Golas J, Miranda M, Shi C, Wu J, Jin G, Rosfjord E, Upeslakis E, Klippel A (2014) p120 catenin is a key effector of a Ras-PKC epsilon oncogenic signaling axis. *Oncogene* **33**(11):1385-94
- Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K & DuBois RN (2005) Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: Pharmacologic targets for chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* **23**: 254–266
- Das UN & Madhavi N (2011) Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids Health Dis.* **10**: 159
- Davidson N & Kennedy M (1996) Protein kinase C and breast cancer. Dans "Mammary tumor cell cycle, differentiation, and metastasis", R. B. Dickson (Ed.) et M. E. Lippman (Ed.), pp 91–105
- Day CA & Kenworthy AK (2009) Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**: 245–253
- De Hoon JPI, Veeck J, Vriens BEPJ, Calon TGA, van Engeland M, Tjan-Heijnen VCG (2012) Taxane resistance in breast cancer: A closed HER2 circuit? *Biochim. Biophys. Acta* **1825**:197-206
- Denis F, Colas S, Chami L, Louisot P, Le Floch O, Tranquart F & Bougnoux P (2003) Changes in Tumor Vascularization after Irradiation, Anthracyclin, or Antiangiogenic Treatment in Nitrosomethyl Ureas-Induced Rat Mammary Tumors. *Clin. Cancer Res.* **9**: 4546–4552
- Derry W, Wilson L, Khan I, Luduena R & Jordan M (1997) Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isoforms. *Biochemistry* **36**: 3554–62
- Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TWJ & Munnik T (2003) Phospholipase d activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell* **15**: 2666–2679
- Dìaz Bessone MI, Berardi DE, Campodónico PB, Todaro LB, Lothstein L, Bal De Kier Joffe ED & Urtreger AJ (2011) Involvement of PKC delta (PKCδ) in the resistance against different doxorubicin analogs. *Breast Cancer Res. Treat.* **126**: 577–587
- Diaz O, Berquand A, Dubois M, Di Agostino S, Sette C, Bourgoïn S, Lagarde M, Nemoz G & Prigent A-F (2002) The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **277**:

- Ding L, Wang H, Lang W & Xiao L (2002) Protein kinase C- ϵ promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. *J. Biol. Chem.* **277**: 35305–35313
- Ding W & Lind S (2007) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* **6**: 1467–74
- Ding W, Vaught J, Yamauchi H & Lind S (2004) Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Mol. Cancer Ther.* **3**: 1109–17
- Dowhan W, Bogdanov M (2002) Functional roles of lipids in membranes. Dans "Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th Edition", D. E. Vance (Ed.) et J. E. Vance (Ed.), p1-35
- Dreyfus H, Guérolde B, Freysz L & Hicks D (1997) Successive isolation and separation of the major lipid fractions including gangliosides from single biological samples. *Anal. Biochem.* **249**: 67–78
- Ducruet AP, Vogt A, Wipf P & Lazo JS (2005) Dual specificity protein phosphatases: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 725–50
- Duhamel S, Hébert J, Gaboury L, Bouchard A, Simon R, Sauter G, Basik M & Meloche S (2012) Sef downregulation by ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Res.* **72**: 626–635
- Dumontet C, Krajewska M, Treilleux I, Mackey JR, Martin M, Rupin M, Lafanechere L & Reed JC (2010) BCIRG 001 Molecular Analysis: Prognostic Factors in Node-Positive Breast Cancer Patients Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **16**: 3988–3997
- Ebisuya M, Kondoh K & Nishida E (2005) The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell Sci.* **118**: 2997–3002
- Eichmann TO & Lass A (2015) DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol—stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**: 3931–3952
- Eisenhauer E & Vermoken J (1998) The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* **55**: 5–30
- Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 550–562
- Escriba P, Sastre M & Garcia-Sevilla J (1995) Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 1595–9
- Escribá PV, Busquets X, Inokuchi J, Balogh G, Török Z, Horváth I, Harwood JL & Vigh L (2015) Membrane lipid therapy : Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog. Lipid Res.* **59**:38-53
- Eyster KM (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv. Physiol. Educ.* **31**: 5–16

- Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B & Jacinto E (2008) The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* **27**: 1932–1943
- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan a & Chen J (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **294**: 1942–1945
- Fauzee NJS, Dong Z & Wang YL (2011) Taxanes: Promising anti-cancer drugs. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **12**: 837–851
- Finetti F, Donnini S, Giachetti A, Morbidelli L & Ziche M (2009) Prostaglandin E(2) primes the angiogenic switch via a synergic interaction with the fibroblast growth factor-2 pathway. *Circ. Res.* **105**: 657–66
- Foster DA, Salloum D, Menon D & Frias M (2014) Phospholipase D and the Maintenance of Phosphatidic Acid Levels for Regulation of mTOR. *J. Biol. Chem.* **289**: 22583–22588
- Foster D a & Xu L (2003) Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol. Cancer Res.* **1**: 789–800
- Fracasso PM, Picus J, Wildi JD, Goodner S a., Creekmore AN, Gao F, Govindan R, Ellis MJ, Tan BR, Linette GP, Fu CJ, Pentikis HS, Zumbun SC, Egorin MJ & Bellet RE (2009) Phase 1 and pharmacokinetic study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel, Taxoprexin®, in resistant solid tumor malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**: 451–458
- Frémin C, Saba-El-Leil M, Lévesque K, Ang S & Meloche S (2015) Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Rep.* **12**(6):913-21
- Fruman DA & Rommel C (2014) PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**: 140–56
- Fu X, Osborne C & Schiff R (2013) Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. *Breast* **22**(Suppl.2):S12-S18
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL & Jain RK (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 2604–9
- Fukumura D & Jain R (2007) Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc. Res.* **74**: 72–84
- Fukumura D, Kashiwagi S & Jain RK (2006) The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 521–534
- Gallegos LL, Kunkel MT & Newton AC (2006) Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **281**: 30947–30956
- Gallegos LL & Newton AC (2008) Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. *IUBMB Life* **60**: 782–789
- Galli S, Jahn O, Hitt R, Hesse D, Opitz L, Plessmann U, Urlaub H, Poderoso JJ, Jares-Erijman E a. &

- Jovin TM (2009) A new paradigm for MAPK: Structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *PLoS One* **4**(10):e7541
- Gan X, Wang J, Su B & Wu D (2011) Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **286**: 10998–11002
- Gao HB, Chu YJ & Xue HW (2013) Phosphatidic acid (PA) Binds PP2AA1 to regulate PP2A activity and PIN1 polar localization. *Mol. Plant* **6**: 1692–1702
- Gao T, Brognard J & Newton AC (2008) The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **283**: 6300–6311
- Garg R, Benedetti LG, Abera MB, Wang H, Abba M & Kazanietz MG (2013a) Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene* **33**: 1–13
- Garg R, Caino MC & Kazanietz MG (2013b) Regulation of Transcriptional Networks by PKC Isozymes: Identification of c-Rel as a Key Transcription Factor for PKC-Regulated Genes. *PLoS One* **8**(6):e67319
- Gascoigne K & Taylor S (2009) How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* **122**(Pt 15):2579-85
- Gascoigne KE & Taylor SS (2008) Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* **14**: 111–122
- Gelsomino G, Corsetto PA, Campia I, Montorfano G, Kopecka J, Castella B, Gazzano E, Ghigo D, Rizzo AM & Riganti C (2013) Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. *Mol. Cancer* **12**: 137
- St. George M, Ayoub AT, Banerjee A, Churchill CDM, Winter P, Klobukowski M, Cass CE, Ludueña RF, Tuszyński J a. & Damaraju S (2015) Designing and Testing of Novel Taxanes to Probe the Highly Complex Mechanisms by Which Taxanes Bind to Microtubules and Cause Cytotoxicity to Cancer Cells. *PLoS One* **10**: e0129168
- Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C & 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**: 578–83
- Ghoreishi Z, Esfahani A, Djazayeri A, Djalali M, Golestan B, Ayromlou H, Hashemzade S, Asghari Jafarabadi M, Montazeri V & Keshavarz SA (2012) Omega-3 fatty acids are protective against paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A randomized double-blind placebo controlled trial. *BMC Cancer* **12**: 355
- Ghosh S, Strum JC, Sciorra VA., Daniel L & Bell RM (1996) Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid: Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 8472–8480
- Ghosh-Choudhury T, Mandal CC, Woodruff K, St Clair P, Fernandes G, Choudhury GG & Ghosh-Choudhury N (2009) Fish oil targets PTEN to regulate NFkappaB for downregulation of anti-apoptotic genes in breast tumor growth. *Breast Cancer Res. Treat.* **118**: 213–28

- Giltane J & Balko J (2014) Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov. Med.* **17**: 275–83
- Giorgione J, Lin J, McCammon J & Newton A (2006) Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase C delta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *J. Biol. Chem.* **281**: 1660–9
- Gligorov J & Lotz JP (2004) Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. *Oncologist* **9**(Suppl 2): 3–8
- Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM (2011) Choline metabolism in malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* **11**(12):835-48
- Goel S, Duda D, Xu L, Munn L, Boucher Y, Fukumura D & Jain R (2011) Normalization of the Vasculature for Treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* **91**: 1071–1121
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ, Albain KS, André F, Bergh J, Bonnefoi H, Bretel-Morales D, Burstein H, Cardoso F, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Colleoni M, Costa A, Curigliano G, Davidson NE, et al (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**: 2206–2223
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P & Parker PJ (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**: 2042–2045
- Gordge P, Hulm M, Clegg R & Miller W (1996) Elevation of protein kinase A and protein kinase C activities in malignant as compared with normal human breast tissue. *Eur. J. Cancer* **32A**: 2120–6
- Gould CM, Kannan N, Taylor SS & Newton AC (2009) The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* **284**: 4921–4935
- Gradishar WJ (2012) Taxanes for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **6**: 159–171
- Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, Sams L, Huss KL, Campbell RM, Iversen PW, Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, Geeganage S & Thornton D (2005) The protein kinase C beta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res.* **65**: 7462–9
- Granci V, Cai F, Lecumberri E, Clerc A, Dupertuis YM & Pichard C (2013) Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway. *Br. J. Nutr.* **109**: 1188–1195
- Grand M Le, Rovini A, Bourgarel-rey V, Bastonero S, Braguer D & Carre M (2014) ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt / GSK3 β pathway : implication in cancer cell response to microtubule- targeting agents. *5*(10):3408-3423

- Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M & Dicker AP (2003) Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int. J. Cancer* **104**: 121–129
- Greenberger LM & Sampath D (2006) Cancer Drug Resistance. *Cancer Drug Resist.*: 329–358
- Greene ER, Huang S, Serhan CN & Panigrahy D (2011) Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **96**: 27–36
- Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C & Kaidi A (2009) The COX-2/PGE2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* **30**: 377–386
- Griner EM & Kazanietz MG (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**: 281–94
- Grossoni VC, Falbo KB, Kazanietz MG, Bal ED, Joffe DK & Urtreger AJ (2007) Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol. Carcinog.* **46**: 381–390
- Grossoni VC, Todaro LB, Kazanietz MG, De Kier Joffé EDB & Urtreger AJ (2009) Opposite effects of protein kinase C beta1 (PKC β 1) and PKC ϵ in the metastatic potential of a breast cancer murine model. *Breast Cancer Res. Treat.* **118**: 469–480
- Gu Z, Wu J, Wang S, Suburu J, Chen H, Thomas MJ, Shi L, Edwards IJ, Berquin IM & Chen YQ (2013) Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **34**: 1968–1975
- Guéritte-Voegelein F, Guénard S & Potier P (1987) Taxol and derivatives: a biogenetic hypothesis. *J. Nat. Prod.* **50**: 9–18
- Guesnet P, Alessandri J, Astorg P, Pifferi F & Lavielle M (2005) Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL Oléagineux Corps Gras Lipides* **12**(5-6): 333–343
- Guo X, Zhang X, Li Y, Guo Y, Wang J, Li Y, Shen B, Sun D & Zhang J (2012) Nocodazole increases the ERK activity to enhance MKP-1 expression which inhibits p38 activation induced by TNF- α . *Mol. Cell. Biochem.* **364**: 373–380
- Gupta AK, Galoforo SS, Berns CM, Martinez a a, Corry PM, Guan KL & Lee YJ (1996) Elevated levels of ERK2 in human breast carcinoma MCF-7 cells transfected with protein kinase C alpha. *Cell Prolif.* **29**: 655–663
- Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K & Massagué J (2007) Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* **446**: 765–70
- Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, Contractor R, Medina CA, Nathanson KL, Herlyn M & Smalley KSM (2008) The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin. Cancer Res.* **14**: 230–9
- Hajjaji N & Bounoux P (2012) Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: A review. *Cancer Treat. Rev.* **39**(5):473-88

- Hamid R, Singh J, Reddy BS & Cohen LA. (1999) Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and 2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int. J. Oncol.* **14**: 523–528
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70
- Hanauske A, Degen D, Hilsenbeck S, Bissery M & Von Hoff D (1992) Effects of Taxotere and taxol on in vitro colony formation of freshly explanted human tumor cells. *Anticancer drugs* **3**: 121–124
- Hardman WE (2004) (n-3) fatty acids and cancer therapy. *J. Nutr.* **134**: 3427S–3430S]
- Hardman WE, Avula CPR, Fernandes G & Cameron IL (2001) Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* **7**: 2041–2049
- Hardman WE, Moyer MP & Cameron IL (1999) Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *Br. J. Cancer* **81**: 440–448
- Hardman WE, Munoz Jr. J & Cameron IL (2002) Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. *Cancer Cell Int.* **2**: 10
- Hasegawa S, Miyoshi Y, Egawa C, Ishitobi M, Taguchi T & Tamaki Y (2003) Prediction of Response to Docetaxel by Quantitative Analysis of Class I and III Beta-Tubulin Isotype mRNA Expression in Human Breast Cancers 1. *Clin Cancer Res* **9**: 2992–2997
- Hassan M, Ansari J, Spooner D & Hussain S (2010) Chemotherapy for breast cancer (review). *Oncol. Rep.* **24**: 1121–1131
- Hawcroft G, Volpato M, Marston G, Ingram N, Perry SL, Cockbain a J, Race a D, Munarini a, Belluzzi a, Loadman PM, Coletta PL & Hull MA (2012) The omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid inhibits mouse MC-26 colorectal cancer cell liver metastasis via inhibition of PGE2-dependent cell motility. *Br. J. Pharmacol.* **166**: 1724–37
- He D-X, Xia Y-D, Gu X-T, Jin J & Ma X (2014) A 20-gene signature in predicting the chemoresistance of breast cancer to taxane-based chemotherapy. *Mol. BioSyst.* **10**: 3111–3119
- Henkels KM, Peng H-J, Frondorf K & Gomez-Cambronero J (2010) A comprehensive model that explains the regulation of phospholipase D2 activity by phosphorylation-dephosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **30**: 2251–2263
- Hennequin C, Giocanti N & Favaudon V (1995) S-phase specificity of cell killing by docetaxel (Taxotere) in synchronised HeLa cells. *Br. J. Cancer* **71**: 1194–1198
- Hernández-Vargas H, Palacios J & Moreno-Bueno G (2007) Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* **26**: 2902–13
- Hida K, Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y & Shindoh M (2011) Altered angiogenesis in the tumor microenvironment. *Pathol. Int.* **61**: 630–7

- Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, Ueno Y, Hatch H, Majumder PK, Pan B-S & Kotani H (2010) MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **9**: 1956–67
- Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ & Wakelam MJO (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: Which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem. Sci.* **23**: 200–204
- Hoeflich KP, O'Brien C, Boyd Z, Cavet G, Guerrero S, Jung K, Januario T, Savage H, Punnoose E, Truong T, Zhou W, Berry L, Murray L, Amler L, Belvin M, Friedman LS & Lackner MR (2009) In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin. Cancer Res.* **15**: 4649–4664
- Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH a, Kallemeijn WW & Schutte M (2007) Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* **5**: 195–201
- Holt S V, Logié a, Odedra R, Heier a, Heaton SP, Alferez D, Davies BR, Wilkinson RW & Smith PD (2012) The MEK1/2 inhibitor, selumetinib (AZD6244; ARRY-142886), enhances anti-tumour efficacy when combined with conventional chemotherapeutic agents in human tumour xenograft models. *Br. J. Cancer* **106**: 858–66
- Honore S, Pasquier E & Braguer D (2005) Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 3039–3056
- Hoque M, Rentero C, Cairns R, Tebar F, Enrich C & Grewal T (2014) Annexins - Scaffolds modulating PKC localization and signaling. *Cell. Signal.* **26**: 1213–1225
- Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB & Jaffe RB (2002) Inhibition of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Increases Efficacy of Paclitaxel in in Vitro and in Vivo Ovarian Cancer Models. *Cancer Res.* **62**: 1087–1092
- Huang C-Y & Tan T-H (2012) DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci.* **2**: 24
- Hugo HJ, Saunders C, Ramsay RG & Thompson EW (2015) New Insights on COX-2 in Chronic Inflammation Driving Breast Cancer Growth and Metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*
- Hwang J, Kim K, Kim S, Choi W, Jung S, Shim H, Bae W, Hwang E, Lee K, Lee J, Cho S & Chung I (2013) Class III β -tubulin is a predictive marker for taxanebased chemotherapy in recurrent and metastatic gastric cancer. *BMC Cancer* **13**:431
- Hynes NE & Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 341–354
- Iacovides DC, Johnson AB, Wang N, Boddapati S, Korkola J & Gray JW (2013) Identification and quantification of AKT isoforms and phosphoforms in breast cancer using a novel nanofluidic immunoassay. *Mol. Cell. Proteomics* **12**: 3210–20
- Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X & Guan K-L (2008) Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* **27**: 1919–31
- Jackson DN & Foster DA (2004) The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell

- proliferation and survival. *FASEB J.* **18**: 627–36
- Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**: 58–62
- Jain RK & Stylianopoulos T (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**: 653–64
- Jang J-H, Lee CS, Hwang D & Ryu SH (2012) Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog. Lipid Res.* **51**: 71–81
- Jenkins GH, Fiset PL & Anderson RA (1994) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **269**: 11547–11554
- Jeong EK, Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Kim CH & Kang HS (2010) Role of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in multicellular resistance to docetaxel in MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* **37**: 655–661
- Ji R, Xu Z, Strichartz G & Serhan C (2011) Emerging Roles of Resolvins in the Resolution of Inflammation and Pain. *Trends Neurosci.* **34**: 599–609
- Jiang H & Huitu L (1999) Effect of PKC activation and inhibition on HeLa cell cycle progression from G1 to S phase. *chinese J. Biochem. Mol. Biol.* **15**: 495–7
- Jiang W, Zhu Z, Mc Ginley JN, El Bayoumy K, Manni A, Thompson HJ (2012) Identification of a molecular signature underlying inhibition of mammary carcinoma growth by dietary N-3 fatty acids. *Cancer Res.* **72**(15):3795-806
- Jing K, Song K-S, Shin S, Kim N, Jeong S, Oh H-R, Park J-H, Seo K-S, Heo J-Y, Han J, Park J-I, Han C, Wu T, Kweon G-R, Park S-K, Yoon W-H, Hwang B-D & Lim K (2011) Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. *Autophagy* **7**: 1348–58
- Jo H, Loison F & Luo HR (2014) Microtubule dynamics regulates Akt signaling via dynactin p150. *Cell. Signal.* **26**: 1707–1716
- Johnson JE, Giorgione J & Newton AC (2000) The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* **39**: 11360–11369
- Jones JA & Hannun YA (2002) Tight Binding Inhibition of Protein Phosphatase-1 by Phosphatidic Acid. *J. Biol. Chem.* **277**:15530–15538
- Jones J, Rawles R & Hannun Y (2005a) Identification of a novel phosphatidic acid binding domain in protein phosphatase-1. *Biochemistry* **44**: 13235–45
- Jones S, Erban J, Overmoyer B, Budd G, Hutchins L, Lower E, Laufman L, Sundaram S, Urba W, Pritchard K, Mennel R, Richards D, Olsen S, Meyers M & Ravdin P (2005b) Randomized phase III study of docetaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**: 5542–51
- Jones SM & Kazlauskas A (2001) Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat. Cell Biol.* **3**: 165–172

- Jordan M a, Toso RJ, Thrower D & Wilson L (1993) Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 9552–9556
- Jordan MA & Wilson L (2004) Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 253–265
- Jump DB (2002) The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **277**: 8755–8758
- Kadamur G & Ross EM (2013) Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol* **75**: 127–154
- Kamath K, Wilson L, Cabral F & Jordan MA (2005) β III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J. Biol. Chem.* **280**: 12902–12907
- Kamioka Y, Yasuda S, Fujita Y, Aoki K & Matsuda M (2010) Multiple Decisive Phosphorylation Sites for the Negative Feedback Regulation of SOS1 via ERK. *J. Biol. Chem.* **285**: 33540–33548
- Kang JH (2014) Protein kinase C isozymes and cancer. *New J. Sci.* **2014**:36p
- Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T & Zhu BT (2010) Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. *PLoS One* **5**: e10296
- Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, Bando H, Mutoh M, Uchida T, Fukumoto M & Takebayashi Y (2001) Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Japanese J. Cancer Res.* **92**: 452–8
- Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, Gandhi J, Kwei K a., Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD & Pollack JR (2009) Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS One* **4**: e6146
- Karp G (2010) Structure et fonction de la membrane plasmique. Dans "Biologie cellulaire et moléculaire: concepts et expériences", 3ème édition, De Boeck Supérieur (Ed.), p140-141.
- Katayama K, Noguchi K & Sugimoto Y (2014) Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. **2014**:10p
- Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, Mitsuhashi J & Sugimoto Y (2007) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol. Cancer Ther.* **6**: 2092–2102
- Kavallaris M (2010) Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**: 194–204
- Kazi JU, Kim CR & Soh JW (2009) Subcellular Localization of Diacylglycerol-responsive Protein Kinase C Isoforms in HeLa Cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* **30**: 1981–1984
- Khankari NK, Bradshaw PT, Steck SE, He K, Olshan AF, Shen J, Ahn J, Chen Y, Ahsan H, Terry MB, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM & Gammon MD (2015) Polyunsaturated fatty acid interactions and breast cancer incidence: a population-based case-control study on Long Island, New York. *Ann. Epidemiol.* In press
- Kim S, Lee Y & Koo JS (2015) Differential Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins in

Different Breast Cancer Subtypes. *PLoS One* **10**: e0119473

- Kim SH, Juhn YS & Song YS (2007) Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1095**: 82–89
- Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J & Fan Z (2003) HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* **22**: 3205–3212
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marmé D & Rapp UR (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249–252
- Kornfeld S (2011) La vascularisation tumorale: une cible thérapeutique des acides gras polyinsaturés n-3 pour sensibiliser les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux. Thèse de doctorat de l'Université de François Rabelais de Tours.
- Kornfeld S, Goupille C, Vibet S, Chevalier S, Pinet A, Lebeau J, Tranquart F, Bougnoux P, Martel E, Maurin A, Richard S, Champeroux P & Mahéo K (2012) Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance. *Carcinogenesis* **33**: 260–7
- Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, Suzuki E, Kikuchi E & Oya M (2011) Long-term androgen ablation and docetaxel up-regulate phosphorylated Akt in castration resistant prostate cancer. *J. Urol.* **185**: 2376–81
- Kuhl WE & Spector AA (1970) Uptake of long-chain fatty acid methyl esters by mammalian cells. *J. Lipid Res.* **11**: 458–465
- Kuo M (2007) Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **608**:23-30
- Kuznetsov AV, Smigelskaite J, Doblander C, Janakiraman M, Hermann M, Wurm M, Scheidl SF, Sucher R, Deutschmann A & Troppmair J (2008) Survival signaling by C-RAF: mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ are critical targets. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 2304–2313
- Kuznetsova L, Chen J, Sun L, Wu X, Pepe A, Veith JM, Pera P, Bernacki RJ & Ojima I (2006) Syntheses and evaluation of novel fatty acid-second-generation taxoid conjugates as promising anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**: 974–977
- Lavoie H & Therrien M (2015) Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 281–298
- Lee EJ, Yun U-J, Koo KH, Sung JY, Shim J, Ye S-K, Hong K-M & Kim Y-N (2014) Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**: 190–203
- Lee HW, Smith L, Pettit GR & Smith JB (1997) Bryostatins 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* **51**: 439–447
- Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

Biol. **9**: 99–111

- Leontieva O V & Black JD (2004) Identification of two distinct pathways of protein kinase Calpha down-regulation in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 5788–5801
- Leslie M (2011) Do lipid rafts exist? *Science* **334**: 1047–1048
- Li H & Weinstein IB (2006) Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**: 11399–11408
- Li S, Qin J, Tian C, Cao J, Fida G, Wang Z, Qian Z, Chen WR & Gu Y (2014) The targeting mechanism of DHA ligand and its conjugate with Gemcitabine for the enhanced tumor therapy. *Oncotarget* **5**(11):3622-35
- Li YC, Park MJ, Ye S-K, Kim C-W & Kim Y-N (2006) Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am. J. Pathol.* **168**: 1107–1118
- Liebler D, Kling D & Reed D (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J. Biol. Chem.* **261**: 12114–119
- Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG & Li F (2004) Induction of Survivin Expression by Taxol (Paclitaxel) Is an Early Event, Which Is Independent of Taxol-mediated G2/M Arrest. *J. Biol. Chem.* **279**: 15196–15203
- Lipp P & Reither G (2011) Protein kinase C: The ‘Masters’ of calcium and lipid. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: 1–17
- Litosch I (2000) Regulation of phospholipase C-beta(1) activity by phosphatidic acid. *Biochemistry* **39**: 7736–43
- Litosch I, Pujari R & Lee S (2009) Phosphatidic acid regulates signal output by G protein coupled receptors through direct interaction with phospholipase C-β1. *Cell. Signal.* **21**: 1379–1384
- Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG & Reisfeld RA (2006) Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J. Clin. Invest.* **116**: 1955–1962
- Lønne GK, Cornmark L, Zahirovic IO, Landberg G, Jirström K & Larsson C (2010) PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Mol. Cancer* **9**: 76
- Lønne GK, Masoumi KC, Lennartsson J & Larsson C (2009) Protein kinase Cdelta supports survival of MDA-MB-231 breast cancer cells by suppressing the ERK1/2 pathway. *J. Biol. Chem.* **284**: 33456–65
- Lopez-andreo MJ, Gomez-fernandez JC & Corbalan-garcia S (2003) The Simultaneous Production of Phosphatidic Acid and Diacylglycerol Is Essential for the Translocation of Protein Kinase C epsilon to the Plasma Membrane in RBL-2H3 Cells. *Mol. Biol. Cell* **14**: 4885–4895
- Lu D, Huang J & Basu A (2006) Protein kinase Cε activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-α-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **281**: 22799–22807
- Lu I-F, Hasio A-C, Hu M-C, Yang F-M & Su H-M (2010) Docosahexaenoic acid induces proteasome-

- dependent degradation of estrogen receptor α and inhibits the downstream signaling target in MCF-7 breast cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* **21**: 512–517
- Lu Z & Xu S (2006) ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* **58**: 621–631
- Lung M, Shulga Y V., Ivanova PT, Myers DS, Milne SB, Brown HA, Topham MK & Epand RM (2009) Diacylglycerol kinase ϵ is selective for both acyl chains of phosphatidic acid or diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **284**: 31062–31073
- Ma S & Rosen ST (2007) Enzastaurin. *Curr. Opin. Oncol.* **19**: 590–5
- MacKeigan JP, Collins TS & Ting JPY (2000) MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**: 38953–38956
- MacKeigan JP, Taxman DJ, Hunter D, Earp HS, Graves LM & Ting JP-Y (2002) Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.* **8**: 2091–2099
- Madani S, Hichami A, Cherkaoui-Malki M, Khan NA & Charkaoui-Malki M (2004) Diacylglycerols containing Omega 3 and Omega 6 fatty acids bind to RasGRP and modulate MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.* **279**: 1176–83
- Madani S, Hichami A, Legrand A, Belleville J & Khan NA (2001) Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J.* **15**: 2595–601
- Maestre N, Bezombes C, Plo I, Levade T, Lavelle F, Laurent G & Jaffrézou J-P (2003) Phosphatidylcholine-derived phosphatidic acid and diacylglycerol are involved in the signaling pathways activated by docetaxel. *J. Exp. Ther. Oncol.* **3**: 36–46
- Mahajan K & Ma (2013) PI3K-Independent AKT Activation in Cancers: A Treasure Trove for Novel Therapeutics. **227**: 3178–3184
- Mahéo K, Chevalier S, Vibet S, Bougnoux P, Richard S, Serrière S, Bleuzen A, Tranquart F & Goupille C (2012) Non-invasive quantification of tumor vascular architecture during docetaxel-chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**: 1013–1025
- Mahéo K, Vibet S, Steghens JP, Dartigeas C, Lehman M, Bougnoux P & Goré J (2005) Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **39**: 742–51
- Maillard V, Hoinard C, Arab K, Jourdan M-L, Bougnoux P & Chajès V (2006) Dietary β -carotene inhibits mammary carcinogenesis in rats depending on dietary α -linolenic acid content. *Br. J. Nutr.* **96**: 18
- Mandal CC, Ghosh-Choudhury T, Yoneda T, Choudhury GG & Ghosh-Choudhury N (2010) Fish oil prevents breast cancer cell metastasis to bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**: 602–7
- Martelli a M, Faenza I, Billi a M, Falà F, Cocco L & Manzoli L (2003) Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? *Histol. Histopathol.* **18**: 1301–12
- Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M & Manzoli FA (2006) Nuclear protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**: 542–551
- Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**: 298–306

- Mathieu M (2007) Les sous-types moléculaires des cancers du sein. *La Lett. du sénologue* **38**:33-34
- Mayinger P (2011) Signaling at the Golgi. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: 1–14
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin R a, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F & Libra M (2006) Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv. Enzyme Regul.* **46**: 249–79
- McDaid H & Horwitz S (2001a) Selective potentiation of paclitaxel (Taxol)-induced cell death by mitogen-activated protein kinase inhibition in human cancer cell lines. *Mol. Pharmacol.* **60**: 290–301
- McDaid HM & Horwitz SB (2001b) Selective potentiation of paclitaxel (taxol)-induced cell death by mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in human cancer cell lines. *Mol. Pharmacol.* **60**: 290–301
- McDaid HM, Lopez-Barcons L, Grossman A, Lia M, Keller S, Pérez-Soler R & Horwitz SB (2005) Enhancement of the therapeutic efficacy of taxol by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 in nude mice bearing human heterotransplants. *Cancer Res.* **65**: 2854–60
- McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN & McCann A (2008) Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**: 96–132
- Mebratu Y & Tesfagzi Y (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? *Cell cycle* **8**: 1168–1175
- Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker R & Fruehauf J (1998) Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* **4**: 389–398
- van Meer G & de Kroon AIPM (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**: 5–8
- van Meer G, Voelker DR & Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 112–124
- Meloche S & Pouysségur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**: 3227–3239
- Mende I, Malstrom S, Tschlis PN, Vogt PK & Aoki M (2001) Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. *Oncogene* **20**: 4419–4423
- Mendoza MC, Emrah Er E & Blenis J (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 320–328
- Menendez J a, Lupu R & 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
- Menéndez JA, Mer Barbacid M, Montero S, Sevilla E, Escrich E, Solanas M, Cortés-Funes H & Colomer R (2001) Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **37**: 402–413

- Mercer K, Giblett S, Oakden A, Brown J, Marais R & Pritchard C (2005) A-Raf and Raf-1 work together to influence transient ERK phosphorylation and G1/S cell cycle progression. *Oncogene* **24**: 5207–5217
- Mhaidat NM, Thorne RF, Zhang XD & Hersey P (2007a) Regulation of docetaxel-induced apoptosis of human melanoma cells by different isoforms of protein kinase C. *Mol. Cancer Res.* **5**: 1073–81
- Mhaidat NM, Zhang XD, Jiang CC & Hersey P (2007b) Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Clin. Cancer Res.* **13**: 1308–14
- Mina L, Krop I, Zon RT, Isakoff SJ, Schneider CJ, Yu M, Johnson C, Vaughn LG, Wang Y, Hristova-Kazmierski M, Shonukan OO, Sledge GW & Miller KD (2009) A phase II study of oral enzastaurin in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane containing regimen. *Invest. New Drugs* **27**: 565–570
- Minami T, Kijima T, Otani Y, Kohmo S, Takahashi R, Nagatomo I, Hirata H, Suzuki M, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Kumanogoh A (2012) HER2 as therapeutic target for overcoming ATP-binding cassette transporter-mediated chemoresistance in small cell lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* **11**(4):830-41
- Minotti A, Barlow S & Cabral F (1991) Resistance to antimetabolic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* **266**: 3987–94
- Mirza AM, Gysin S, Malek N, Roberts JM, McMahan M & Nakayama K (2004) Cooperative Regulation of the Cell Division Cycle by the Protein Kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol* **24**: 10868–10881
- Mochly-Rosen D, Das K & Grimes K V (2012) Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**: 937–57
- Mochly-Rosen D, Khaner H & Lopez J (1991) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 3997–4000
- Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S & Schweneker M (2002) Regulation of Raf-Akt cross-talk. *J. Biol. Chem.* **277**: 31099–31106
- Morbidelli L, Donnini S & Ziche M (2003) Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 521–30
- Moritz a, De Graan PN, Gispen WH & Wirtz KW (1992) Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **267**: 7207–7210
- Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, Carr D, Deng Y, Jin W, Black S, Long B, Liu J, Dinunzio E, Windsor W, Zhang R, Zhao S, Angagaw MH, Pinheiro EM, Desai J, Xiao L, et al (2013) Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov.*: 742–750
- Morse DL, Gray H, Payne CM & Gillies RJ (2005) Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**: 1495–504

- Mukutmoni-Norris M, Hubbard NE & Erickson KL (2000) Modulation of murine mammary tumor vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer Lett.* **150**: 101–109
- Munnik T (2001) Phosphatidic acid: An emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* **6**: 227–233
- Murphy LO & Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 268–275
- Murphy LO, Smith S, Chen R-H, Fingar DC & Blenis J (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* **4**: 556–564
- Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QSC, Baracos VE, Reiman T & Mazurak VC (2011) Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **117**: 3774–80
- Murray M, Hraiki A, Bebawy M, Pazderka C & Rawling T (2015) Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. *Pharmacol. Ther.* **150**: 109–128
- Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D & Papadimitriou C (2012) Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* **38**: 890–903
- Neufert C, Becker C, Türeci Ö, Waldner MJ, Backert I, Floh K, Atreya I, Leppkes M, Jefremow A, Vieth M, Schneider-Stock R, Klingler P, Greten FR, Threadgill DW, Sahin U & Neurath MF (2013) Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK. *J. Clin. Invest.* **123**: 1428–1443
- Newton AC (2010) Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**: E395–E402
- Nkondjock A & Ghadirian P (2005) Facteurs de risque du cancer du sein. *Medecine/Sciences* **21**: 175–180
- Noguchi S (2006) Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Sci.* **97**: 813–820
- O'Brian C, Vogel VG, Singletary SE & Ward NE (1989) Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res.* **49**: 3215–3217
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM & Olefsky JM (2010) GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* **142**: 687–698
- Ojima I, Zuniga E, Berger W & Seitz J (2012) Tumor-targeting drug delivery of new-generation taxoids. *Futur. Med Chem.* **4**: 33–50
- Okano J & Rustgi AK (2001) Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J. Biol. Chem.* **276**: 19555–64
- Oldach L & Zhang J (2014) Genetically encoded fluorescent biosensors for live-cell visualization of protein phosphorylation. *Chem. Biol.* **21**: 186–197

- Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J & Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 359–371
- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H & Horwitz SB (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**: 7280–95
- Oshima H, Popivanova BK, Oguma K, Kong D, Ishikawa T & Oshima M (2011) Activation of epidermal growth factor receptor signaling by the prostaglandin E(2) receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. *Cancer Sci.* **102**: 713–9
- Oude Weernink P a., López De Jesús M & Schmidt M (2007) Phospholipase D signaling: Orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **374**: 399–411
- Pan Q, Bao LW, Klee CG, Sabel MS, Griffith K a, Teknos TN & Merajver SD (2005) Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Res.* **65**: 8366–71
- Di Paola M & Lorusso M (2006) Interaction of free fatty acids with mitochondria: Coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1757**: 1330–1337
- Paoletti a, Giocanti N, Favaudon V & Bornens M (1997) Pulse treatment of interphasic HeLa cells with nanomolar doses of docetaxel affects centrosome organization and leads to catastrophic exit of mitosis. *J. Cell Sci.* **110**: 2403–2415
- Di Paolo G & De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**: 651–657
- Paplomata E & O'Regan R (2014) The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **6**: 154–66
- Paradiso A. (2005) Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* **16**: iv14–iv19
- Pardini RS (2006) Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem. Biol. Interact.* **162**: 89–105
- Parker P, Justilien V, Riou P, Linch M & Fields A (2014) Atypical protein kinase C iota as human oncogene and therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* **88**: 1–11
- Partovian C & Simons M (2004) Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell. Signal.* **16**: 951–7
- Patra SK (2008) Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**: 182–206
- Pegram MD, Konecny GE, O'Callaghan C, Beryt M, Pietras R & Slamon DJ (2004) Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**: 739–749
- Peng X & Frohman M (2012) Mammalian Phospholipase D Physiological and Pathological Roles. *Acta Physiol.* **204**: 219–226
- Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R & Fainzilber M (2005) Vimentin-

- dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* **45**: 715–26
- Perou C, Sorlie T, Eisen M, Van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C, Pollack J, Ross D, Johnsen H, Aksien L, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu S, Lonning P, Borresen-Dale A, Brown P & Bolstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **409**: 747–52
- Pinto C a., Widodo E, Waltham M & Thompson EW (2013) Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity - Implications for chemoresistance. *Cancer Lett.* **341**: 56–62
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S & Seger R (2011) The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**: 1619–1633
- Plourde M & Cunnane S (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appliel Physiol. Nutr. Metab.* **32**: 619–634
- Poltorak M, Meinert I, Stone JC, Schraven B & Simeoni L (2014) Sos1 regulates sustained TCR-mediated Erk activation. *Eur. J. Immunol.* **44**: 1535–1540
- Polyak K & Metzger Filho O (2012) SnapShot: Breast Cancer. *Cancer Cell* **22**: 562–562.e1
- Quail D & Joyce J (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**: 1423–1437
- Rajaram M, Li J, Egeblad M & Powers RS (2013) System-wide analysis reveals a complex network of tumor-fibroblast interactions involved in tumorigenicity. *PLoS Genet.* **9**: e1003789
- Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS & Bernardi P (2010) Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 726–731
- Rebecca Chin Y, Yoshida T, Marusyk A, Beck A, Polyak K & Toker A (2015) Targeting Akt3 signaling in triple negative breast cancer. *Cancer Res.* **74**: 964–973
- Reiffers J & Viens P (2011) La voie de la PI3K. Dans "Les cibles intracytoplasmiques", Collection Thérapie ciblée des cancers, A. Kahn (Dir.), John Libbey (Ed.), p19.
- Rein D, Schöndorf T, Breidenbach M, Janat M, Weikelt A, Göhring U, Becker M, Mallmann P & Kurbacher C (2000) Lack of correlation between P53 expression, BCL-2 expression, apoptosis and ex vivo chemosensitivity in advanced human breast cancer. *Anticancer Res.* **20**: 2059–72
- Reszka a a, Seger R, Diltz CD, Krebs EG & Fischer EH (1995) Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 8881–5
- Ricciotti E & FitzGerald G (2011) Prostaglandins and Inflammation. *Arter. Thromb Vasc Biol.* **31**: 986–1000
- Richardson U & Wurtman R (2007) Polyunsaturated fatty acids stimulate phosphatidylcholine synthesis in PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**: 558–563
- Riese DJ & Cullum RL (2014) Epiregulin: Roles in normal physiology and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**: 49–56
- Risinger AL, Giles FJ & Mooberry SL (2009) Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer*

- Rixe O & Fojo T (2007) Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? *Clin. Cancer Res.* **13**: 7280–7287
- Rizzo M a, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung TC, Frohman M a, Watkins SC & Romero G (1999) Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 1131–1139
- Rizzo M a., Shome K, Watkins SC & Romero G (2000) The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J. Biol. Chem.* **275**: 23911–23918
- Roberts EC, Shapiro PS, Nahreini TS, Pages G, Pouyssegur J & Ahn NG (2002) Distinct Cell Cycle Timing Requirements for Extracellular Signal-Regulated Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathways in Somatic Cell Mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7226–7241
- Roché H & Vahdat L (2010) Treatment of metastatic breast cancer: second line and beyond. *Ann. Oncol.* **22**: 1000–1010
- Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K, McKinnon KM, Ahwah SM & Pardini RS (2010) Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis* **31**: 1523–30
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O & de Medina FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **401**: 318–20
- Rong G, Kang H, Wang Y, Hai T & Sun H (2013) Candidate Markers That Associate with Chemotherapy Resistance in Breast Cancer through the Study on Taxotere-Induced Damage to Tumor Microenvironment and Gene Expression Profiling of Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs). *PLoS One* **8**: 1–8
- Roodhart JML, Daenen LGM, Stigter EC a, Prins HJ, Gerrits J, Houthuijzen JM, Gerritsen MG, Schipper HS, Backer MJG, van Amersfoort M, Vermaat JSP, Moerer P, Ishihara K, Kalkhoven E, Beijnen JH, Derksen PWB, Medema RH, Martens AC, Brenkman AB & Voest EE (2011) Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **20**: 370–383
- Roovers K & Assoian RK (2000) Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* **22**: 818–826
- Rose D & Connolly J (1999) Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *Int. J. Oncol.* **15**: 1011–5
- Rose DP, Connolly JM & Coleman M (1996) Effect of omega-3 fatty acids on the progression of metastases after the surgical excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice. *Clin. Cancer Res.* **2**: 1751–6
- Rose DP, Connolly JM, Rayburn J & Coleman M (1995) Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in

- nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 587–592
- Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJM, Boeckeler K & Parker PJ (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 103–12
- Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, Ayers M, Ross JS, Zhang P, Buchholz T a, Kuerer H, Green M, Arun B, Hortobagyi GN, Symmans WF & Pusztai L (2005) Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 8315–8320
- Rovini A., Savry A., Braguer D & Carré M (2011) Microtubule-targeted agents: When mitochondria become essential to chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**: 679–688
- Ruvolo PP, Deng X & May WS (2001) Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**: 515–522
- Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, Dancey JE & Piccart-Gebhart MJ (2013) Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **39**: 935–946
- Sarbassov D, Guertin D, Ali S & Sabatini D (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (80-.).* **307**: 1098–101
- Sasagawa S, Ozaki Y, Fujita K & Kuroda S (2005) Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat. Cell Biol.* **7**: 365–373
- Sato M, Ueda Y & Umezawa Y (2006) Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes. *Nat. Methods* **3**: 797–799
- Sato SB, Park J, Kawamoto J, Sato S & Kurihara T (2013) Inhibition of constitutive Akt (PKB) phosphorylation by docosahexaenoic acid in the human breast cancer cell line MDA-MB-453. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**: 306–13
- Sawyer MB & Field CJ (2010) Possible mechanism of N-3 PUFA anti-tumor action. Dans "Dietary Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer", G. Calviello (Ed.), S. Serini (Ed.), Springer, p3-40.
- Schley PD, Brindley DN & Field CJ (2007) (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J. Nutr.* **137**: 548–553
- Schley PD, Jijon HB, Robinson LE & Field CJ (2005) Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **92**: 187–195
- Schmalz D, Kalkbrenner F, Hucho F & Buchner K (1996) Transport of protein kinase C alpha into the nucleus requires intact cytoskeleton while the transport of a protein containing a canonical nuclear localization signal does not. *J. Cell Sci.* **109**: 2401–2406
- Schmitz G & Grandl M (2008) Update on lipid membrane microdomains. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **11**: 106–112
- Schneider J, Lucas R, SancRuibal A, Tejerina A & Martin M (2000) Modulation of molecular marker

- expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. *Anticancer Res.* **20**: 4343–7
- Schneider J & Romero H (1995) Correlation of P-glycoprotein overexpression and cellular prognostic factors in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res.* **15**: 1117–21
- Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ & Parker PJ (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 790–798
- Scott AM, Antal CE & Newton AC (2013) Electrostatic and hydrophobic interactions differentially tune membrane binding kinetics of the C2 domain of protein kinase C alpha. *J. Biol. Chem.* **288**: 16905–16915
- Seidman R, Gitelman I, Sagi O, Horwitz SB & Wolfson M (2001) The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **268**: 84–92
- Serini S, Trombino S, Oliva F, Piccioni E, Monego G, Resci F, Boninsegna A, Picci N, Ranelletti FO & Calviello G (2008) Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis* **13**: 1172–83
- Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJ a, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, Markman B, Rodriguez O, Guzman M, Rodriguez S, Gili M, Russillo M, Parra JL, Singh S, Arribas J, Rosen N & Baselga J (2011) PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* **30**: 2547–57
- Sève P & Dumontet C (2008) Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* **9**: 168–175
- Sezgin C, Karabulut B, Uslu R, Sanli U, Goksel G, Zekioglu O, Ozdemir N & Goker E (2005) Potential predictive factors for response to weekly paclitaxel treatment in patients with metastatic breast cancer. *J. Chemother.* **17**: 93–103
- Shaikh IAA, Brown I, Schofield AC, Wahle KWJ & Heys SD (2008) Docosahexaenoic acid enhances the efficacy of docetaxel in prostate cancer cells by modulation of apoptosis: the role of genes associated with the NF-kappaB pathway. *Prostate* **68**: 1635–1646
- Shao J, Lee SB, Guo H, Evers BM & Sheng H (2003) Prostaglandin E2 Stimulates the Growth of Colon Cancer Cells via Induction of Amphiregulin. *Cancer Res.* **63**: 5218–5223
- Shao Y, Pardini L & Pardini R (1997) 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
- Shao Y, Pardini L & Pardini RS (1995) Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids* **30**: 1035–1045
- Shaul YD & Seger R (2007) The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1773**: 1213–1226
- Shaw RJ & Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*

- She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, DeFeo-Jones D, Huber HE & Rosen N (2008) Breast tumor cells with P13K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* **3**:e3065
- Shen H, Xu W, Luo W, Zhou L, Yong W, Chen F, Wu C, Chen Q & Han X (2011) Upregulation of *mdr1* gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma. *Exp. Hematol.* **39**: 558–569
- Shimizu T, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Beeram M, Rasco DW, Smith LS, Gunn S, Smetzer L, Mays T a., Kaiser B, Wick MJ, Alvarez C, Cavazos A, Mangold GL & Patnaik A (2012) The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**: 2316–2325
- Shin JJ & Loewen CJ (2011) Putting the pH into phosphatidic acid signaling. *BMC Biol.* **9**: 85
- Shin S, Jing K, Jeong S, Kim N, Song K, Heo J, Park J, Seo K, Han J, Park J, Kweon G, Park S, Wu T, Hwang B & Lim K (2013) The Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA Induces Simultaneous Apoptosis and Autophagy via Mitochondrial ROS-Mediated Akt-mTOR Signaling in Prostate Cancer Cells Expressing Mutant p53. *BioMed Research Int.* **2013**:11p
- Shinohara-Gotoh Y, Nishida E, Hoshi M & Sakai H (1991) Activation of microtubule-associated protein kinase by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 cells. *Exp. Cell Res.* **193**: 161–166
- Siddiqui R a & Yang YC (1995) Interleukin-11 induces phosphatidic acid formation and activates MAP kinase in mouse 3T3-L1 cells. *Cell. Signal.* **7**: 247–259
- Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569–72
- Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ & Malbon CC (1997) Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* **99**: 1478–1483
- Smith ER, Smedberg JL, Rula ME & Xu XX (2004) Regulation of Ras-MAPK pathway mitogenic activity by restricting nuclear entry of activated MAPK in endoderm differentiation of embryonic carcinoma and stem cells. *J. Cell Biol.* **164**: 689–699
- Song MS, Salmena L & Pandolfi PP (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**: 283–296
- Sonnenburg ED, Gao T & Newton AC (2001) The Phosphoinositide-dependent Kinase, PDK-1, Phosphorylates Conventional Protein Kinase C Isozymes by a Mechanism That Is Independent of Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **276**: 45289–45297
- Sos ML, Fischer S, Ullrich R, Peifer M, Heuckmann JM, Koker M, Heynck S, Stückrath I, Weiss J, Fischer F, Michel K, Goel A, Regales L, Politi K a, Perera S, Getlik M, Heukamp LC, Ansén S, Zander T, Beroukhim R, et al (2009) Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 18351–18356
- Spector A (1967) The Importance of Free Fatty Acid in Tumor Nutrition. *Cancer Res.* **27**: 1580–1586
- Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C, Spencer D, Berry D, Steward W & Dennison A

- (2009) The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur. J. Cancer* **45**: 2077–2086
- Stace CL & Ktistakis NT (2006) Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**: 913–926
- Stahelin R V (2009) Lipid binding domains: more than simple lipid effectors. *J. Lipid Res.* **50 (Suppl)**: S299–S304
- Stahelin R V, Digman M a, Medkova M, Ananthanarayanan B, Rafter JD, Melowic HR & Cho W (2004) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cdelta. *J. Biol. Chem.* **279**: 29501–29512
- Stahelin R V., Digman M a., Medkova M, Ananthanarayanan B, Melowic HR, Rafter JD & Cho W (2005) Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: Mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon *J. Biol. Chem.* **280**: 19784–19793
- Staubach S & Hanisch F-G (2011) Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev. Proteomics* **8**: 263–277
- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf CR, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Ivanic DM, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A & Bonati A (2011) Roles of the Raf / MEK / ERK and PI3K / PTEN / Akt / mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* **3(3)**: 192–222
- Steinberg SF (2008) Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiol. Rev.* **88**: 1341–1378
- Stillwell W, Shaikh S, Zerouga M, Siddiqui R & Wassall S (2005) Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**: 559–579
- Sturlan S, Baumgartner M, Roth E & Bachleitner-hofmann T (2003) Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide – mediated apoptosis in arsenic trioxide – resistant HL-60 cells. **101**: 4990–4997
- Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE & Hu FB (2007) Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**: 74–81
- Suzuki H, Manabe S, Wada O & Crawford M (1997) Rapid incorporation of docosahexaenoic acid from dietary sources into brain microsomal, synaptosomal and mitochondrial membranes in adult mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **67**: 272–8
- Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK, Shen J & Sledge G.W. J (2001) 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.* **61**: 3369–3372
- Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, Perkins a B, Kim AY, Demaria S, Yee HT, McMullen H, Oratz R, Klein P, Formenti SC & Muggia F (2000) Paclitaxel-induced Apoptosis and Mitotic Arrest Assessed by Serial Fine-Needle Aspiration : Implications for Early Prediction of Breast Cancer Response to Neoadjuvant Treatment Advances in Brief Paclitaxel-induced Apoptosis and

Mitotic Arrest Assessed by . **6**: 4610–4617

- Szymczak M, Murray M & Petrovic N (2008) Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood* **111**: 3514–3521
- Takahashi T, Ueno H & Shibuya M (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18**: 2221–2230
- Tam WL, Lu H, Buikhuisen J, Soh BS, Lim E, Wu ZJ, Krall JA, Bierie B, Guo W, Chen X, Liu XS, Brown M, Lim B & Weinberg RA (2014) Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer Cell* **24**: 347–364
- Tapiero H, Nguyen Ba G, Couvreur P & Tew KD (2002) Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **56**: 215–222
- Terrano DT, Upreti M & Chambers TC (2010) Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **30**: 640–656
- Tong RT, Boucher Y, Kozin S V., Winkler F, Hicklin DJ & Jain RK (2004) 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.* **64**: 3731–3736
- Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y & Nishida E (2006) ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci.* **97**: 697–702
- Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N & Foster D a (2009) Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 1411–20
- Totoń E, Ignatowicz E, Skrzeczkowska K & Rybczyńska M (2011) Protein kinase Cε as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacol. Rep.* **63**: 19–29
- Treinin I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R & Marshall CJ (1999) Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 321–329
- Tsukamoto F, Shiba E, Taguchi T, Watanabe T, Kim S, Tanji Y, Kimoto Y, Izukura M & Takai S (1997) Immunohistochemical Detection of P-glycoprotein in Breast Cancer and Its Significance as a Prognostic Factor. *Breast Cancer* **4**: 259–263
- Tsuzuki T, Shibata A, Kawakami Y, Nakagawa K & Miyazawa T (2007) Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the migration of human umbilical vein endothelial cells. *J. Nutr.* **137**: 641–646
- Ueda Y, Hirai SI, Osada SI, Suzuki a, Mizuno K & Ohno S (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J. Biol. Chem.* **271**: 23512–9
- Ueda Y, Ishitsuka R, Hullin-Matsuda F & Kobayashi T (2014) Regulation of the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane. *Biochimie* **107**: 43–50

- Ussar S & Voss T (2004) MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J. Biol. Chem.* **279**: 43861–43869
- Vakifahmetoglu H, Olsson M & Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* **15**: 1153–1162
- Vaughan VC, Hassing M-R & Lewandowski P a (2013) Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. *Br. J. Cancer* **108**: 486–92
- Veverka V, Crabbe T, Bird I, Lennie G, Muskett FW, Taylor RJ & Carr MD (2008) Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* **27**: 585–595
- Vibet S (2008) 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 de Doctorat de l'Université François Rabelais de Tours.
- Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens J-P, Goré J & Mahéo K (2008) Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic. Biol. Med.* **44**: 1483–91
- Vibet S, Mahéo K, Goré J, Dubois P, Bougnoux P & Chourpa I (2007) Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines. *Drug Metab. Dispos.* **35**: 822–828
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M & Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 385–392
- Wallin JJ, Guan J, Prior WW, Lee LB, Berry L, Belmont LD, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Sampath D (2012) GDC-0941, a novel class I selective PI3K inhibitor, enhances the efficacy of docetaxel in human breast cancer models by increasing cell death in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **18**(14):3901-11
- Wang H, Vo T, Hajar A, Li S, Chen X, Parissenti AM, Brindley DN & Wang Z (2014a) Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* **14**: 37
- Wang KZQ, Zhu J, Dagda RK, Uechi G, Cherra SJ, Gusdon AM, Balasubramani M & Chu CT (2014b) ERK-mediated phosphorylation of TFAM downregulates mitochondrial transcription. *Mitochondrion* **17**: 132–140
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W & Welti R (2006a) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* **45**: 250–278
- Wang Y, Li L, Jiang W, Yang Z & Zhang Z (2006b) Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**: 2974–2977
- Wang Z (2014) Taxane resistance in Breast Cancer. *Cancer cell & Microenvironment* **1**: e126
- Wang Z, Butt K, Wang L & Liu H (2007) The Effect of Seal Oil on Paclitaxel Induced Cytotoxicity and Apoptosis in Breast Carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Nutr. Cancer* **58**: 230–38

- Wannous R, Bon E, Gillet L, Chamouton J, Weber G, Brisson L, Goré J, Bougnoux P, Besson P, Roger S & Chevalier S (2014) Suppression of PPAR β , and DHA treatment, inhibit NaV1.5 and NHE-1 pro-invasive activities. *Pflugers Arch.* **467**(6):1249-59
- Wannous R, Bon E, Mahéo K, Goupille C, Chamouton J, Bougnoux P, Roger S, Besson P & Chevalier S (2013) PPAR β mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**: 1618–25
- Wary KK, Thakker GD, Humtsoe JO & Yang J (2003) Analysis of VEGF-responsive genes involved in the activation of endothelial cells. *Mol. Cancer* **2**: 25
- Watkins SM, Carter LC & German JB (1998) Docosahexaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production. *J. Lipid Res.* **39**: 1583–8
- Ways DK, Kukoly C a, deVente J, Hooker JL, Bryant WO, Posekany KJ, Fletcher DJ, Cook PP & Parker PJ (1995) MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J. Clin. Invest.* **95**: 1906–1915
- Weis SM & Cheresh D a (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* **17**: 1359–1370
- Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, Helgason E, Ernst J a, Eby M, Liu J, Belmont LD, Kaminker JS, O'Rourke KM, Pujara K, Kohli PB, Johnson AR, Chiu ML, Lill JR, Jackson PK, Fairbrother WJ, et al (2011) Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* **471**: 110–114
- Wetzker R & Böhmer F-D (2003) Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 651–657
- Won JK, Yang HW, Shin SY, Lee JH, Heo W Do & Cho KH (2012) The crossregulation between ERK and PI3K signaling pathways determines the tumoricidal efficacy of MEK inhibitor. *J. Mol. Cell Biol.* **4**: 153–163
- Wortzel I & Seger R (2011) The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* **2**: 195–209
- Wu W, Shu X, Hovsepyan H, Mosteller RD & Broek D (2003) VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* **22**: 3361–3370
- Wymann MP & Schneider R (2008) Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 162–176
- Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR & King GL (1996) Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J. Clin. Invest.* **98**: 2018–2026
- Xue M, Wang Q, Zhao J, Dong L, Ge Y, Hou L, Liu Y & Zheng Z (2014) Docosahexaenoic acid inhibited the Wnt/ β -Catenin pathway and suppressed breast cancer cells in vitro and in vivo. *J. Nutr. Biochem.* **25**: 104–110
- Yacoub A, Gilfor D, Hawkins W, Park MA, Hanna D, Curiel DT, Fisher PB, Grant S & Dent P (2006) MEK1/2 Inhibition Promotes Taxotere Lethality in Mammary Tumors. *Cancer Biol. Ther.* **5**: 1332–1339

- Yacoub A, Han SI, Caron R, Gilfor D, Mooberry S, Grant S & Dent P (2003) Sequence Dependent Exposure of Mammary Carcinoma Cells to Taxotere and the MEK1/2 Inhibitor U0126 Causes Enhanced Cell Killing In Vitro. *Cancer Biol. Ther.* **2**: 670–676
- Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E (2006) Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr. Biol.* **16**(12):1171-82
- Yang C & Kazanietz MG (2003) Divergence and complexities in DAG signaling: Looking beyond PKC. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**: 602–608
- Yang X, Uziely B, Groshen S, Lukas J, Israel V, Russell C, Dunnington G, Formenti S, Muggia F & Press M (1999) MDR1 gene expression in primary and advanced breast cancer. *Lab. Investig.* **79**: 271–80
- Yao H, Chang Y, Lan S, Chen C, Hsu J & Yeh T (2006) The inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on human CYP enzymes. *Life Sci.* **79**: 2432–40
- Yao Z & Seger R (2009) The ERK signaling cascade-views from different subcellular compartments. *BioFactors* **35**: 407–416
- Yared J a. & Tkaczuk KHR (2012) Update on taxane development: New analogs and new formulations. *Drug Des. Devel. Ther.* **6**: 371–384
- Yasuda T & Kurosaki T (2008) Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle* **7**: 3634–3640
- Yasumizu Y, Miyajima A, Kosaka T, Miyazaki Y, Kikuchi E & Oya M (2014) Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Sensitizes Docetaxel in Castration Resistant Prostate Cancer. *J. Urol.* **191**: 227–234
- Yeagle P (1989) Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* **3**: 1833–42
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, Mccleskey EW & Stork PJS (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Lett. to Nat.* **392**: 622–626
- Yu C, Wang S, Dent P & Grant S (2001) Sequence-dependent potentiation of paclitaxel-mediated apoptosis in human leukemia cells by inhibitors of the mitogen-activated protein kinase kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Pharmacol.* **60**: 143–54
- Yu D (2001) Mechanisms of ErbB2-mediated paclitaxel resistance and trastuzumab-mediated paclitaxel sensitization in ErbB2-overexpressing breast cancers. *Semin. Oncol.* **28**: 7–12
- Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ & Hung MC (1998) Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol. Cell* **2**: 581–591
- Yvon A, Wadsworth P & Jordan M (1999) Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol. Biol. Cell* **10**(4):947-59
- Zehorai E, Yao Z, Plotnikov A & Seger R (2010) The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.* **314**: 213–20

- Zhang F, Wang Z, Lu M, Yonekubo Y, Liang X, Zhang Y, Wu P, Zhou Y, Grinstein S, Hancock JF & Du G (2014) Temporal production of the signaling lipid phosphatidic Acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 84–95
- Zhang G, Panigrahy D, Mahakian LM, Yang J, Liu J, Sing K & Lee S (2013) Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis , tumor growth , and metastasis.
- Zhang J, Iwanaga K, Choi KC, Wislez M, Raso MG, Wei W, Wistuba II & Kurie JM (2008) Intratumoral epiregulin is a marker of advanced disease in non-small cell lung cancer patients and confers invasive properties on EGFR-mutant cells. *Cancer Prev. Res.* **1**: 201–7
- Zhao B, Sun Y, Wang S, Duan L, Huo Q, Ren F & Li G (2013) Grape Seed Procyanidin Reversal of P-glycoprotein Associated Multi-Drug Resistance via Down-regulation of NF- κ B and MAPK/ERK Mediated YB-1 Activity in A2780/T Cells. *PLoS One* **8**: e71071
- Zhao C, Du G, Skowronek K, Frohman M a & Bar-Sagi D (2007) Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos. *Nat. Cell Biol.* **9**: 706–712
- Zhou L, Tan X, Kamohara H, Wang W, Wang B, Liu J, Egami H, Baba H & Dai X (2010) MEK1 and MEK2 isoforms regulate distinct functions in pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.* **24**: 251–5
- Zhou Y, Liang H, Rodkey T, Ariotti N, Parton RG & Hancock JF (2014) Signal integration by lipid-mediated spatial cross talk between Ras nanoclusters. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 862–76
- Zhou Y, Wong C, Cho K, van der Hoeven D, Liang H, Thakur D, Luo J, Babic M, Zinsmaier K, Zhu M, Hu H, Venkatachalam K & Hancock J (2015) Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling. *Science*. **349**:873-876 (
- Zou Z, Bellenger S, Massey K a, Nicolaou A, Geissler A, Bidu C, Bonnotte B, Pierre A-S, Minville-Walz M, Rialland M, Seubert J, Kang JX, Lagrost L, Narce M & Bellenger J (2013) Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice. *J. Lipid Res.* **54**: 3453–63

Travaux universitaires

KORNFELD, Sophie. *La vascularisation tumorale : une cible thérapeutique des acides gras polyinsaturés n-3 pour sensibiliser les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux.*

Thèse de Doctorat, Université F.Rabelais de Tours, 1^{er} Décembre 2011, 240 p.

VIBET, Sophie. *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 de Doctorat, Université F.Rabelais de Tours, 27 Novembre 2008, 197 p.

WANNOUS, Ramez. *L'inhibition du récepteur nucléaire PPAR β diminue la croissance et l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires humaines.* Thèse de Doctorat, Université F.Rabelais de Tours, 15 Octobre 2014, 119 p.

Sites web consultés

Clinical Trials, www.clinicaltrials.gov

Fondation pour la Recherche Médicale en France, www.frm.orf

Globocan 2012, www.globocan.iarc.fr

NCBI gene, www.ncbi.nlm.gov/gene

UniProtKB, www.uniprot.org/help/uniprotkb

Voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des tumeurs mammaires au docétaxel par les acides gras polyinsaturés n-3

Résumé

La résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie constitue une cause majeure d'échec des traitements anticancéreux. Des études précliniques montrent que les acides gras polyinsaturés oméga-3 à longues chaînes (AGPI n-3LC), apportés par l'alimentation, améliorent l'efficacité des chimiothérapies sans majorer les effets secondaires. Cette thèse a eu pour but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires au docétaxel. Nous avons montré que le docétaxel induit un mécanisme de résistance via l'activation des voies de signalisation PKC/ERK et Akt impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires. La modification de l'environnement lipidique membranaire par la supplémentation en AGPI n-3LC inhibe ces voies de signalisation et augmente l'efficacité du docétaxel dans des lignées tumorales mammaires et dans un modèle préclinique de tumeurs mammaires autochtones chez le rongeur. De plus, dans ce modèle *in vivo*, nous avons identifié une autre cible moléculaire régulée par les AGPI n-3LC : l'épiréguline, membre de la famille EGF. Les AGPI n-3LC bloquent l'induction de l'épiréguline par le VEGF dans les cellules endothéliales et induisent un remodelage de la vascularisation tumorale. Outre un effet direct des AGPI n-3LC sur les cellules tumorales, les AGPI n-3LC agissent sur le microenvironnement tumoral. Ces travaux de thèse apportent des arguments supplémentaires pour l'utilisation des AGPI n-3LC comme molécules adjuvantes pour lutter contre la résistance des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux.

Mots clés : acides gras polyinsaturés oméga 3 à longues chaînes, acide docosahéxanoïque, cancer du sein, chimiosensibilisation, docétaxel, voies de signalisation.

Abstract

Chemotherapy-resistant tumor cells are a major cause of cancer treatment failure. Preclinical studies show that polyunsaturated omega-3 long chain fatty acids (AGPI n-3LC), provided by food, improve the efficacy of chemotherapy without increasing side effects. AGPI n-3LCs are incorporated in cancer and stromal cells. This thesis aimed to identify molecular mechanisms involved in the increased sensitivity of mammary tumor cells to docetaxel. We have shown that docetaxel induces a resistance mechanism via activation of PKC/ERK and Akt pathways involved in cell proliferation and survival. Modification of the membrane lipid environment by AGPI n-3LCs supplementation inhibits these signaling pathways and increases the efficacy of docetaxel in mammary tumor cell lines and in a preclinical rodent model of native mammary tumors. Moreover, in this mammary tumor model we have found another molecular target regulated by AGPI n-3LCs: epiregulin, a member of the EGF family. AGPI n-3LCs inhibit epiregulin-VEGF induced in endothelial cells and induce a remodeling of tumor vasculature. Furthermore, AGPI n-3LCs act on the tumor microenvironment directly. This thesis work provides additional arguments for the use of AGPI n-3LCs as adjuvant molecules to reduce the resistance of breast tumors to anticancer agents.

Keywords: Polyunsaturated omega-3 long chain fatty acids, docosahexanoic acid, breast cancer, chemosensitization, docetaxel, signaling pathways.