

**ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies**

**Unité Inserm U921 – Nutrition Croissance et Cancer**

## THÈSE

présentée par :

**Sophie KORNFELD**

soutenue le : 1<sup>er</sup> décembre 2011

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

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

**La vascularisation tumorale : une cible thérapeutique  
des acides gras polyinsaturés n-3 pour sensibiliser les  
tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux.**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme MAHEO Karine**

Maître de conférences des universités - HDR, Université F. Rabelais - Tours

**Et co-encadrée par :**

**M. CHAMPEROUX Pascal**

Directeur R&D, CERB- Baugy

**RAPPORTEURS :**

**M. MOULINOUX Jacques**

Professeur des universités, Université Rennes 1

**M. PIERRE Fabrice**

Chargé de recherche- HDR, INRA - Toulouse

**JURY :**

**M. BOUGNOUX Philippe**

Professeur des universités, Université F. Rabelais - Tours

**M. CHAMPEROUX Pascal**

Directeur R&D, CERB- Baugy

**M. LAGENTE Vincent**

Professeur des universités, Université Rennes 1

**Mme MAHEO Karine**

Maître de conférences des universités - HDR, Université F. Rabelais – Tours

**Mme MAUPOIL Véronique**

Professeur des universités, Université F. Rabelais - Tours

**M. MOULINOUX Jacques**

Professeur des universités, Université Rennes 1

**M. PIERRE Fabrice**

Chargé de recherche- HDR, INRA - Toulouse

**M. SCHNELL Christian**

Directeur R&D, NOVARTIS – Suisse



## Résumé

**Contexte.** Des études cliniques ont montré qu'une teneur importante d'acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) dans le tissu adipeux était associée à une meilleure efficacité de la chimiothérapie. Ces résultats cliniques sont renforcés par de nombreuses études chez les rongeurs qui ont montré que les AGPI n-3 sensibilisaient les tumeurs à différents traitements anticancéreux. Des études précédentes menées au laboratoire sur un modèle de tumeurs mammaires chimioinduites chez le rat ont montré que les AGPI n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA, et acide eicosapentaénoïque, EPA), apportés par un régime nutritionnel, sensibilisaient les tumeurs à différents agents chimiothérapeutiques tels que les anthracyclines ou les taxanes. L'étude échographique a montré que la densité vasculaire était diminuée dans les tumeurs enrichies en AGPI n-3, et cela avant même de commencer la chimiothérapie. Ces résultats semblent paradoxaux car la diminution de la quantité vasculaire pourrait aboutir à la formation de zones hypoxiques et à l'élévation de la pression interstitielle tumorale et compromettre l'efficacité des agents anticancéreux. Notre hypothèse est que les AGPI n-3 améliorent la qualité vasculaire entraînant ainsi une plus grande efficacité des thérapies anticancéreuses.

**Objectif.** Le but de ce travail de thèse a été de déterminer si les AGPI n-3 pouvaient moduler la qualité vasculaire, notamment en régulant la pression interstitielle et l'hypoxie tumorales, paramètres impliqués dans la mauvaise distribution de l'agent anticancéreux et dans la résistance des tumeurs. Les différentes étapes de l'angiogenèse ont été modélisées *in vitro*. L'induction par le VEGF de ces différentes étapes a été étudié dans des cellules endothéliales HUVEC enrichies ou non en DHA. Nous avons également étudié l'effet du DHA sur l'activation de la voie de signalisation induite par le VEGF, la voie VEGF/NO synthase endothéliale.

**Résultats.** Dès deux heures après une injection de docétaxel, nous avons montré que la pression interstitielle était diminuée significativement de 16 % dans le groupe nutritionnel AGPI n-3. 48 heures après l'injection, cette diminution atteint 25 %. La différence entre les deux groupes nutritionnels (contrôle et AGPI n-3) est maintenue durant les 7 jours de mesure de la pression interstitielle. Nous avons également montré que l'extravasation du bleu d'Evans était augmentée de 3 fois dans les tumeurs du groupe AGPI n-3. Enfin, la diminution de

l'activation de la eNOS que nous avons observé dans les tumeurs mammaires du groupe AGPI n-3 et dans les cellules endothéliales en culture enrichies en DHA, indique que les AGPI n-3 interfèrent avec la voie de synthèse du NO.

**Conclusion.** Ces travaux ont donc montré que les AGPI n-3 améliorent la fonctionnalité de la vascularisation tumorale puisqu'une diminution de la pression interstitielle et une augmentation de l'extravasation du bleu d'Evans ont été observées. Ces observations suggèrent que les AGPI n-3 sensibilisent les tumeurs mammaires aux agents anticancéreux en augmentant la distribution des agents anticancéreux. Ainsi, l'apport d'AGPI n-3 aux patients durant la chimiothérapie pourrait être une stratégie thérapeutique pour normaliser la vascularisation tumorale et de ce fait augmenter l'efficacité des thérapies anticancéreuses.

**Mots clés :** Acides gras polyinsaturés n-3, cancer du sein, vascularisation tumorale, angiogenèse, chimiothérapie, pression interstitielle, VEGF, NO synthase endothéliale, NO.

## Abstract

**Background.** Clinical studies reported that n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) amount in adipose tissue of patients is associated to a better efficacy of chemotherapy. Beneficial role of n-3 PUFA during treatment of breast carcinomas is supported by several preclinical studies in rodent. Thus, in a model of rat mammary tumors, studies conducted in our laboratory showed that n-3 PUFA (docosahexaenoic acid, DHA and eicosapentaenoic acid, EPA) enriched diet sensitize tumors to chemotherapeutic agents such as anthracyclines or taxanes (Docetaxel). This sensitization involves the regulation of tumor vasculature. Indeed, a nutritional diet with EPA / DHA, in combination with taxane chemotherapy (docetaxel) decreases the vascular quantity (anti-angiogenic effect). This is a paradox. Indeed, a decrease of vascular density could compromise anticancer drug delivery and efficacy. We hypothesized that n-3 PUFA improve tumor vascular quality and thus, lead to a better anticancer therapies efficacy.

**Aim.** The aim of this thesis was to determine if n-3 PUFA could modulate vascular quality, in particular by modulating the interstitial fluid pressure and the tumor oxygenation, two factors that repress drug delivery and efficacy within tumors. To study anti-angiogenic effect of DHA, angiogenesis steps (such as proliferation, migration, tubulogenesis of endothelial cells) were modelised in vitro using primary endothelial cells (HUVEC). Finally, we defined DHA effect on the signaling pathway induced by VEGF: the VEGF/endothelial NO synthase pathway.

**Results.** Using pressure sensor implanted in rat mammary tumors, we showed that interstitial fluid pressures within tumors were not different in control or n-3 PUFA-enriched tumors (15 mm Hg). A single docetaxel injection led to a more marked decrease of interstitial fluid pressure in n-3 PUFA group compared to control group with -16% at 2 hours and -25% at 48 hours. This difference between the two nutritional groups persists seven days after docetaxel injection. Moreover, we showed that Evans blue extravasation was increase by 3-fold in n-3 PUFA tumors. In vitro, DHA repressed all steps of angiogenesis induced by VEGF. A decreased activation of eNOS in n-3 PUFA tumors and in DHA-enriched HUVEC, points toward a PUFA-induced disruption of NO signaling pathway.

**Conclusion.** This work showed that n-3 PUFA normalize tumor vasculature functions. Decrease of interstitial fluid pressure and increase of Evans blue extravasation suggest that n-3 PUFA increase anticancer drug efficacy improving the drug uptake within tumors. In clinic,

n-3 PUFA supplementation during chemotherapy might be a therapeutic strategy to normalize tumor vascularization and enhance efficacy anticancer therapy.

**Key words:** n-3 polyunsaturated fatty-acids, breast cancer, tumor vascularization, angiogenesis, chemotherapy, interstitial fluid pressure, VEGF, endothelial NO synthase, NO.



# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract .....	5
Table des matières .....	8
Liste des tableaux .....	13
Liste des figures .....	15
Liste des annexes.....	18
Introduction générale.....	19
Introduction .....	21
I. Le cancer du sein.....	22
A. Epidémiologie du cancer du sein .....	22
1. Situation dans le monde (Globocan 2008) .....	22
2. Situation en France (INCa 2010) .....	23
3. Facteurs de risques .....	24
B. La chimiothérapie dans le cancer du sein.....	29
1. Stratégies thérapeutiques.....	29
2. Différentes classes d'agents chimiothérapeutiques.....	34
C. Limites de la chimiothérapie .....	38
1. Effets secondaires de la chimiothérapie .....	38
2. Résistances des tumeurs .....	39
II. La vascularisation tumorale .....	42
A. Caractéristiques de la vascularisation tumorale .....	42
1. Architecture des vaisseaux en conditions physiologiques .....	42
2. Désorganisation de l'architecture vasculaire dans une tumeur .....	48
B. Formation des vaisseaux tumoraux .....	52
1. L'hypoxie, un facteur déclencheur de l'angiogenèse tumorale.....	52
2. Switch angiogénique .....	54
3. Formation de nouveaux vaisseaux tumoraux .....	64
III. L'hypoxie et la pression interstitielle : paramètres impliqués dans la résistance des tumeurs aux agents anticancéreux .....	66
A. Hypoxie tumorale.....	66
1. Hypoxie et résistance des tumeurs aux traitements.....	66
2. Mécanismes induits par l'hypoxie impliqués dans la résistance des tumeurs.....	69

B.	Pression interstitielle tumorale.....	76
1.	Elévation de la pression interstitielle (PI) dans les tumeurs.....	76
2.	Conséquences d'une pression interstitielle tumorale élevée.....	78
3.	Stratégies moléculaires pour diminuer la pression interstitielle.....	82
C.	Le microenvironnement tumoral : une cible thérapeutique pour améliorer les traitements anticancéreux ?.....	85
1.	Stratégie de régulation de la vascularisation tumorale.....	85
2.	Stratégie de régulation du stroma tumoral.....	91
3.	Stratégie de régulation du réseau lymphatique.....	92
IV.	Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO).....	93
A.	Rôles physiologiques du NO.....	94
B.	Biosynthèse du NO par les NO synthases.....	95
1.	Régulation de la NOS inducible (iNOS).....	98
2.	Régulation de la NOS endothéliale (eNOS).....	99
C.	Rôles du NO et de la eNOS dans la progression tumorale.....	103
1.	Rôle du NO dans l'angiogenèse.....	103
2.	Rôle du NO dans la formation de métastases.....	104
V.	Acides gras oméga-3 et cancer.....	106
A.	Généralités.....	106
1.	Structure et nomenclature des acides gras.....	106
2.	Biosynthèse et métabolisme des AGPI.....	109
3.	Sources alimentaires, transport et répartition tissulaire des acides gras.....	112
B.	Sensibilisation des tumeurs par les AGPI n-3.....	115
1.	Les AGPI n-3 apportés par l'alimentation sensibilisent les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux.....	116
2.	Mécanismes d'action des AGPI n-3 au niveau des cellules tumorales.....	120
3.	Mécanismes d'action des AGPI au niveau des cellules endothéliales.....	130
	Objectifs de la thèse.....	132
I.	Travaux précédents à la thèse.....	134
II.	Objectifs de la thèse.....	138
A.	Effets d'une supplémentation du régime alimentaire en AGPI n-3 sur la qualité de la vascularisation.....	138
B.	Effets du DHA sur les étapes de l'angiogenèse modélisées <i>in vitro</i> .....	139

C.	Déterminer les cibles moléculaires impliquées dans l'effet anti-angiogénique des AGPI n-3 .....	139
	Matériels et méthodes.....	140
I.	Mesure <i>in vivo</i> des paramètres fonctionnels de la vascularisation tumorale.....	141
A.	Chronologie de l'expérimentation animale .....	141
B.	Induction des tumeurs mammaires.....	142
C.	Intervention nutritionnelle et suivi de la croissance tumorale.....	142
D.	Mesure de la pression interstitielle (PI).....	143
E.	Chimiothérapie .....	145
F.	Mesure de l'extravasation d'une molécule et autopsie .....	145
G.	Empreinte vasculaire des tumeurs.....	146
II.	Culture cellulaire .....	148
A.	Type de cellules utilisées.....	148
B.	Culture des cellules .....	148
C.	Mesure de la prolifération des cellules endothéliales (test MTT).....	149
D.	Mesure de la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales.....	150
E.	Tubulogenèse en 2-dimensions .....	151
F.	Migration des cellules HUVEC en chambre de Boyden.....	152
G.	Migration transendothéliale des cellules tumorales .....	153
III.	Identification des cibles moléculaires des AGPI n-3 .....	156
A.	Etude par western blotting de la voie de signalisation VEGF/AKT/eNOS. ....	156
1.	Extraction et dosage des protéines .....	156
2.	Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	159
3.	Électrotransfert des protéines sur membrane PVDF .....	160
4.	Hybridation des anticorps et révélation.....	160
B.	Exploration des gènes impliqués dans l'angiogenèse par PCR quantitative.....	162
1.	Extraction des ARN .....	162
2.	Dosage des ARN .....	163
3.	Transcription inverse des ARN en ADN complémentaire.....	163
4.	Quantification des ARN : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (Q-PCR).....	164
C.	Mesure de la quantité de VEGF-A dans le sérum.....	167
IV.	Analyse statistiques .....	169
	Résultats .....	170

I.	Mise au point de la méthode de mesure de la pression interstitielle dans les tumeurs de rats.	171
A.	Evolution de la pression interstitielle tumorale en fonction du rythme nyctéméral de l'animal.....	171
B.	Effet de la vinblastine et de la prednisolone sur la pression interstitielle .....	172
C.	Effet de l'anesthésie sur la pression interstitielle .....	174
D.	Effet du docétaxel sur la pression interstitielle dans notre modèle de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU. ....	175
E.	Conclusion de l'étude de mise au point de la technique de mesure de la pression interstitielle par téléométrie.....	176
II.	Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale. ....	178
A.	Modulation de la vascularisation tumorale par les AGPI n-3 .....	178
B.	Effet du docétaxel et des AGPI n-3 sur l'hypoxie des tumeurs. ....	179
C.	Effet des AGPI n-3 sur la pression interstitielle des tumeurs.....	180
D.	Extravasation tissulaire du bleu d'Evans. ....	184
III.	Effet du DHA sur les propriétés des cellules endothéliales : modélisation <i>in vitro</i> des différentes étapes de l'angiogenèse.....	186
A.	Effet du DHA sur la prolifération des cellules HUVEC .....	186
B.	Tubulogenèse .....	187
C.	Perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales .....	187
D.	Migration des cellules endothéliales .....	188
IV.	Mécanismes d'action du DHA .....	190
A.	Régulation de la synthèse du VEGF .....	190
B.	Analyse de la voie de signalisation VEGF / Akt / eNOS.....	192
1.	Effet des AGPI n-3 sur la voie de signalisation VEGF / AKT / eNOS dans les cellules endothéliales.....	193
2.	Effet des AGPI n-3 et du docétaxel sur l'expression de la eNOS dans les tumeurs mammaires. ....	195
3.	Effet des AGPI n-3 sur la voie de signalisation VEGF / AKT / eNOS dans les cellules tumorales mammaires. ....	196
V.	Article.....	200
VI.	Résultats complémentaires .....	201
A.	Effet du DHA sur la sensibilité des cellules HUVEC au docétaxel.....	201
B.	Effet du DHA dans la migration transendothéliale des cellules tumorales.....	202

Discussion et perspectives.....	204
Annexes.....	215
Bibliographie.....	217
Résumé.....	240
Abstract.....	240

## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Facteurs de risques du cancer du sein.</b> .....	25
<b>Tableau II : Stades de 0 à IV obtenus grâce à la classification TNM des tumeurs.</b> .....	30
<b>Tableau III : Facteurs régulant l'angiogenèse.</b> .....	55
<b>Tableau IV : Valeurs de pression partielle en oxygène (PO<sub>2</sub>) dans plusieurs types de cancers en comparaison avec les tissus normaux.</b> .....	67
<b>Tableau V : Pression interstitielle (mm Hg) mesurée au niveau de tissus sains et de plusieurs types de tumeurs humaines.</b> .....	76
<b>Tableau VI : Stratégies moléculaires pour diminuer la pression interstitielle tumorale.</b>	84
<b>Tableau VII : Localisation tissulaires et cellulaires des NOS.</b> .....	97
<b>Tableau VIII : Nomenclatures systématique (selon la nomenclature des chimistes) et commune des principaux acides gras ainsi que leur formule simplifiée (selon la nomenclature des physiologistes).</b> .....	109
<b>Tableau IX : Principales sources alimentaires des différentes classes d'acides gras.</b> ....	113
<b>Tableau X : Sensibilisation des tumeurs mammaires par les AGPI n-3, données expérimentales <i>in vivo</i>.</b> .....	118
<b>Tableau XI : Composition en acides gras des phospholipides des tumeurs de rats nourris avec un régime contrôle ou un régime enrichi en AGPI n-3.</b> .....	135
<b>Tableau XII : Composition en acide gras des régimes nutritionnels contrôle et AGPI n-3.</b> .....	143
<b>Tableau XIII : Composition du milieu de Krebs-Henseleit utilisé pour la perfusion des rats.</b> .....	147
<b>Tableau XIV : Composition du tampon d'extraction des protéines.</b> .....	157
<b>Tableau XV : Composition du tampon d'échantillon 5X</b> .....	159
<b>Tableau XVI : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les études en western blotting.</b> .....	161
<b>Tableau XVII : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'étude des gènes VEGF-B et CAIX. (HPRT et RPL13, sont les gènes de ménages)</b> .....	167
<b>Tableau XVIII : Effet du DHA (22:6 n-3) et de l'acide oléique (18:1 n-9) sur la prolifération des HUVEC.</b> .....	186
<b>Tableau XIX : Régulation par les AGPI n-3 de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse dans les tumeurs de rats traitées par le docétaxel.</b> .....	191
<b>Tableau XX : Effet des AGPI n-3 et du docétaxel sur les taux de VEGF-A sérique.</b> ....	192

<b>Tableau XXI : Cinétique de la phosphorylation de la protéine AKT dans les cellules endothéliales HUVEC. ....</b>	<b>194</b>
---	------------

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Disparité mondiale de l'incidence du cancer du sein en 2008.</b> .....	23
<b>Figure 2 : Schéma d'une glande mammaire à l'âge adulte.</b> .....	29
<b>Figure 3 : Le Paclitaxel et le Docétaxel, deux agents tubulo-affins de la famille des taxanes.</b> .....	37
<b>Figure 4 Architecture des vaisseaux sanguins et lymphatiques en conditions physiologiques.</b> .....	44
<b>Figure 5 : Schéma représentant les mouvements par convection permettant les échanges entre capillaire et tissus.</b> .....	47
<b>Figure 6 : Comparaison des structures d'un réseau vasculaire en condition physiologique et dans une tumeur.</b> .....	48
<b>Figure 7 : Les vaisseaux tumoraux sont immatures.</b> .....	49
<b>Figure 8 : Différences entre les stromas des tissus normaux et tumoraux qui affectent la pression interstitielle.</b> .....	51
<b>Figure 9 : Régulation du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1).</b> .....	53
<b>Figure 10 : La famille des VEGF et leurs récepteurs.</b> .....	59
<b>Figure 11 Structure et épissage alternatif de l'ARNm du VEGF-A humain.</b> .....	61
<b>Figure 12 Voies de signalisation activées par la fixation du VEGF-A au VEGFR-2 dans les cellules endothéliales.</b> .....	63
<b>Figure 13 : Facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale.</b> .....	65
<b>Figure 14 : L'hypoxie tumorale entraîne la rechute des patientes.</b> .....	68
<b>Figure 15 : L'hypoxie des tumeurs diminue la survie globale des patients.</b> .....	69
<b>Figure 16 : Principales réponses des cellules tumorales induites par HIF-1<math>\alpha</math> en condition d'hypoxie.</b> .....	71
<b>Figure 17 : Régulation du pH dans la cellule tumorale hypoxique.</b> .....	75
<b>Figure 18 : Evolution de la pression interstitielle en fonction de la profondeur par rapport à la surface.</b> .....	77
<b>Figure 19 : Survie des patientes traitées pour un cancer du col de l'utérus en fonction des valeurs de pression interstitielle.</b> .....	79
<b>Figure 20 : Schéma hypothétique de l'implication de la pression interstitielle élevée dans la formation de métastases.</b> .....	82
<b>Figure 21 : Normalisation de la vascularisation et du microenvironnement de la tumeur.</b> .....	87

<b>Figure 22 : Définition d'une fenêtre de normalisation après traitement anti-VEGFR-2.</b>	<b>89</b>
<b>Figure 23 : Biosynthèse du NO, réaction catalysée par les NOS.</b>	<b>96</b>
<b>Figure 24 : Différences et points communs des NOS.</b>	<b>97</b>
<b>Figure 25 : Classification des acides gras en fonction de leurs insaturations.</b>	<b>107</b>
<b>Figure 26 : Isomérisation géométrique des doubles liaisons.</b>	<b>107</b>
<b>Figure 27 : Biosynthèse des acides chez les mammifères.</b>	<b>110</b>
<b>Figure 28 : Transport des acides gras par les lipoprotéines et leur répartition tissulaire.</b>	<b>114</b>
<b>Figure 29 : Biosynthèse des eicosanoïdes dérivés des AGPI n-6 et des AGPI n-3.</b>	<b>127</b>
<b>Figure 30 : Les AGPI n-3 augmentent la sensibilité des tumeurs au docétaxel (gauche : groupe nutritionnel contrôle ; droite : groupe nutritionnel AGPI n-3).</b>	<b>136</b>
<b>Figure 31 : Diminution du volume vasculaire par les AGPI n-3 dans les tumeurs mammaires.</b>	<b>137</b>
<b>Figure 32 : Chronologie de l'expérimentation animale.</b>	<b>141</b>
<b>Figure 33 : Système d'acquisition de la pression interstitielle.</b>	<b>144</b>
<b>Figure 34 : Exemple d'empreintes vasculaire obtenues après polymérisation de la résine et digestion des tissus.</b>	<b>146</b>
<b>Figure 35 : Mesure de la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales en chambre de Boyden.</b>	<b>150</b>
<b>Figure 36 : Exemple de gamme étalon de FITC-dextran.</b>	<b>151</b>
<b>Figure 37 : Evaluation de la migration en chambre de Boyden.</b>	<b>152</b>
<b>Figure 38 : Cellules HUVEC colorées à l'hématoxyline situées sur la face inférieure de l'insert après leur migration en chambre de Boyden.</b>	<b>153</b>
<b>Figure 39 : Evaluation de la migration transendothéliale en chambre de Boyden.</b>	<b>153</b>
<b>Figure 40 : Structure biochimique du Bodipy®.</b>	<b>154</b>
<b>Figure 41 : Cellules tumorales marquées au Bodipy® après migration au travers d'une monocouche de cellules endothéliales.</b>	<b>155</b>
<b>Figure 42 : Les 3 étapes d'une réaction de PCR quantitative.</b>	<b>164</b>
<b>Figure 43 : Suivi en temps réel de l'amplification d'un fragment d'ADNc par PCR.</b>	<b>165</b>
<b>Figure 44 : Variations de la pression interstitielle et de l'activité locomotrice en fonction du rythme nyctéméral de l'animal.</b>	<b>172</b>
<b>Figure 45 : Effet de la Vinblastine sur la pression interstitielle des tumeurs.</b>	<b>173</b>
<b>Figure 46 : Effet de la prednisolone sur la pression interstitielle des tumeurs.</b>	<b>174</b>
<b>Figure 47 : Effet de l'anesthésie sur la pression interstitielle des tumeurs mammaires.</b>	<b>175</b>

<b>Figure 48 : Effet du docétaxel sur la PI dans les tumeurs mammaires.....</b>	<b>176</b>
<b>Figure 49 : Empreinte vasculaire de tumeurs mammaires des deux groupes nutritionnels.....</b>	<b>179</b>
<b>Figure 50 : Effet des AGPI n-3 sur l'expression des ARNm de la carbonique anhydrase IX dans les tumeurs.....</b>	<b>180</b>
<b>Figure 51 : Effet des AGPI n-3 sur la pression interstitielle des tumeurs mammaires.</b>	<b>182</b>
<b>Figure 52 : Corrélations entre la pression interstitielle et la réponse des tumeurs au docétaxel.....</b>	<b>184</b>
<b>Figure 53 : Effet des AGPI n-3 sur l'extravasation du bleu d'Evans dans les tumeurs.</b>	<b>185</b>
<b>Figure 54 : Effet du DHA et du VEGF sur la formation de pseudocapillaires par les cellules HUVEC.....</b>	<b>187</b>
<b>Figure 55 : Effet du DHA et du VEGF sur la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales.....</b>	<b>188</b>
<b>Figure 56 : Effet du DHA sur la migration induite par le VEGF et implication du NO.....</b>	<b>189</b>
<b>Figure 57 : Expression de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée dans les cellules endothéliales.....</b>	<b>193</b>
<b>Figure 58 : Expression du VEGFR2 et de sa forme phosphorylée dans les cellules endothéliales.....</b>	<b>195</b>
<b>Figure 59 : Expression de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée dans les extraits protéiques de tumeurs mammaires de rats.....</b>	<b>196</b>
<b>Figure 60 : Expression de la protéine eNOS phosphorylée dans les cellules tumorales.</b>	<b>197</b>
<b>Figure 61 : Effet du VEGF et du DHA sur la phosphorylation de la protéine eNOS dans les cellules MDA-MB-231.....</b>	<b>197</b>
<b>Figure 62 : Expression d'AKT phosphorylée dans 3 lignées tumorales mammaires. ...</b>	<b>198</b>
<b>Figure 63 Expression du VEGFR2-P par rapport au VEGFR2 dans les cellules tumorales MDA-MB-231.....</b>	<b>199</b>
<b>Figure 64 : Effet du docétaxel sur la prolifération des HUVEC enrichies ou non en DHA.....</b>	<b>202</b>
<b>Figure 65 : Migration transendothéliale des cellules tumorales MDA-MB-231.....</b>	<b>203</b>

## Liste des annexes

<b>Annexe 1</b> : Liste des gènes impliqués dans l'angiogenèse dont l'expression a été mesurée dans les tumeurs mammaires de rats. ....	216
---	-----

# Introduction générale

Le cancer du sein est actuellement le cancer le plus fréquent dans le monde. Chaque année, plus de 1 million de nouveaux cas sont diagnostiqués et plus de 400 000 personnes en meurent. Ainsi, le cancer du sein représente un problème majeur de santé publique. Les traitements anticancéreux (radiothérapie, chimiothérapie) se heurtent à l'existence ou à l'apparition de mécanismes de résistances des tumeurs. Actuellement, les études s'orientent principalement dans la compréhension de ces mécanismes de résistances et vers les stratégies visant à améliorer l'efficacité des traitements existants.

En cancérologie, l'intérêt pour les lipides d'origine marine (acides gras polyinsaturés, AGPI n-3) s'est développé au cours de ces dernières années, lorsque les études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une alimentation riche en AGPI n-3 était associée à un risque diminué de cancers du sein, du colon et de la prostate. L'étude de l'analyse de la composition en acides gras du tissu adipeux de patientes atteintes d'un cancer du sein (reflet de la consommation passée de lipides) a montré que l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) améliore la réponse des tumeurs à la chimiothérapie (Bougnoux et al. 1999). Différentes études menées chez le rongeur ont montrés qu'une supplémentation alimentaire en AGPI n-3 pouvait sensibiliser les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux. Récemment, deux études cliniques ont montré qu'un apport alimentaire en AGPI n-3 au cours de la chimiothérapie améliore l'efficacité de ce traitement chez des patients atteints de cancers du sein (Bougnoux et al. 2009) et du poumon (Murphy et al. 2011).

Les études actuelles se portent sur la compréhension des mécanismes de chimiosensibilisation des AGPI n-3. Un des mécanismes potentiel étudié au laboratoire est la modulation de la vascularisation. De précédentes études ont montrés que les AGPI n-3 sensibilisaient les tumeurs mammaires de rats à la radiothérapie (Colas et al. 2004) et aux anthracyclines (Germain et al. 1999) (Colas et al. 2006) et que cette sensibilisation était associée à une diminution de la vascularisation (Colas et al. 2006).

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action des AGPI n-3 au niveau de la qualité et de la fonctionnalité de la vascularisation tumorale. Nous avons également déterminé les cibles moléculaires des AGPI n-3 impliquées dans leurs effets anti-angiogéniques.

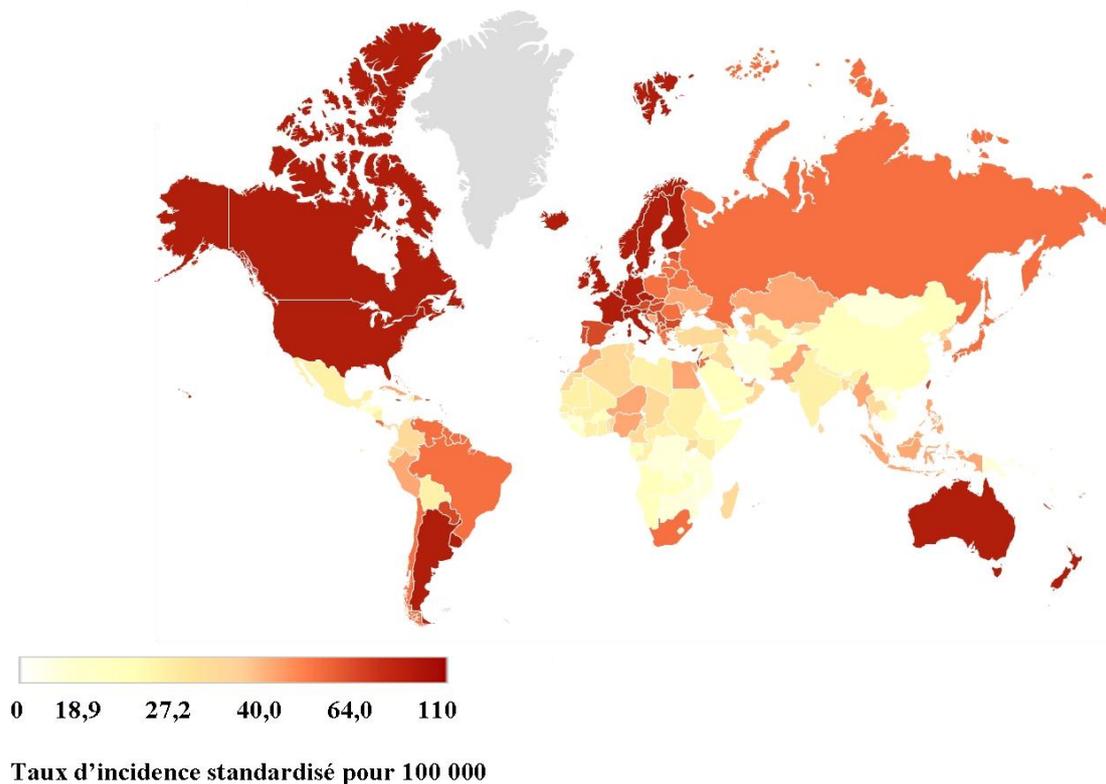
# Introduction

# I. Le cancer du sein

## A. Epidémiologie du cancer du sein

### 1. Situation dans le monde (Globocan 2008)

Chez la femme, le cancer du sein est de loin le cancer le plus fréquent dans le monde avec environ 1,4 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2008. Cependant l'incidence de ce cancer n'est pas homogène dans tous les pays (figure 1). De manière générale, les taux d'incidences sont plus élevés ( $> 80$  pour 100 000) dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement ( $< 40$  pour 100 000). Le Japon fait exception avec un taux d'incidence plus faible (42,7 pour 100 000) que dans les autres pays industrialisés. Il a été rapporté que cette différence serait principalement due au contexte environnemental et notamment à une consommation élevée de poissons (riche acides gras oméga-3) (Caygill et al. 1996).



**Figure 1 : Disparité mondiale de l'incidence du cancer du sein en 2008.**

Source : <http://globocan.iarc.fr/>

Malgré la haute incidence des cancers du sein, le taux de mortalité est plus faible dans les pays industrialisés (entre 6 et 19 pour 100 000, les taux diffèrent en fonction des pays), probablement en raison d'un meilleur accès aux traitements. Au final, le cancer du sein est la cinquième cause de décès par cancer sexe confondus (458 000 décès), mais il est la première cause de décès par cancer chez la femme, aussi bien dans les pays en voie de développement (269 000 décès par an) que dans les pays industrialisés (189 000 décès par an).

## 2. Situation en France (INCa 2010)

En France, le cancer du sein est également le cancer le plus fréquent chez la femme avec près de 52 500 nouveaux cas estimés en 2010. Le taux d'incidence est de 100 pour 100 000 femmes en 2010. L'incidence du cancer du sein a quasiment doublé en 25 ans et représente 34 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers féminins. De plus, 1 femme sur 10 développera un cancer du sein au cours de sa vie.

Comme les observations effectuées sur la population mondiale, le cancer du sein apparaît comme étant la première cause de mortalité par cancer chez la femme en France.

11 500 décès ont été estimés pour 2010 soit 18,5 % de l'ensemble des décès par cancer chez la femme (devant les cancers colorectaux et du poumon). Cependant, le taux de mortalité, qui était globalement stable depuis 1980, est en légère baisse depuis les années 2000 et présente une diminution de 1,3 % entre 2000 et 2005.

Les évolutions inverses de la mortalité et de l'incidence du cancer du sein observés au cours de ces 25 dernières années peuvent s'expliquer en partie par l'amélioration des thérapeutiques et par un diagnostic plus précoce. Les taux de survie à 1, 3 et 5 ans sont respectivement de 97%, 90% et 85%, cependant plus d'un tiers des patientes décédera de son cancer.

Par conséquent, le cancer du sein constitue un problème majeur de santé publique justifiant la poursuite de la recherche dans le but d'améliorer les traitements existants.

### 3. Facteurs de risques

Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels pouvant augmenter les risques du cancer du sein (Tableau I).

<b>Facteurs augmentant le risque du cancer du sein</b>	
Age	++
Antécédents familiaux	++
Mutations gènes BRCA1 et BRCA2	++
Maladies bénignes du sein	++
Age tardif de la ménopause	++
Précocité des 1ères règles	++
1ère grossesse tardive ou pas de grossesse	++
Densité mammographique élevée	++
Traitement hormonal substitutif	++
Contraception orale	++
Obésité post-ménopause	++
Consommation régulière d'alcool	++
Haut niveau d'IGF-1 (insulin-like growth factor)	++
Haut niveau de prolactine	+
Régime riche en graisse saturés et AGPI n-6	+
<b>Facteurs réduisant le risque du cancer du sein</b>	
1ère grossesse précoce (< 20 ans)	--
Multiparité	--
Allaitement	--
Régime riche en fruit, légumes et AGPI n-3	-
Activité physique	-

**Tableau I : Facteurs de risques du cancer du sein.**

D'après (Dumitrescu and Cotarla 2005). Plusieurs facteurs sont connus pour influencer sur le risque de cancer du sein chez la femme. Ce sont des facteurs d'origine hormonale, familiale (génétique), et environnementale (alimentation, consommation d'alcool). ++ : *Augmentation du risque élevée*, + : *augmentation du risque modérée*, -- : *diminution du risque importante*, - : *diminution du risque modérée*.

#### *a. Facteurs hormonaux*

Une surexposition aux œstrogènes endogènes est associée à un risque élevé du cancer du sein (Dumitrescu and Cotarla 2005) car ces hormones favorisent la prolifération des cellules épithéliales mammaires (Russo et al. 2000). Cette augmentation du temps d'exposition aux œstrogènes est favorisée par l'arrivée précoce des menstruations (avant l'âge de 12 ans) (Berkey et al. 1999) et/ou une ménopause tardive (après 55 ans) (CollaborativeGrouponHormonalFactorsinBreastCancer 1996).

Les facteurs endogènes associés à un risque élevé du cancer du sein comprennent également l'absence de grossesse menée à terme avant l'âge de 30 ans ou la nulliparité. A l'inverse, une grossesse menée à terme avant l'âge de 20 ans, la multiparité et l'allaitement ont été associés à une diminution du risque du cancer du sein (McPherson et al. 2000).

D'après le groupe d'étude « Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer » l'utilisation d'hormones exogènes, notamment les contraceptifs oraux augmente le risque de cancer d'environ 25 % (CollaborativeGrouponHormonalFactorsinBreastCancer 1996). 10 ans après l'arrêt de la prise de contraception, ce risque n'était plus augmenté. Depuis cette étude, de nombreuses autres études ont été menées et la majorité des études publiées n'ont pas retrouvé globalement d'élévation du risque du cancer du sein avec la prise de contraception orale (Serfaty 2011). Concernant l'utilisation d'un traitement substitutif hormonal (administré après la ménopause), le groupe d'étude « Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer » a montré une augmentation du risque de 30% (CollaborativeGrouponHormonalFactorsinBreastCancer 1997). Cette augmentation du risque a été confirmée dans des études plus récentes mais il semble qu'elle soit dépendante du type de traitement et du temps d'utilisation (> 7 ans). En effet, le risque est augmenté en cas d'utilisation d'un traitement à base d'œstradiol et de progestatif de synthèse alors qu'il ne l'est pas en cas d'utilisation d'hormones naturelles (Merviel et al. 2011).

#### *b. Facteurs familiaux*

Les femmes présentent un risque accru de développer un cancer du sein lorsqu'un ou plusieurs membres de leur famille en ont eu un. Par ailleurs, certaines mutations génétiques sont susceptibles d'augmenter le risque de cancer du sein. Les gènes BRCA1 et BRCA2 (gènes suppresseurs de tumeurs) semblent les plus impliqués. En effet, 80 % des cancers du sein héréditaires présentent une mutation au niveau de ces gènes (de Jong et al. 2002).

#### *c. Facteurs liés à l'alimentation*

L'alimentation est un facteur important à prendre en compte car on estime qu'elle est mise en cause dans environ 30% des cas de cancers (tous sites confondus) (Key et al. 2002). Dans le cas du cancer du sein, des études épidémiologiques menées auprès des populations migrantes ont mis en évidence que l'alimentation jouait un rôle important dans l'incidence de

ce cancer. Un cas bien connu est celui des femmes japonaises qui ont émigrées aux Etats-Unis. Pour la deuxième génération de ces femmes ayant adopté le régime alimentaire américain, le risque de cancer du sein est augmenté et se rapproche de celui des américaines (Key et al. 2001). Cette augmentation de l'incidence du cancer du sein a été associée à une diminution de la consommation de poissons gras (riche en acides gras polyinsaturés de la famille n-3, AGPI n-3) au profit d'une augmentation de la consommation d'huiles végétales riche en acides gras saturés et en acides gras polyinsaturés de la famille n-6 (Lands et al. 1990). Ainsi, l'association entre les acides gras alimentaires et le risque de cancer du sein dépendrait du type d'acides gras consommés plutôt que de la quantité (Rose and Connolly 1999). En effet, certaines études ont montré qu'un rapport AGPI n-6/n-3 faible est associé à une diminution du risque du cancer du sein (Goodstine et al. 2003). Ceci suggère que ces deux familles d'AGPI influencent le risque de cancer du sein de façon opposée. Les AGPI n-6 favoriseraient le cancer du sein alors que les AGPI n-3 auraient plutôt un rôle protecteur (Simonsen et al. 1998).

Cependant, les effets bénéfiques des AGPI n-3 vis-à-vis du cancer du sein n'ont pas toujours été retrouvés. Il semblerait que les résultats contradictoires des différentes études proviennent de la méthodologie utilisée, notamment lors de l'utilisation de questionnaires alimentaires (Michels et al. 2007). De même, il existe des contradictions entre les études ayant utilisé différents biomarqueurs. Par exemple, une étude de cohorte (étude E3N) n'a pas montré de relation entre le taux d'AGPI n-3 dans les phospholipides du sérum et le risque de cancer du sein (Chajes et al. 2008). A l'inverse, deux études cas-contrôle, une menée à Tours (Maillard et al. 2002) et une autre menée dans plusieurs pays européens (*EURAMIC* : « *The European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Cancer of the Breast* ») (Simonsen et al. 1998) ont mis en évidence une corrélation inverse entre le taux d'AGPI n-3 dans le tissu adipeux et le risque de cancer du sein.

Il est cependant difficile de prendre en compte le risque du cancer du sein en fonction des AGPI pris de manière individuelle. Une approche plus générale consistant à prendre en compte l'interaction entre les différents AGPI pour chaque individu a été proposée (Bougnoux et al. 2006). Cette étude a mis en évidence qu'un profil lipidique composé d'un faible taux d'acide linoléique, un faible rapport AGPI n-6 / n-3 et de forts taux d'acides gras monoinsaturés présentait un effet protecteur contre le cancer du sein. Cette approche permet d'associer le risque du cancer du sein, non pas à une famille d'acides gras unique, mais plutôt à un profil lipidique particulier : le lipidome (Bougnoux et al. 2008) (Bougnoux et al. 2006; Colas et al. 2006).

#### *d. Facteurs liés à l'hygiène de vie*

**Obésité.** L'obésité présente une association complexe avec le risque du cancer du sein. Le risque du cancer du sein est augmenté de deux fois chez les femmes obèses ménopausées (McPherson et al. 2000). Un des mécanismes expliquant cette augmentation est que le tissu adipeux est une importante source d'œstrogènes endogènes. Après la ménopause, la seule source d'œstrogènes provient du tissu adipeux où ces hormones sont synthétisées par l'aromatase à partir des hormones androgènes. De ce fait, l'excès de tissus adipeux chez les femmes obèses augmente l'exposition à ces hormones endogènes (Dumitrescu and Cotarla 2005) qui sont, comme nous l'avons vu plus haut, associées à un risque élevé de cancer du sein. En revanche, l'obésité chez les femmes non ménopausées a été associée à une diminution du risque du cancer du sein, probablement due au fait que l'obésité donne souvent lieu à des cycles menstruels anovulatoires (Nkondjock and Ghadirian 2005).

**Consommation d'alcool.** Il a été établi que le risque de cancer du sein augmente proportionnellement avec la consommation régulière d'alcool (1 verre d'alcool par jour augmente de 7 % le risque du cancer du sein) (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002).

**Activité physique.** L'activité physique régulière diminue le risque de cancer du sein d'environ 35%, en entraînant une diminution de la production d'œstrogènes, en permettant le maintien d'un équilibre énergétique et en diminuant la prise de poids en particulier chez les femmes ménopausées (Friedenreich et al. 2001).

#### *e. Autres facteurs*

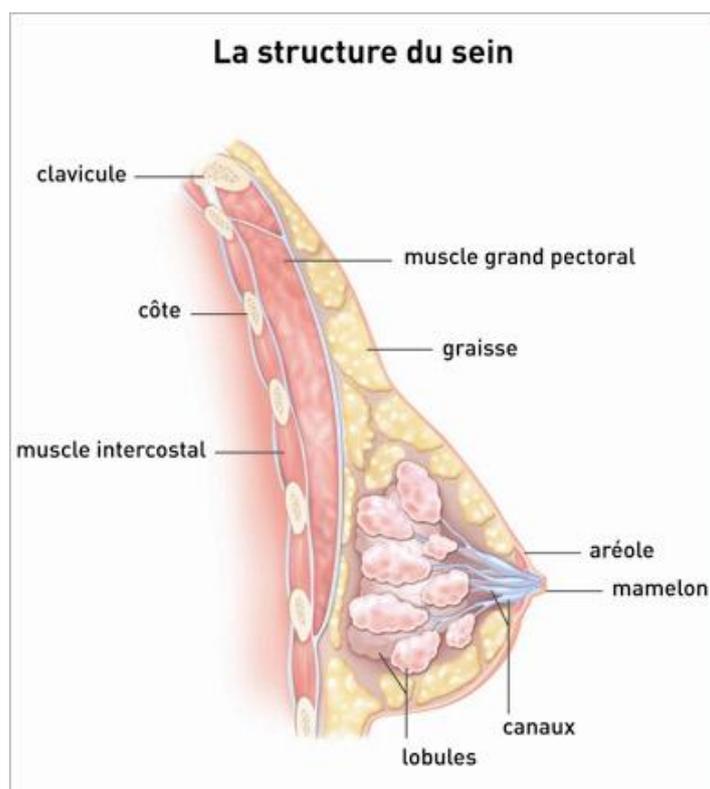
L'incidence du cancer augmente avec l'âge. La maladie est rare chez les moins de 30 ans et le risque augmente entre 50 et 75 ans (près de 2/3 des cancers du sein) (McPherson et al. 2000).

Les femmes ayant eu des antécédents de mastopathies bénignes du sein, principalement des lésions prolifératives, ont un risque multiplié de 2 à 4 fois (Ferrero 1999).

## B. La chimiothérapie dans le cancer du sein

### 1. Stratégies thérapeutiques.

Dans 95% des cas, les cancers du sein sont des adénocarcinomes. Les adénocarcinomes qui se développent à partir des cellules des canaux galactophores sont des adénocarcinomes canaux. On distingue : les adénocarcinomes canaux *in situ* (4% des cancers) et les adénocarcinomes canaux infiltrants (les plus fréquents, 75% des cancers). Lorsque les tumeurs se développent à partir des cellules des lobules, on parle d'adénocarcinomes lobulaires parmi lesquels on trouve les adénocarcinomes lobulaires *in situ* (2,5 % des cancers), et les adénocarcinomes lobulaires infiltrants (15 % des cancers). Les cancers *in situ* correspondent à une prolifération épithéliale maligne sans infiltration du tissu conjonctif et sont à opposer au carcinome infiltrant où les cellules tumorales ont infiltré le tissu conjonctif (Figure 2 : *Structure glande mammaire adulte*).



**Figure 2 : Schéma d'une glande mammaire à l'âge adulte.**

(Source : <http://www.e-cancer.fr/les-cancers/cancer-du-sein>). Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme. La glande mammaire est composée de 15 à 20 lobes convergeant vers le mamelon et séparés les uns des autres par du tissu adipeux et du tissu conjonctif. Chaque lobe est constitué de lobules (sécrétion du lait) et de canaux galactophores (transport du lait vers le mamelon).

Afin de proposer un traitement adapté, la tumeur nouvellement diagnostiquée doit être classée en fonction de son stade. Ce facteur conditionne le pronostic de la maladie et le traitement à entreprendre (Madelaine 2003) :

La classification la plus répandue est la **classification TNM** (*Tumor Node Metastasis*), retenue par l'Union Internationale Contre le Cancer, UICC. Elle recueille cliniquement les informations concernant : *la taille de la tumeur* (T), mesurée par palpation et imagerie médicale; *les adénopathies satellites* (envahissement ganglionnaire) (N), c'est à dire le statut ganglionnaire recherché par la palpation ; *l'existence de métastases* (M), déterminée par examen clinique et imagerie. D'une façon générale, des chiffres sont associés à ces 3 lettres. La valeur de ces chiffres augmente selon la gravité et varie de 0 à 4 pour le T, de 0 à 3 pour le N, et 0 ou 1 pour le M. La juxtaposition de ces 3 lettres chiffrées donne une description abrégée de l'extension de la tumeur maligne. Cela conduisant à un grand nombre de possibilités, on effectue un regroupement en stades de 0 à IV (stades 0, I, IIA-IIB, IIIA-IIIB-IIIIC, IV). Le tableau suivant résume les différents stades possibles selon l'UICC.

Stades	T	N	M
<b>0</b>	Tis (in situ)	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>IIIB</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
<b>IIIIC</b>	Tous	N3	M0
<b>IV</b>	Tous	Tous N	M1

**Tableau II : Stades de 0 à IV obtenus grâce à la classification TNM des tumeurs.**  
Classification selon l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC).

Parallèlement à ces renseignements cliniques, des paramètres anatomo-pathologiques, notamment l'étude du **grade Scarff, Bloom et Richardson** (grade histopronostique SBR)

permet de donner un score aux tumeurs entre 1 et 3 aux trois éléments histologiques suivants : pauvreté en structures glandulaires bien définies, irrégularité des noyaux et richesse en mitose. Les éléments sont successivement additionnés afin d'obtenir un score. Plus ce score est élevé, plus la tumeur est agressive et de mauvais pronostic (Elston et al. 1999).

Il est également possible de classer les tumeurs selon certains facteurs biologiques présentant un intérêt pronostique important, tels que la présence ou non des récepteurs hormonaux (à la progestérone et aux œstrogènes) et du récepteur HER-2. En effet, 80 % des tumeurs mammaires possèdent des récepteurs aux œstrogènes (Ferrero 1999) et 25% surexpriment le récepteur HER-2. Cependant, environ 15 % des cancers du sein sont dits « triple négatifs », c'est-à-dire que les tumeurs n'expriment aucun de ces trois récepteurs. Ces cancers sont particulièrement agressifs du fait qu'ils ne répondent ni aux hormonothérapies ni aux thérapies ciblées (Hudis and Gianni 2011).

Ces différents facteurs pronostic permettent d'établir la meilleure prise en charge individuelle du patient. Dans le cas de la majorité des cancers du sein (carcinomes canauxaires infiltrant), la maladie est considérée comme hétérogène, en conséquence le traitement sera à la fois général et locorégional.

#### *a. Chimiothérapie*

Le traitement par chimiothérapie peut être administré dans 2 contextes différents (Hess 2001) :

- **La chimiothérapie à titre néo-adjuvant.** La chimiothérapie est administrée avant le traitement locorégional (chirurgie et/ou radiothérapie). Le but est de réduire le volume tumoral afin de permettre une mastectomie partielle (conservatrice) et de détruire les micro-métastases.
- **La chimiothérapie à titre adjuvant.** La chimiothérapie adjuvante est administrée après le traitement locorégional. Elle est prescrite en fonction des facteurs pronostiques (taille de la tumeur, statut ganglionnaire) et histologiques de la tumeur. Le but est de détruire les micro-métastases, diminuer le risque de récurrence et d'augmenter la survie globale.

### *b. Traitement locorégional.*

**La chirurgie** permet de *i*) confirmer le diagnostic (examen anatomopathologique), *ii*) préciser le pronostic (examens des ganglions lymphatiques et examens biologique de la tumeur), *iii*) l'exérèse de la tumeur : mastectomie partielle systématiquement suivie d'une radiothérapie ou mastectomie totale, éventuellement complétée par la radiothérapie (Madelaine 2003).

**La radiothérapie** tient une place importante dans le traitement locorégional des cancers infiltrants du sein. Elle est indispensable après traitement chirurgical conservateur et, en combinaison ou non avec la chirurgie et/ou la chimiothérapie, est principalement utilisée pour traiter la tumeur primaire et les adénopathies chez les deux tiers des patientes. L'objectif est également de diminuer le risque de récurrence locale et régionale. La radiothérapie agit par l'intermédiaire de radiations ionisantes (source IRSN, *Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire*). L'irradiation des tissus biologiques a pour conséquence la formation de radicaux libres hautement réactifs suite à la radiolyse de l'eau. Ces radicaux libres sont capables de créer directement des lésions aux lipides, glucides, protéines et surtout à l'ADN. Ainsi, les radiations ionisantes induisent principalement des altérations de l'ADN (modifications de base, cassures simple brin ou double brin) provoquant une mort cellulaire immédiate, soit une mort cellulaire retardée, apparaissant au bout de plusieurs mitoses (cas le plus fréquent). L'effet de la radiothérapie peut néanmoins être diminué lorsque les tumeurs sont hypoxiques (diminution de l'apport en oxygène). En effet, l'oxygène, en interagissant avec les radicaux libres produit par la radiolyse de l'eau, augmente les dommages causés à l'ADN et les rend irréversibles (Vaupel et al. 2001).

### *c. Autres traitements systémiques*

#### *i. Hormonothérapie.*

L'hormonothérapie s'adresse aux tumeurs hormonosensibles (présence de récepteurs hormonaux) quelque soit le statut ménopausal des patientes. Elle peut être prescrite en situation adjuvante. L'hormonothérapie agit à 3 niveaux (Espinosa et al. 2003) :

- **Action sur la production des œstrogènes.** Chez les femmes non ménopausées, les  $\frac{3}{4}$  des œstrogènes proviennent de la sécrétion ovarienne, d'où l'intérêt de la castration. A l'heure actuelle, l'ovariectomie n'est plus que

très peu utilisée du fait de son irréversibilité et est remplacée par la *castration chimique* transitoire. Cette dernière consiste en l'utilisation d'antagonistes de la GnRH (hormone hypothalamique) qui suppriment la synthèse ovarienne d'œstrogènes de manière similaire à la ménopause.

- **Action au niveau des récepteurs aux œstrogènes, utilisation d'anti-œstrogènes.** Cette action est possible quelque soit le statut ménopausal des patientes (il existe également une synthèse d'œstrogènes après la ménopause). Elle consiste en l'utilisation d'analogues structuraux aux œstrogènes, d'affinité plus grande pour les récepteurs aux œstrogènes que les œstrogènes naturels. Les analogues se lient aux récepteurs aux œstrogènes, ce qui rend la cellule insensible aux œstrogènes naturels.
- **Action au niveau de la synthèse des œstrogènes.** La synthèse d'œstrogènes effectuée par l'aromatase (enzyme présente dans le foie, les muscles, le tissu adipeux et les cellules tumorales) devient la seule source d'œstrogènes chez les femmes ménopausées. Cette enzyme convertit les androgènes en œstrogènes. L'utilisation d'anti-aromatase supprime cette activité.

## ii. Thérapeutique ciblée

La connaissance des processus de transmission de signaux entre cellules et la signalisation intracellulaire a permis l'utilisation de thérapeutiques à visée moléculaire, dont le meilleur exemple en ce qui concerne le cancer du sein est l'Hercéptine (trastuzumab). En effet, dans 25% des cas de cancers du sein, les cellules tumorales surexpriment HER-2/neu. La surexpression et l'activation de ce récepteur, membre de la famille des EGFR (epidermal growth factor receptor), entraîne une multiplication non contrôlée de la cellule tumorale. L'Hercéptine est un anticorps monoclonal murin humanisé, de la classe des IgG1, dirigé contre le récepteur HER-2/neu, inhibant ainsi la prolifération tumorale. Des études cliniques de phase III ont montré que la réponse de patientes (régression totale ou partielle de la tumeur au bout de 20 semaines) atteintes d'un cancer du sein traitées était de 42 % quand le paclitaxel était combiné à l'Hercéptine. Au contraire, seulement 16% des femmes traitées par le paclitaxel seul ont répondu (von Mehren et al. 2003).

## 2. Différentes classes d'agents chimiothérapeutiques.

Sources : (Espinosa et al. 2003; Malhotra and Perry 2003; Robert 2006).

Les agents chimiothérapeutiques classiques interfèrent avec le cycle cellulaire, inhibant ainsi la prolifération des cellules et entraînant la mort cellulaire. La plupart des agents anticancéreux exercent leur activité maximale durant la phase S du cycle (*anti-métabolites, anthracyclines*), d'autres bloquent la cellule en phase M (*agents tubulo-affins*). Certains agents agissent durant l'ensemble des phases du cycle (*agents alkylants*). L'ensemble de ces molécules ne sont pas dirigées sur une cible moléculaire spécifique de la cellule cancéreuse. Elles ciblent les cellules ayant un fort taux de réplication, la chimiothérapie est donc principalement active sur les tumeurs à croissance rapide.

Les agents chimiothérapeutiques sont classés en fonction de leurs mécanismes d'action au niveau cellulaires. Quatre grandes classes ont pu être définies.

*Dans cette partie présentant les différentes classes d'agents chimiothérapeutiques, nous détaillerons plus en détails les caractéristiques des agents tubulo-affins dont fait partie le docétaxel, molécule utilisée pour les travaux de cette thèse.*

### a. Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des substances d'origine synthétique possédant un ou plusieurs groupements alkyles très nucléophiles. Ils agissent en établissant des liaisons covalentes au niveau de l'ADN. L'effet cytotoxique de la majorité de ces agents est lié à l'alkylation de la guanine. Les alkylants inhibent la transcription et la réplication de l'ADN, entraînant l'arrêt de la division cellulaire et la mort cellulaire. De plus, ils libèrent des radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN.

Parmi les **agents alkylants** on distingue : les moutardes azotées (cyclophosphamide, Ifosfamide, Busulfan, Chlorambucil...) dont les métabolites sont hautement réactifs en milieu aqueux et vont alkyler l'ADN ; les moutardes couplées à l'hormonothérapie (Prednimustine, Estramustine) ; les azidirines (Thiotepa, Mitomycine C, Atréamine). On trouve également des molécules qui ne possèdent pas de groupements alkyles, **agents non alkylants**, mais qui ont la même action que les agents alkylants. Parmi eux on distingue : les nitroso-urées (Carmustine, Belustine, Lomustine...) dont les catabolites se comportent comme

des alkylants. Les tétrazines (Dacarbazine, Procarbazine) ; les sels de platines (Cisplatine) qui se comportent comme des alkylants en se fixant au niveau de l'azote 7 des guanines et forment des ponts intra et inter-brins avec l'ADN (on parle d'*adduits* ou de complexe ADN-Platine), et les dérivés des sels de platine (Carboplatine, Oxaliplatine).

#### *b. Les anti-métabolites*

Ces agents sont des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques puisqu'ils sont des analogues structuraux des composants nécessaires à cette synthèse. On distingue les **analogues de l'acide folique** (molécule de référence : le méthotrexate), ils agissent en faux substrats et bloquent l'activité de la dihydrofolate réductase, enzyme permettant la transformation de l'acide folique en tetrahydrofolate (forme active du folate) nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Les **analogues des bases puriques** (Cis-mercaptopurine, Pentostatine, Fludarbine) et les **analogues des bases pyrimidiques** (5-Fluorouracile, Cytosine Arabinoside, Gemcitabine) inhibent la synthèse de ces bases.

#### *c. Les agents intercalants et inhibiteurs des topoisomérases*

Ces molécules peuvent agir en s'intercalant dans la molécule d'ADN en raison de la présence de cycles plans qui s'intercalent dans la double hélice des acides nucléiques et en gênent les fonctions, inhibant ainsi la réplication et la transcription. Ces molécules agissent également en interférant avec l'activité des topoisomérases.

Les topoisomérases sont des enzymes qui permettent la séparation des brins d'ADN lors des phases de transcription, de réplication et de réparation. Ces enzymes sont de deux types : la topoisomérase I, qui crée une rupture monocaténaire et la topoisomérase II, qui coupe les deux brins de l'ADN. La relaxation de la molécule d'ADN est suivie d'une religation du ou des brins coupés. Les agents inhibiteurs des topoisomérases forment un complexe ternaire stable avec l'enzyme et l'ADN scindé, empêchant ainsi la soudure des brins d'ADN, ce qui a pour conséquences un blocage de la réplication et la mort cellulaire.

Parmi les **agents inhibiteurs de la topoisomérase II et intercalants** : on distingue : les Anthracyclines (Doxorubicine, Daunorubicine, Epirubicine), ces molécules entraînent également la production de radicaux libres ce qui contribue à leur effet cytotoxique ; les

anthracènediones (Mitoxantrone), molécules analogues aux Anthracyclines (production de radicaux libres mais en moindre quantité) et les actinomycines (Actinomycine D), qui elles se fixent au niveau de la guanine et inhibent plus facilement la synthèse d'ARN. On trouve également les **agents inhibiteurs de la topoisomérase II** (Podophyllotoxines) et **inhibiteurs de la topoisomérase I** (Camptothecine, Topotecan, Irinotecan).

*d. Les agents tubulo-affins (Jordan and Wilson 2004)*

Les microtubules, composants du cytosquelette sont des filaments protéiques composés d'hétérodimère de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , responsable du maintien de la forme de la cellule. Ils participent à des fonctions cellulaires essentielles (motilité, transport intracellulaire, division et mitose) notamment grâce à leurs propriétés dynamiques d'assemblage et de désassemblage (ou polymérisation et dépolymérisation). Au cours de la division cellulaire, ils forment une structure bipolaire (fuseau mitotique), complexe et dynamique, qui est nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes pendant la mitose. Les microtubules sont donc une cible intéressante des molécules anticancéreuses.

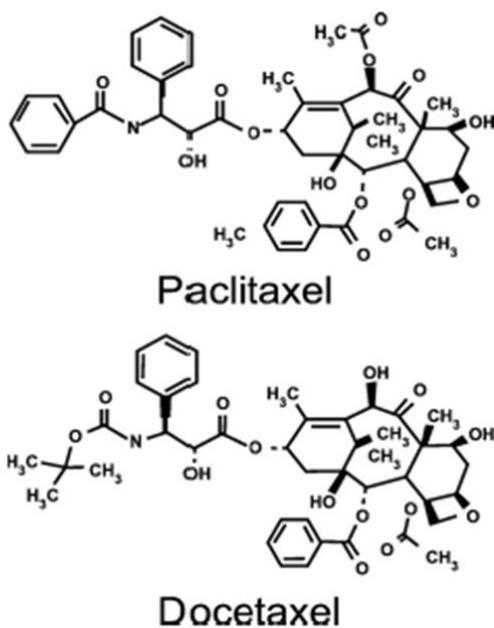
Les agents tubulo-affins ou poison du fuseau mitotique, sont des molécules qui agissent interférant sur le dynamisme des microtubules. Ces agents ont été classés en deux groupes. Parmi le premier, les **alcaloïdes dérivés de la Pervanche de Madagascar** on distingue : les Vinca-alcaloïdes (Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine, Vindesine, Vinflucine), la Colchicine et les Combrestatines. Ces molécules sont des agents déstabilisateurs des microtubules qui vont empêcher la polymérisation des microtubules. La mitose est alors bloquée en métaphase, les chromosomes se séparent de manière anarchique et sont incapables de migrer vers la plaque équatoriale de la cellule, entraînant ainsi la mort de la cellule par apoptose. Le second groupe est constitué d'agents qui empêchent la dépolymérisation des microtubules. On distingue entre autre les taxanes (paclitaxel et docétaxel) et les épothilones tels que le patupilone (ou epothilone-B).

Les **dérivés de l'If** ou **Taxanes** comprennent le paclitaxel et le docétaxel (taxane de seconde génération, analogue semi-synthétique dérivé du Paclitaxel). La figure 3A présente la structure chimique de ces molécules. Les taxanes sont des agents stabilisateurs des microtubules. Ils se fixent uniquement sur la tubuline polymérisée, au niveau de la sous-unité  $\beta$  de la tubuline à l'intérieur des microtubules (figure 3B). Ils favorisent l'assemblage et la stabilisation des microtubules en inhibant leur dépolymérisation, supprimant ainsi la

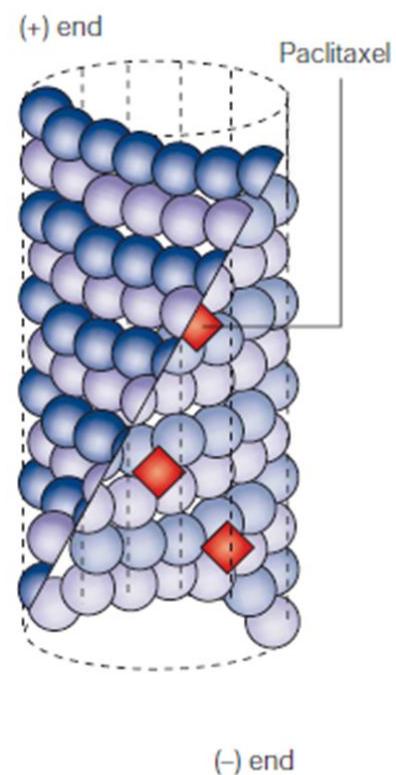
dynamique des microtubules. Ils altèrent également la tension autour des kinétochores, structures riches en protéine situées au niveau du centromère des chromosomes durant la mitose. La cellule est alors bloquée en phase G<sub>2</sub>/M et rentre dans un processus de mort cellulaire par apoptose ou par catastrophe mitotique. La mort par catastrophe mitotique à lieu lors de mitose aberrante. En effet, il arrive que les cellules ne s'engagent pas dans l'anaphase ou la cytokinèse. Cette mitose aberrante aboutit à la formation de cellules géantes polyploïdes non viables et présentant une chromatine non condensée (Vitale et al. 2011).

Le **Docétaxel**, présente une affinité supérieure pour la tubuline et un meilleur effet anti-tumoral que le paclitaxel. Il désorganise les centrosomes affectant ainsi la fin de la phase S et les phases G<sub>2</sub> et M (McGrogan et al. 2008). Par ailleurs, le traitement des cellules par du docétaxel inhibent d'autres fonctions cellulaires telles que la sécrétion, le transport intracellulaire et la motilité cellulaire (Morse et al. 2005).

A



B



**Figure 3 : Le Paclitaxel et le Docétaxel, deux agents tubulo-affins de la famille des taxanes.**

A. Structure chimique du Paclitaxel et du Docétaxel, agents anticancéreux de la famille des taxanes (McGrogan et al. 2008). B. Molécules de Paclitaxel fixées à la tubuline  $\beta$  à l'intérieur des microtubules (Jordan and Wilson 2004).

Le Docétaxel a également été décrit comme une molécule ayant des propriétés anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo*. L'action anti-angiogénique du docétaxel a été attribuée à son action inhibitrice sur les différentes étapes du processus d'angiogenèse. En effet, il induit l'apoptose (Grant et al. 2003) et diminue la prolifération des cellules endothéliales (Sweeney et al. 2001). Le blocage de la réorganisation des centrosomes par le docétaxel inhibe la migration des cellules endothéliales (Sweeney et al. 2001) et est associé à une rétractation des pseudopodes (prolongements cytoplasmiques des cellules endothéliales nécessaire à leur migration) (Hotchkiss et al. 2002). La capacité des cellules endothéliales à former des pseudocapillaires est également inhibée par le Docétaxel (Grant et al. 2003; Hotchkiss et al. 2002; Sweeney et al. 2001). L'action anti-angiogénique de ce taxane peut également être expliquée par son action inhibitrice sur l'expression des intégrines et de la VE-cadhérine (molécules d'adhésion impliquées dans la migration et la perméabilité) (Schwartz 2009).

## C. Limites de la chimiothérapie

Une des limites de la chimiothérapie est que son effet est non spécifiques des cellules tumorales, et de ce fait peut entraîner une toxicité des tissus sains. Par ailleurs, ils existent des phénomènes de résistances à la chimiothérapie du fait d'une certaine variabilité de la sensibilité des cellules tumorales.

### 1. Effets secondaires de la chimiothérapie

Il existe deux grands types d'effets secondaires qui empêchent l'augmentation des doses de chimiothérapie (Hess 2001b) :

➤ La **toxicité commune** à la plupart des agents anticancéreux du fait de leurs **effets antiprolifératifs**. La chimiothérapie est toxique pour tous les tissus à renouvellement rapide : moelle osseuse, tube digestif, peau et phanères, gonades. La toxicité médullaire, incluant leucopénie + neutropénie (sensibilité accrue aux infections), thrombopénie (favorisant saignement/hémorragie) et anémie, est le premier facteur limitant de la chimiothérapie. Les effets secondaires peuvent être gastro-intestinaux, entraînant nausée, vomissement et toxicité des muqueuses (mucites, diarrhées, constipation). La toxicité des agents anticancéreux est aussi observable au niveau de la peau et des phanères (alopécie,

érythèmes, hyperpigmentation) ainsi qu'au niveau des gonades puisqu'il existe un risque d'azoospermie chez les hommes et un risque d'insuffisance ovarienne entraînant une aménorrhée chez les femmes.

➤ La **toxicité spécifique aux drogues**. Il est généralement observé une toxicité cardiaque (myocardiopathie, troubles du rythme) lors de l'utilisation des anthracyclines, une toxicité pulmonaire lors de traitements avec certaines nitroso-urées, une neuro-toxicité induite par les agents tubulo-affins (alcaloïdes de la pervenche et taxanes), certains agents alkylants (sels de platine, ifosfamide) et anti-métabolites (Méthotrexate, 5-FU) ou encore une toxicité rénale (nécrose tubulaire) provoquée par les sels de platine et notamment le cisplatine.

## 2. Résistances des tumeurs

La résistance à la chimiothérapie est variable selon les tumeurs et constitue une limite à son efficacité. Elle peut être de deux types : naturelle ou acquise (Malhotra and Perry 2003) (Lanore and Delprat 2002).

La **résistance** est **naturelle** lorsque la tumeur ne répond pas d'emblée à la chimiothérapie pour différentes raisons :

- *Au niveau cellulaire* : la cellule n'est pas ou peu sensible aux effets toxiques de la drogue en raison d'une captation insuffisante, d'une inactivation ou d'un défaut d'activation intracellulaire de la drogue.
- *Au niveau tumoral* : si la masse tumorale est importante au moment où la tumeur est décelée, la tumeur présente une cinétique de croissance lente avec de nombreuses cellules en phase G0 (phase de quiescence) d'où une inefficacité relative de la chimiothérapie. Des facteurs anatomiques de la tumeur peuvent faire obstacle à la diffusion des agents anticancéreux : par exemple une vascularisation anarchique et/ou un défaut de vascularisation au centre de la tumeur. *La résistance des tumeurs liée à la vascularisation sera développée ultérieurement.*

La **résistance** est **acquise** lorsque la tumeur, initialement sensible à la chimiothérapie, devient progressivement résistante au cours de traitement ; ou lorsque la tumeur est insensible

à la chimiothérapie après la rechute. Cette résistance dépend de plusieurs facteurs : hétérogénéité tumorale et sélection de clones par la chimiothérapie naturellement résistants ; instabilité génétique des tumeurs : les mutations spontanées, les translocations de gènes, spontanées ou induites par la chimiothérapie sont fréquentes ; amplification de gènes : correspond à une augmentation de l'expression d'un gène par le biais de la multiplication du génome. Plusieurs mécanismes de résistance ont pu être mis en évidence au cours de ces 20 dernières années :

- Résistance multidrogue (MDR = multi-drug resistance) : lors de l'exposition répétée de la cellule à certaines molécules anticancéreuses, la cellule peut devenir résistante via la surexpression de la protéine P-gp (glycoprotéine transmembranaire codée par le gène MDR1). On assiste alors à une diminution de la concentration intracellulaire de la molécule via une augmentation de son élimination hors de la cellule par la P-gp. Cette résistance multiple aux drogues concerne les anthracyclines, les agents tubulo-affins et les actinomycines (Malhotra and Perry 2003). Il existe d'autres protéines que la P-gp également impliquées dans la résistance multidrogue. Ces protéines sont la MRP (« Multidrug resistance associated protein ») (König et al. 2005), la BCRP (« Breast Cancer resistance Protein ») (Ni et al. 2010) ou encore la LRP (« lung resistance related protein ») (Song et al. 2009).
- Mécanisme membranaire : La captation intracellulaire de la molécule (par exemple le méthotrexate) peut être limitée par une altération du transporteur membranaire nécessaire à son transport dans la cellule (phénomène d'imperméabilité membranaire).
- Modification du métabolisme intracellulaire. La transformation de la molécule (exemple de l'arabinoside C) en son dérivé actif par les enzymes de phase I peut être inhibée via une diminution de l'affinité ou une diminution de l'expression des enzymes nécessaires à cette transformation. La cellule peut également devenir résistante en accélérant les processus d'élimination de la molécule. Par exemple, pour les agents alkylants, une augmentation de l'expression des glutathion-S-transférase (GST) entraîne la conjugaison de la molécule avec le glutathion et ainsi accélère son élimination.

- Modification qualitative et quantitative de la cible. Chacune des cibles des molécules anticancéreuses peut être modifiées. Elles peuvent subir des modifications **qualitatives** : cette cible peut en effet muter, elle n'est alors plus reconnue par le cytotoxique ou **quantitatives** : la cible peut également être produite en grande quantité dans la cellule cancéreuse en raison d'une amplification du gène codant pour cette cible. Dans le premier cas la molécule ne reconnaît plus sa cible (exemple des agents tubulo-affins : modifications qualitatives de la tubuline due à une mutation sur son site de liaison qui n'est plus reconnue par ces molécules). Dans le second cas la quantité de médicament est insuffisante pour entraîner une cytotoxicité significative (Exemple des cibles contre lesquelles sont dirigés les anti-métabolites, comme la thymidylate synthétase pour le 5FU et la DHFR pour le méthotrexate peuvent subir des modifications qualitatives et/ou quantitatives).
- Augmentation des mécanismes de réparation. Les phénomènes de réparation de l'ADN peuvent être dérégulés aboutissant ainsi à la réduction de la cytotoxicité par réparation accélérée des lésions créées sur l'ADN, grâce notamment à l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation.

*L'apparition de résistances étant la première cause d'échec des traitements anticancéreux, augmenter l'efficacité des traitements demeure donc une priorité. La sensibilité des tumeurs aux agents anticancéreux dépend en partie d'une mauvaise qualité de la vascularisation tumorale. Au cours des chapitres suivant, nous verrons en quoi la vascularisation tumorale est considérée comme étant de mauvaise qualité et quels sont les acteurs moléculaires qui en sont responsables. Nous aborderons également les conséquences d'une telle vascularisation afin de comprendre un des aspects de la résistance des tumeurs aux traitements. Enfin nous parlerons des stratégies existantes pour augmenter l'efficacité des traitements : cibler la vascularisation et augmenter l'apport d'acides polyinsaturés d'origine marine, dans le but de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements.*

## II. La vascularisation tumorale

Depuis plusieurs décennies, Judah Folkman et son équipe ont montré que la croissance d'une tumeur était indissociable de la formation de son propre réseau vasculaire. Lors d'une première phase de développement, appelée phase non-vasculaire, la taille de la tumeur est limitée entre 2 et 3 mm<sup>3</sup>. La phase vasculaire correspond au moment où la tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux, accélérant ainsi sa croissance (Folkman 1990). C'est au cours de cette phase que l'on parle d'angiogenèse. Ce processus permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire déjà existant. L'angiogenèse est à différencier de la vasculogenèse, qui elle permet au cours de l'embryogenèse la formation d'un plexus vasculaire à partir de précurseurs hématopoïétiques. Ce procédé a également été décrit pour participer à la formation de vaisseaux dans une tumeur (Carmeliet and Jain 2000). A l'âge adulte, la majorité des cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins sont maintenues en état de quiescence par un équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. L'angiogenèse physiologique se déroule seulement pendant le cycle menstruel, pendant la grossesse (au niveau du placenta) ou encore lors des processus de réparation tissulaire (Carmeliet 2005). Au niveau des tumeurs, décrites comme « *des blessures qui ne guérissent jamais* », les cellules endothéliales ont perdu leur capacité à rester quiescentes, entraînant ainsi une angiogenèse tumorale continue (Feron 2004).

### A. Caractéristiques de la vascularisation tumorale

*Afin de comprendre en quoi les vaisseaux tumoraux diffèrent d'une vascularisation normale, il est important de connaître la physiologie des vaisseaux normaux. Dans cette partie nous ferons un rappel sur la vascularisation en conditions physiologiques avant de décrire la vascularisation tumorale.*

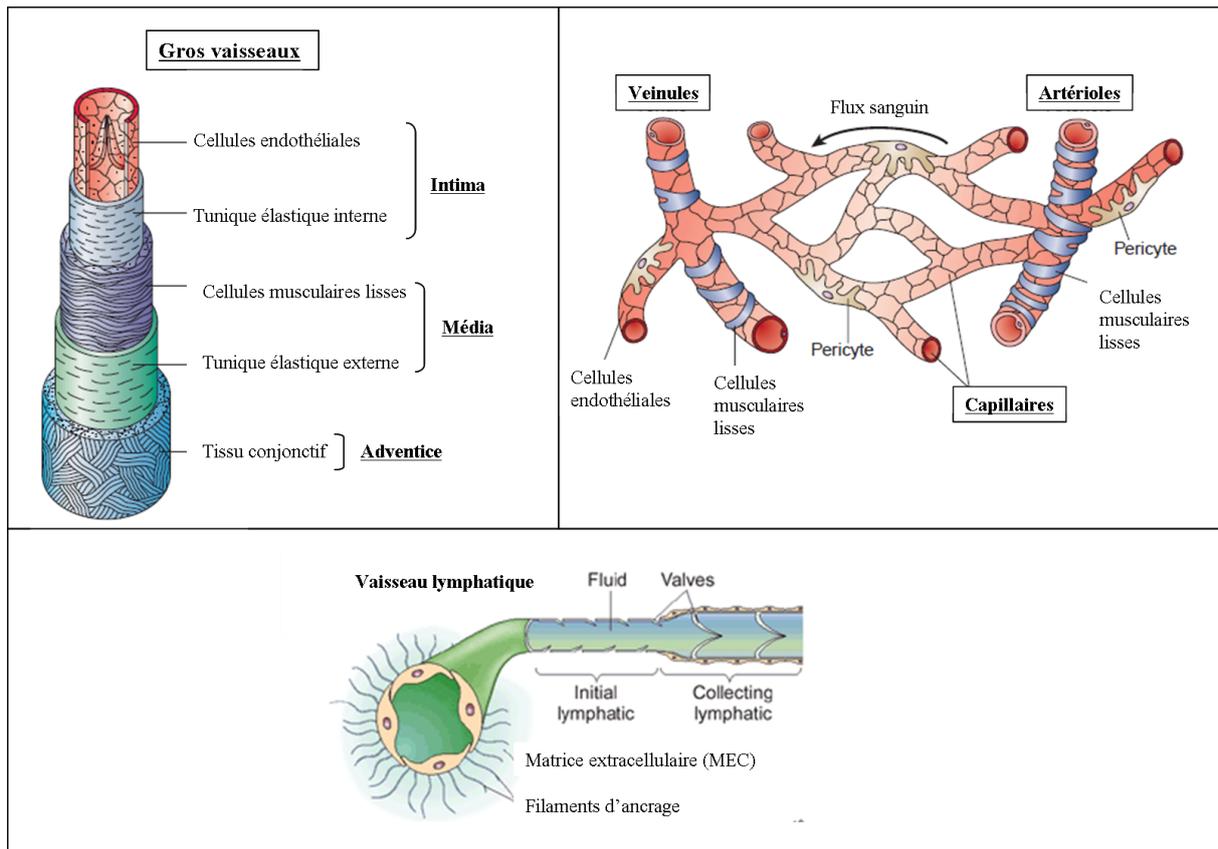
#### 1. Architecture des vaisseaux en conditions physiologiques

L'ensemble du système vasculaire est tapissé de façon continue par une monocouche de cellules endothéliales : l'endothélium. Les cellules endothéliales sont directement exposées

au flux sanguin et sont donc une zone propice pour l'extravasation et l'intravasation de cellules sanguines, de protéines plasmatiques et de diverses substances biochimiques. Les cellules endothéliales sont des cellules polarisées et orientées dans la direction de la lumière du vaisseau. Elles forment des jonctions complexes entre elles, on distingue les *jonctions serrées* (ou *zona occludens*, jouent un rôle dans la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales) assurées principalement par la protéine *zonula occludens-1* (McNeil et al. 2006) ; les *jonctions d'ancrage* (permettent liaisons cellules-cellules) assurées par une Cadhérine transmembranaire spécifique, la VE-Cadhérine ; les *jonctions communicantes* (ou gap-junctions, ce sont des jonctions intercellulaires formées de canaux intercellulaires dont chacun est composé de 6 sous-unités ou connexines). La maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins sont assurées par l'interaction entre les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules musculaires lisses. Les molécules impliquées sont l'angiopoïétine-1 et le récepteur Tie2 ainsi que la N-Cadhérine (Armulik et al. 2005). Les cellules endothéliales participent également à la régulation de nombreux paramètres physiologiques tels que l'angiogenèse, le tonus vasculaire (les cellules musculaires lisses maintiennent un tonus vasoconstricteur) et l'adhésion plaquettaire (qu'elles inhibent) (Furuya et al. 2005).

En conditions physiologiques, le réseau (ou arbre) vasculaire se structure **en vaisseaux sanguins** (artère, veine, artérioles, veinules et capillaires) et en **vaisseaux lymphatiques**. La structure des vaisseaux sanguins et lymphatique est présentée dans la figure 4.

***Système vasculaire lymphatique.*** Les cellules endothéliales lymphatiques sont ancrées dans la matrice extracellulaire environnante grâce à des filaments d'ancrage. Les capillaires lymphatiques sont dépourvus de péricytes et contiennent des microvalves. Les gros vaisseaux lymphatiques sont entourés d'une lame basale et contiennent des valves permettant l'écoulement unidirectionnel de la lymphe (Jain 2003). Le rôle principal du système lymphatique est de drainer l'excès de fluide, ainsi que des molécules et les cellules du système immunitaires présents dans les tissus interstitiel afin de permettre leur passage au niveau des ganglions lymphatiques.



**Figure 4 Architecture des vaisseaux sanguins et lymphatiques en conditions physiologiques.**

(Modifié d'après (Jain 2003) et (Cleaver and Melton 2003)). Le réseau vasculaire est constitué de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques. L'arbre vasculaire sanguin se structure en vaisseaux de gros calibre (artères ou veines), en artérioles, veinules et capillaires. Le réseau vasculaire lymphatique est composé de capillaires lymphatique dépourvu de valves et de plus gros vaisseaux entourés d'une lame basale et contenant des valves permettant l'écoulement unidirectionnel de la lymphe.

**Système vasculaire sanguin.** Les **gros vaisseaux** sont constitués de 3 couches successives, qui sont, du centre vers la périphérie des vaisseaux : **l'intima** (*tunique interne*), constituée de cellules endothéliales et d'une tunique élastique interne ; **la média** (*tunique moyenne*), constituée de cellules musculaires lisses, d'une tunique élastique externe (composée de collagène et d'élastine) ; et de **l'adventice** (*tunique externe*) constituée de tissu conjonctif (fibroblastes). La média, grâce aux cellules musculaires lisses qui la composent, joue un rôle de soutien en permettant le maintien du tonus vasculaire et régule le flux sanguin. Les cellules endothéliales constituant les **artérioles** sont totalement recouvertes de cellules musculaires lisses étroitement rapprochées et placées en circonférences autour du vaisseau. La couche de cellules musculaires lisses recouvrant les **veinules** est moins serrée, l'extravasation de molécules et de cellules a principalement lieu au niveau de ces vaisseaux. Enfin, les **capillaires**, qui sont les vaisseaux les plus fins et les plus abondants, sont constitués de cellules endothéliales entourées de membrane basale et d'une couche clairsemée de péricytes.

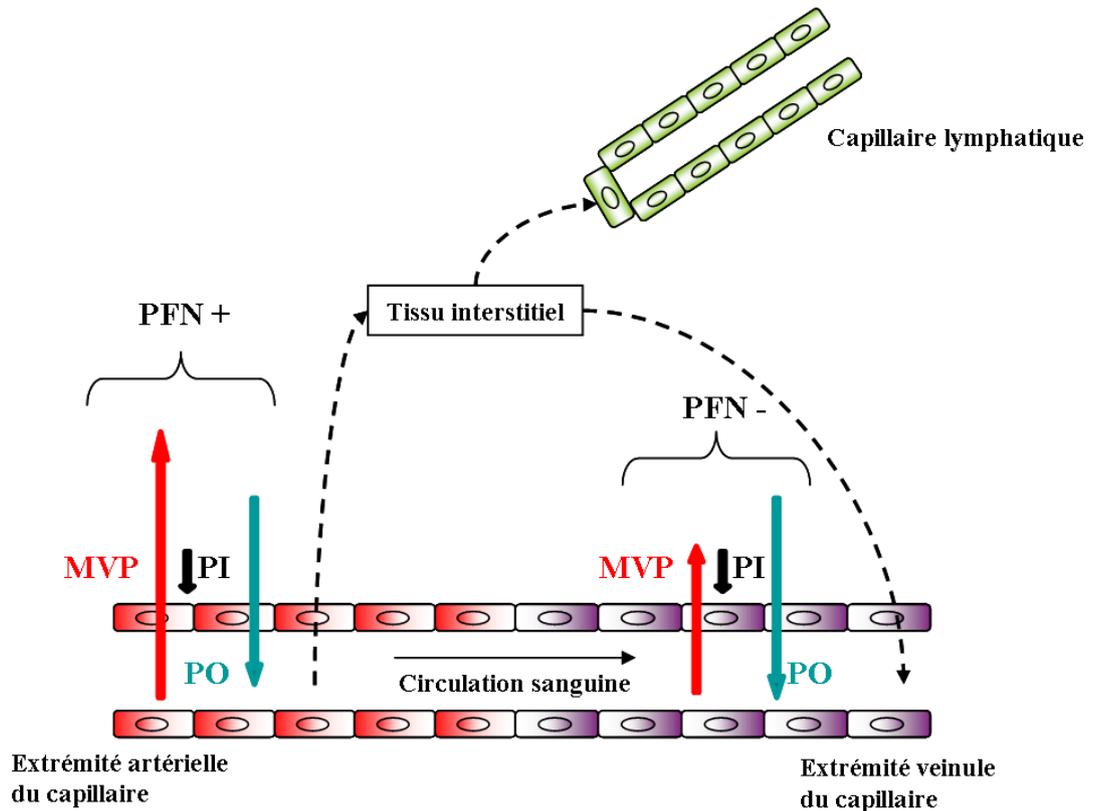
La structure des capillaires leur confère la caractéristique de **zone d'échanges** (gazeux, liquidiens et métaboliques) entre le système circulatoire et les différents tissus qu'ils traversent. Il existe 3 types de capillaires : *les capillaires continus* possèdent par définition des cellules endothéliales jointives reposant sur une lame basale également continue. Les capillaires continus sont courants par exemple au niveau des muscles, du tube digestif et des poumons ; *les capillaires fenestrés* se distinguant des précédents par la présence de très nombreuses perforations dans la paroi endothéliale (pores de 70 nm), ils reposent sur une lame basale continue. On les observe dans les tissus où les échanges moléculaires sont importants (intestin, rein, plexus choroïdes, glandes endocrines) ; et *les capillaires discontinus sont aussi appelés sinusoides* : de diamètre grand et irrégulier ils possèdent de véritables orifices trans-cytoplasmiques (1 à 3  $\mu\text{m}$ ) ; leur membrane basale est discontinue, voire absente (foie). Ils ralentissent le courant sanguin et permettent les échanges entre le sang et le tissu ; on les rencontre dans la rate, le foie, la moelle osseuse.

### **Les capillaires : zone d'échange entre la circulation sanguine et les tissus.**

L'échange de molécules entre le sang circulant dans les capillaires et le tissu est gouverné par diffusion et par convection. Alors que la **diffusion** des petites molécules (notamment oxygène,  $\text{CO}_2$ , nutriments) est due à des **gradients de concentration**, le passage des **macromolécules** est gouverné par des gradients de pression instaurés par le mouvement des fluides. On parle alors de mouvements de **convection**, force qui oppose les **pressions hydrostatiques** (forces exercées par un liquide contre une paroi) et la **pression osmotique** (figure 5).

La **pression hydrostatique des capillaires**, ou pression microvasculaire (**MVP**), correspond à la pression exercée par le sang sur les parois internes des capillaires. La pression sanguine diminue à mesure que le sang avance dans le capillaire, elle est donc plus élevée du côté artériel que du côté veineux. A l'inverse, la **pression hydrostatique du liquide interstitiel**, ou pression interstitielle (**PI**), correspond à la pression exercée par le liquide interstitiel sur les parois externes des capillaires. La différence entre la pression microvasculaire et la pression interstitielle définit la **pression hydrostatique nette**. Dans un tissu normal, la pression interstitielle est proche de 0 mm Hg car le système lymphatique draine en permanence les liquides et protéines présents dans le compartiment interstitiel. De ce fait, la pression hydrostatique nette est égale à la pression microvasculaire.

La **pression oncotique (PO)** est la pression créée par l'eau (*pression osmotique*) qui tend à passer au travers des parois des capillaires vers le compartiment où se trouvent la plus haute concentration en protéines plasmatiques (qui elles ne traversent pas les parois des capillaires). Ces protéines, contenues en abondance dans le sang, restent dans les capillaires créant ainsi un mouvement d'eau du tissu interstitiel vers les capillaires. La pression oncotique est stable tout le long du capillaire et correspond à une force qui tend à faire passer les liquides du tissu interstitiel vers les capillaires. Cette pression permet une réabsorption d'eau au niveau de l'extrémité veinule du capillaire. **La pression oncotique s'oppose donc la pression hydrostatique nette.**



**MVP : pression microvasculaire**

**PI : pression interstitielle**

**PO : pression oncotique**

**PFN : Pression nette de filtration**

---> **Circulation d'eau et de molécules**

**Figure 5 : Schéma représentant les mouvements par convection permettant les échanges entre capillaire et tissus.**

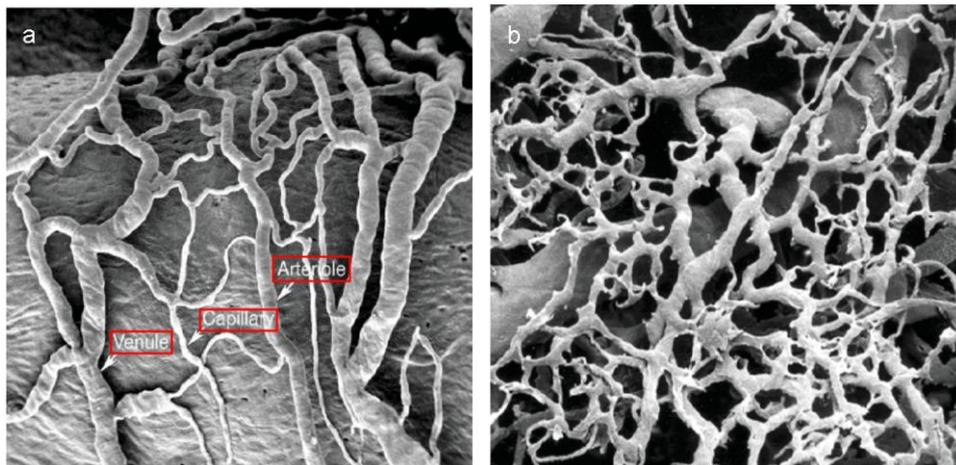
L'échange de molécules et d'eau entre le capillaire et le tissu est gouverné par les mouvements de convection instaurés par des gradients de pression. La pression nette de filtration (PFN) correspond à la résultante des pressions hydrostatique nette (= différence entre pression microvasculaire et pression interstitielle) et oncotique. A l'extrémité artérielle du capillaire, la pression nette de filtration est positive et permet le passage de molécule du capillaire vers le tissu interstitiel. A l'inverse, la pression de filtration nette est négative à l'extrémité veineuse du capillaire et permet le retour de l'eau et des déchets métaboliques dans la circulation sanguine. Le système lymphatique draine molécules et excès de fluide présents dans le tissu interstitiel.

La **pression nette de filtration** (PFN) correspond à la résultante des pressions hydrostatique nette et oncotique. Lorsque la pression hydrostatique nette dépasse la oncotique, la pression nette de filtration est positive et permet le passage de molécules du capillaire (du côté artériel) vers le tissu interstitiel. C'est l'inverse au niveau du côté veineux du capillaire. La pression oncotique dépasse la pression hydrostatique nette, la pression nette de filtration est négative et permet le passage d'eau et de molécules du tissu interstitiel vers le capillaire

(du côté veinule). Le système lymphatique draine en permanence molécules et excès de fluide présents dans le tissu interstitiel évitant ainsi leur accumulation.

## 2. Désorganisation de l'architecture vasculaire dans une tumeur

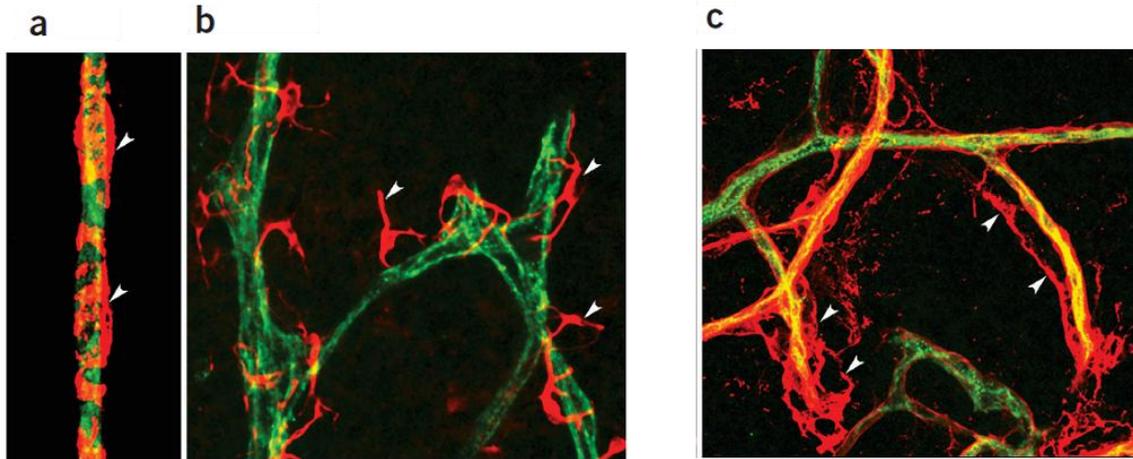
Dans une tumeur, il existe des « anomalies » fonctionnelles et structurales apparaissant lors de la maturation des néo-vaisseaux tumoraux (McDonald and Choyke 2003). Ces anomalies résultent de la sécrétion constante des facteurs pro-angiogéniques par la tumeur (Jain 2003). Les vaisseaux tumoraux sont désorganisés au niveau architectural. En effet, la hiérarchie retrouvée classiquement dans les tissus normaux, à savoir artérioles, capillaires et veinules (figure 6a), reste floue dans les tumeurs. Par ailleurs, les vaisseaux sanguins tumoraux sont de diamètres inégaux (figure 6b). Cette inégalité est en partie due à la pression exercée par les cellules tumorales en prolifération (Fukumura and Jain 2008).



**Figure 6 : Comparaison des structures d'un réseau vasculaire en condition physiologique et dans une tumeur.**

(D'après McDonald DM, 2003). (a) Dans un tissu normal, les vaisseaux sont organisés en Artériole, Capillaire et Veinule. (b), dans une tumeur, cette hiérarchisation n'est pas retrouvée et les vaisseaux sanguins tumoraux sont de diamètres inégaux.

Les vaisseaux tumoraux sont considérés comme des vaisseaux immatures. En effet, contrairement aux vaisseaux normaux (figure 7a), l'association entre les cellules endothéliales et les péricytes est diminuée, aboutissant à un recouvrement partiel du vaisseau tumoral (figure 7b). De plus, la lame basale des vaisseaux tumoraux est anormalement discontinue et d'épaisseur variable (figure 7c).



**Figure 7 : Les vaisseaux tumoraux sont immatures.**

(Modifié d'après McDonald DM, 2003). (a) recouvrement d'un vaisseau normal (vert) par les péricytes (rouge). (b), ce recouvrement est imparfait au niveau des vaisseaux tumoraux : les péricytes sont moins nombreux et l'association entre les péricytes (en rouge) et l'endothélium (en vert) est diminuée. (c) : La lame basale (en rouge, pointée par des flèches) des vaisseaux tumoraux est également anormale, elle est discontinue et d'épaisseur variable.

Le VEGF, ayant pour principal médiateur le monoxyde d'azote (NO) (Fukumura et al. 2001), est responsable de l'**hyperperméabilité des vaisseaux tumoraux**. En effet, il induit la formation de structures spécifiques des cellules endothéliales : les organelles vésiculo-vacuolaires. Ces vésicules sont des regroupements de vésicules qui forment un canal transendothélial continu et permettent le transport de fluides et de molécules à travers l'endothélium vasculaire. (Vandoorne et al. 2010). D'autre part, le VEGF est capable de diminuer les jonctions cellulaires (jonctions d'ancrage et jonctions serrées) via la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la protéine *zonula occludens-1* (Bates 2010). Le NO agit également sur les jonctions cellulaires puisqu'il induit la nitrosylation de la  $\beta$ -caténine (protéine de jonction) (Thibeault et al. 2010). De ce fait, les **cellules endothéliales** des vaisseaux tumoraux forment un **revêtement imparfait** avec de nombreuses **ruptures et séparations** au niveau des jonctions intercellulaires.

### Conséquences de ces anomalies sur le passage de molécules (telles que les agents anticancéreux) vers le tissu tumoral.

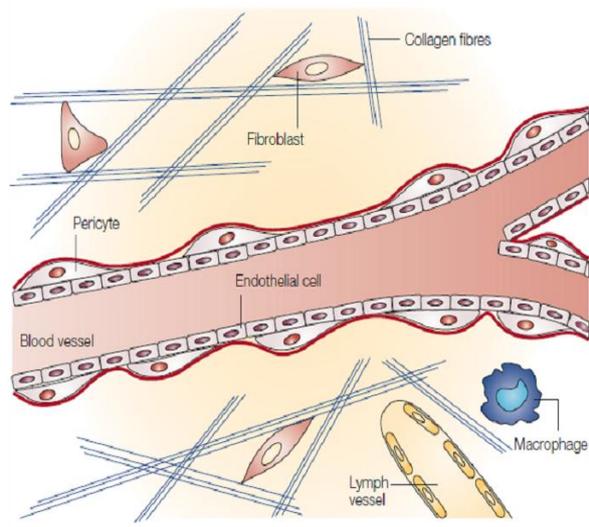
Les anomalies structurales des vaisseaux tumoraux que nous venons de décrire, aboutissant à un flux sanguin hétérogène, ne sont pas sans conséquence sur leur fonctionnalité. A ces anomalies des vaisseaux sanguins, on associe également une anomalie des vaisseaux lymphatiques. Les cellules tumorales, en constante prolifération dans un espace

confiné, compriment les **vaisseaux lymphatiques** intratumoraux en formation, les rendant **non fonctionnels** (absence de drainage) (Fukumura and Jain 2007) (Leu AJ, 2000). Dans certaines tumeurs (exemple : cancer du sein invasif) ; il a même été reporté qu'aucun vaisseau lymphatique intratumoral n'est détectable (Alitalo and Carmeliet 2002). Cette absence de drainage lymphatique du liquide interstitiel associée à l'hyperperméabilité vasculaire aboutit à une accumulation de protéines plasmatiques et d'eau dans le tissu interstitiel. Ceci aboutit à une **augmentation de la pression interstitielle (PI) tumorale**.

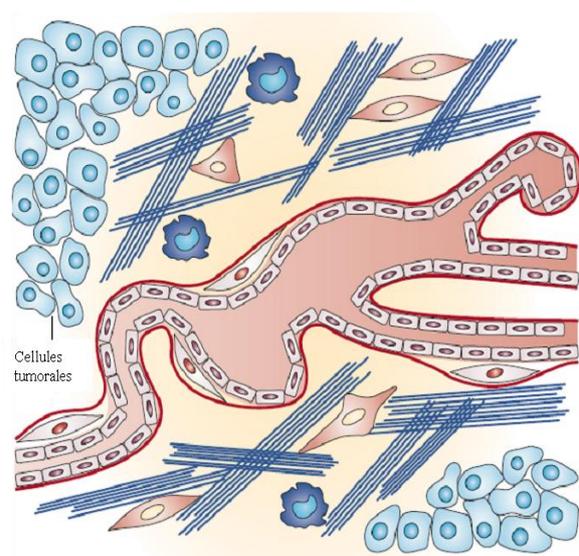
La fuite de protéines plasmatiques (due à la perméabilité des vaisseaux) fait que la pression oncotique est négligeable. Celle-ci n'influe donc plus sur le transport transvasculaire des molécules (Tong et al. 2004). Dans une tumeur, la pression interstitielle élevée égalise la pression microvasculaire (Boucher and Jain 1992; Netti et al. 1995), de ce fait, la **pression nette de filtration** devient **une pression nulle voire négative** et s'oppose au passage des molécules du sang vers la tumeur (Heldin et al. 2004; Jain and Stylianopoulos 2010). Le principal mécanisme de transport des molécules devient la diffusion, qui est un phénomène plus lent et moins efficace que la convection (notamment pour les grosses molécules telles que les anticorps). On assiste ainsi à une **stagnation des molécules anticancéreuses autour des vaisseaux sanguins**, ce qui rend les tumeurs moins sensibles aux traitements (Goel et al. 2011).

Outre une augmentation de la perméabilité vasculaire, l'élévation de la pression interstitielle est également causée par la force mécanique exercée par le stroma tumoral. En effet, le stroma tumoral est composé d'un réseau fibrillaire très dense et rigide formé de fibres de collagène (synthétisé par les fibroblastes stimulés par le TGF- $\beta$ ) et de fibrine (provenant du fibrinogène plasmatique). Le stroma tumoral apparaît comme un environnement favorable à la prolifération des myofibroblastes, cellules qui présentent un phénotype proche de celui des cellules musculaires lisses avec des propriétés contractiles (Bouzin and Feron 2007). En effet, des cellules immunitaires sécrètent de nombreuses cytokines et facteurs de croissances comme le TGF- $\beta$  ou le PDGF (dont le récepteur PDGFR- $\beta$  est surexprimé dans le stroma de plusieurs types de tumeurs) (Lunt et al. 2009). Ces molécules permettent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ainsi, après leur fixation aux fibres de collagène par un mécanisme dépendant des intégrines, les myofibroblastes augmentent la tension entre les fibres du stroma, ce qui exerce une tension sur les vaisseaux et contribue ainsi à l'élévation de la PI (Heldin et al. 2004). La figure suivante compare le microenvironnement tumoral avec un tissu normal.

### A. Tissu normal



### B. Tumeur



**Figure 8 : Différences entre les stromas des tissus normaux et tumoraux qui affectent la pression interstitielle.**

(D'après (Heldin et al. 2004). **A.** Les tissus normaux contiennent des vaisseaux sanguins linéaires dont le recouvrement par des péricytes permet le maintien de leur intégrité. Le stroma consiste en un réseau fibrillaire relâché et ne contient que quelques fibroblastes et macrophages. Les vaisseaux lymphatiques sont également présents. **B.** Les tissus tumoraux contiennent des vaisseaux sanguins anormaux (hyperperméables, tortueux, immatures) et des cellules endothéliales activées. Les vaisseaux lymphatiques sont non fonctionnels voir inexistant. Le stroma est très dense et rigide, les nombreux fibroblastes se fixent aux fibres de collagène, accentuant encore la tension entre les fibres. Ces 3 caractéristiques (perméabilité vasculaire, vaisseaux lymphatiques non fonctionnels et stroma rigide) jouent un rôle dans l'élévation de la pression interstitielle.

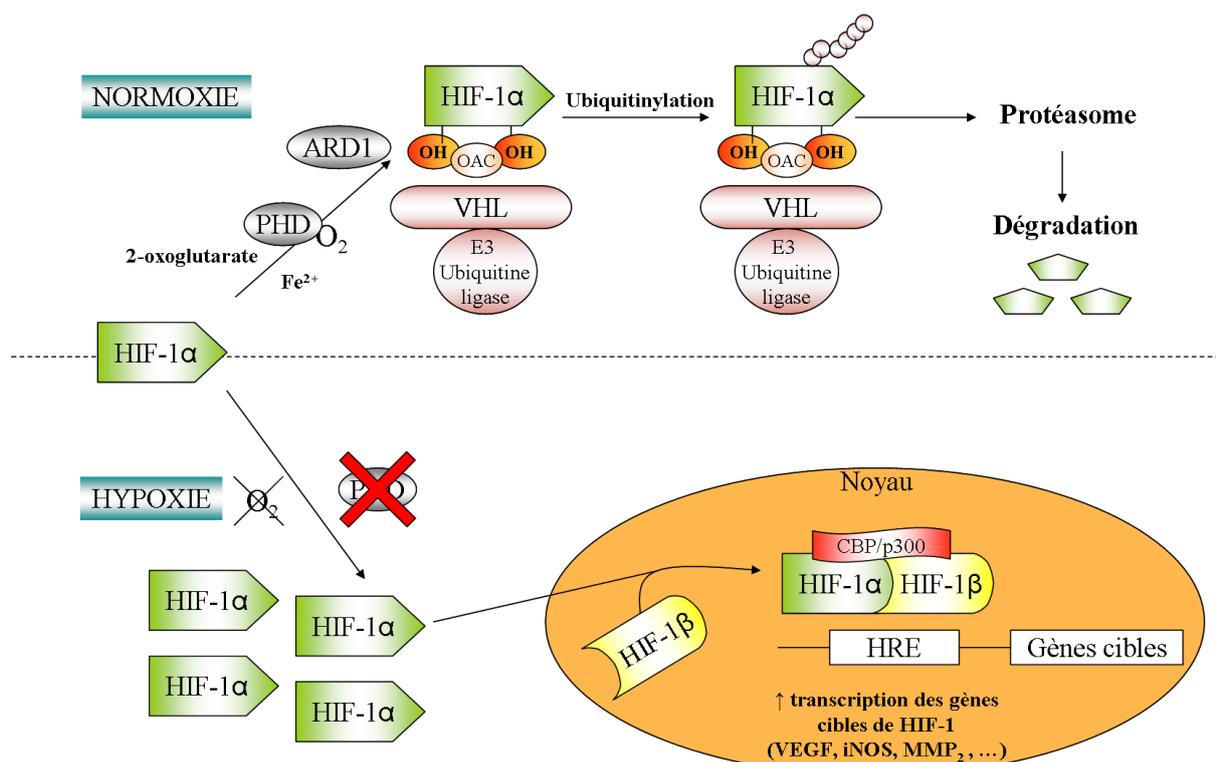
Enfin, les cellules endothéliales composant les vaisseaux tumoraux sont également connues pour avoir des propriétés différentes des cellules endothéliales normales. En effet, les cellules endothéliales issues des tumeurs expriment des molécules d'adhésion et des récepteurs aux facteurs de croissance ce qui leur confère un phénotype de cellules endothéliales activées (St Croix et al. 2000). Elles sont donc plus sensibles aux facteurs pro-angiogéniques (tels que bFGF et VEGF) et présentent des capacités de migration, de prolifération, de survie et digestion de la matrice extracellulaire augmentées (Furuya et al. 2005). De plus, il a été montré que les cellules endothéliales tumorales (issues de cancer du sein) sont résistantes à l'apoptose induite par la chimiothérapie (doxorubicine et vincristine) (Grange et al. 2006).

## B. Formation des vaisseaux tumoraux

### 1. L'hypoxie, un facteur déclencheur de l'angiogenèse tumorale

Au-delà d'un certain volume (2-3 mm<sup>3</sup>), la tumeur n'est plus correctement oxygénée et devient hypoxique (Jain 2003). L'hypoxie va permettre la stabilisation du facteur de transcription induit par l'hypoxie : HIF-1. La régulation de ce facteur par les conditions normoxiques et hypoxiques est présentée dans la figure 9.

En condition de **normoxie**, les résidus proline 402 et 564 (Pro<sup>402</sup> et Pro<sup>564</sup>) de la sous-unité  $\alpha$  de HIF-1 sont hydroxylés par les prolyl hydroxylases (PHD, dont il existe 3 isoformes). L'activité de ces enzymes est dépendante de l'oxygène (substrat), du fer (cofacteur) et du 2-oxoglutarate. L'hydroxylation (-OH) des résidus Proline ainsi que l'acétylation (AOc) du résidu Lysine 532 (Lys<sup>532</sup>) par l'acétyltransférase ARD1 permettent à la protéine von Hippel-Lindau (VHL), composant du complexe E3-ubiquitine ligase du protéasome, de reconnaître et d'ubiquitinyler HIF-1 $\alpha$ . Ce dernier est alors reconnu par la sous-unité 26S du protéasome et est dégradé.



**Figure 9 : Régulation du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1).**

En condition de normoxie, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée (-OH) par les PHD (prolyl hydroxylase) et acétylée (AOc) par l'acétyltransférase ARD1. La protéine von Hippel-Lindau (VHL), composant du complexe E3-ubiquitine ligase du protéasome, reconnaît et ubiquitinyne HIF-1 $\alpha$  qui sera dégradée par le protéasome.

En condition hypoxique, l'activité des PHD est inhibée par le manque d'oxygène. HIF-1 $\alpha$  est transloquée vers le noyau où elle s'associe avec la sous-unité  $\beta$  de HIF-1. Le complexe HIF-1 fixe les facteurs de transcription (tels que CBP/p300), reconnaît les séquences HRE (Hypoxia Response Element) présents sur les promoteurs des gènes cibles, augmentant ainsi leur transcription.

En condition d'**hypoxie**, l'absence du substrat ( $O_2$ ) des prolyl hydroxylases inhibe leur capacité d'hydroxylation. La sous-unité HIF-1 $\alpha$  se stabilise et s'accumule dans le cytosol. Elle est ensuite transloquée vers le noyau où elle s'associe avec la sous-unité  $\beta$  de HIF-1. Le complexe HIF-1 $\alpha\beta$  se lie aux facteurs de transcription (tels que CBP/p300), et reconnaît les séquences HRE (Hypoxia Response Element) présents sur les promoteurs des gènes cibles, augmentant ainsi leur transcription (Clottes 2005) (Lauzier et al. 2006). Plusieurs de ces gènes cibles sont impliqués dans l'angiogenèse (facteurs de croissance, les NO synthases endothéliale et inducible ou encore certaines métalloprotéases) (Coulet et al. 2003) alors que d'autres (tels que la carbonique anhydrase IX, le facteur de croissance épithélial ou EGF...) permettent aux cellules tumorales de modifier leur métabolisme et de survivre dans un environnement hypoxique.

Parmi les gènes cibles de HIF-1 $\alpha$ , on trouve le VEGF, sécrété en grande quantité par les cellules tumorales ainsi que d'autres facteurs de croissance comme le PDGF (plaquettes)

et le bFGF (fibroblastes). On assiste alors à un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques, c'est le « **switch angiogénique** » (Bergers and Benjamin 2003).

## 2. Switch angiogénique

Il existe deux types de facteurs : les **facteurs pro-angiogéniques**, qui jouent un rôle dans l'induction de l'angiogenèse ; et les **facteurs anti-angiogéniques** dont le rôle est de contrebalancer l'effet des facteurs inducteurs de l'angiogenèse (tableau III). Nous ne donnerons que quelques exemples de ces facteurs, et détaillerons le principal facteur pro-angiogénique, le **VEGF**.

Facteurs anti-angiogéniques	Rôles	Sources	Facteurs pro-angiogéniques	Rôles	Sources
Thrombospondine-1	Inhibe la prolifération, l'adhésion, la migration et la survie des CE	Plaquettes (granule- $\alpha$ )	VEGF	Stimule l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire	Cellules en manque d'O <sub>2</sub> (ex : cellules tumorales)
Angiostatine	Inhibe migration et survie des CE	plasminogène	PDGF	Recrutement des Cellules musculaires lisses et péricyte, rôle dans la migration et la prolifération	Plaquettes, CE, cellules musculaires lisses, macrophages
Endostatine	Inhibe migration et survie des CE	Collagène XVIII	TGF	Induit la différenciation des CE	Macrophages
Tumstatine	Inhibe synthèse protéique et survie des CE	Collagène IV	FGF	Stimule l'angiogenèse et l'artériogenèse	Nombreuses dont : fibroblastes, CE...
Fragment antithrombine-3	Diminue la prolifération et augmente l'apoptose des CE	Plasma	EGF	Induit la prolifération et la différenciation des CE	Plaquettes, macrophages
Prolactine (fragment 16kDa)	Inhibe les effets de bFGF et VEGF	Cellules lactophores hypophysaire	Ephrines	Stimulent l'angiogenèse et la migration des cellules	CE, cellules du SI
Troponine I	Diminue la prolifération des CE	Cellules musculaires	Angiogénine	Stimule la prolifération des CE	CE, cellules tumorales, Cellules musculaires lisses, fibroblastes
TIMPs	Bloque les effets des MMP et la prolifération des CE	Cellules musculaires lisses	Angiopoïétine	Ang1 : stabilise les vaisseaux, favorise les interactions des cellules musculaires lisses Ang2 : déstabilise les vaisseaux avant bourgeonnement	Péricytes. CE, cellules tumorales
Facteur plaquettaire 4	Bloque l'activité du VEGF et du FGF en se liant à ces molécules	Plaquettes (granule- $\alpha$ )	MMP	Protéinases impliquées dans la migration cellulaire et le remodelage de la MEC, libère bFGF et VEGF de la matrice	CE, cellules tumorales
Interférons (INF $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	Diminue la migration des CE	Cellules du SI, dendritiques, fibroblastes	NOS et prostaglandines (cox-2)	Stimulent l'angiogenèse et la vasodilatation	CE, cellules tumorales, cellules du SI, plaquettes...
Interleukines (IL-4, -12, -18)	Bloque migration des CE. IL-12 augmente expression de INF- $\gamma$	Cellules dendritiques, macrophages	LPA	Induit la prolifération, la migration des CE et la formation de pseudocapillaires	Plaquettes, adipocytes
Ang2	Antagoniste d'Ang1, induit la régression des vaisseaux en l'absence de signaux angiogéniques	Cellules endothéliales (CE)	TNFalpha	Recrutement des macrophages qui sécrètent d'autres facteurs pro-angiogéniques	Macrophages, fibroblastes

### Tableau III : Facteurs régulant l'angiogenèse.

(Modifié d'après (Conway et al. 2001)). Abréviations : Système Immunitaire (SI). Cellules Endothéliales (CE). Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Facteur de croissance des fibroblastes (FGF). Inhibiteurs tissulaires des métallo-protéinases (TIMPs). Métallo-protéinases (MMP). Interférons (INF). Interleukines (IL). Angiopoïétine de type 1 (Ang1). Angiopoïétine de type 2 (Ang2). Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Facteur de croissance transformant (TGF). Facteur de croissance épithélial (EGF). NO synthase (NOS). Cyclooxygénase de type 2 (cox-2). Acide lysophosphatidique (LPA). Facteur de nécrose tumorale alpha (TNFalpha).

### *a. Facteurs pro-angiogéniques*

**Le monoxyde d'azote (NO)** est un facteur pro-angiogénique important que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

Les **facteurs de croissance synthétisés par les fibroblastes (FGF)** et par les cellules endothéliales. Ce sont des facteurs de croissances polypeptidiques se fixant à leurs récepteurs de types tyrosine kinase. A l'heure actuelle, 22 membres ont été décrits. Parmi ces membres, le FGF-1 (ou aFGF) et le FGF-2 (ou bFGF) ont beaucoup été décrits pour leur propriétés angiogéniques *in vitro* et *in vivo*. Ils sont connus pour induire la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules endothéliales et aussi pour induire la production de MMPs. *In vivo*, ils jouent un rôle dans la maturation des vaisseaux, notamment en permettant le recrutement des péricytes. Il est également connu que les FGF peuvent interagir avec d'autres facteurs comme le VEGF (Wesche et al. 2011) (Presta et al. 2005).

Le **facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)** est sécrété par les plaquettes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales ou encore les macrophages. La famille PDGF est composée de 4 membres : PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, qui s'homodimérisent ou, dans le cas de A et B, qui peuvent s'hétérodimériser. La fixation du ligand à son récepteur active différentes voies de signalisation dont la voie PI3K, Ras-MAPK et la voie des phospholipases C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$  : activation de ERK et libération de calcium intracellulaire), voies impliquées dans la prolifération et la migration des cellules. Le PDGF permet également le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses lors de la maturation des vaisseaux sanguins (Alvarez et al. 2006).

L'**acide lysophosphatidique (LPA)** est un phospholipide bioactif sécrété par les plaquettes et les adipocytes connu pour induire l'expression de HIF1- $\alpha$  et de VEGF-A. Il est capable de réguler plusieurs réponses cellulaires comme la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Teo et al. 2009) (Saulnier-Blache 2004).

### *b. Facteurs anti-angiogéniques*

La **thrombospondine-1 (TSP-1)** est le premier inhibiteur de l'angiogenèse à avoir été décrit (Good et al. 1990). Sécrétée par les plaquettes, cette protéine de la matrice extracellulaire est décrite pour inhiber la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules

endothéliales. Elle est également connue pour induire l'apoptose des CE *in vitro* (Guo et al. 1997). Dans un contexte tumoral, l'inhibition de son expression est impliquée dans l'induction de l'angiogenèse (Watnick et al. 2003). Par ailleurs, sa surexpression inhibe fortement le développement tumoral *in vivo* (Bikfalvi 2003).

L'**angiostatine** est un fragment de plasminogène qui peut être libérée par les métalloprotéases (MMP) après clivage du plasminogène (O'Reilly et al. 1999). Elle inhibe la prolifération et la migration *in vitro* des cellules endothéliales, induit leur apoptose et inhibe l'angiogenèse *in vivo* (Soff 2000).

L'**endostatine**, également découverte par l'équipe de Judah Folkman, est un fragment de la partie C-terminale du collagène XVIII. Elle est principalement connue pour inhiber la prolifération des cellules endothéliales (O'Reilly et al. 1997) et pour son action régulatrice de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse. Elle diminue l'expression du VEGF-A, du FGF et de ses récepteurs et de HIF1- $\alpha$ . L'endostatine est également connue pour induire l'expression d'autres inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine-1 (Judah 2006).

Il a été montré que l'endostatine et l'angiostatine pouvaient jouer un rôle dans le cancer. En effet, ces 2 molécules anti-angiogéniques diminuent la croissance tumorale et inhibent la formation de métastases (Taylor et al. 2009) (Bikfalvi 2003).

### *c. Le VEGF (Vasvular endothelium growth factor) et ses récepteurs*

Les membres de la famille VEGF sont sécrétés sous forme de glycoprotéines dimériques d'environ 40 kDa. Chez les mammifères, la famille des VEGF comprends 6 membres : VEGF-A (le plus actif biologiquement), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le facteur de croissance placentaire (PLGF pour Placenta Growth Factor). Ces ligands peuvent se lier à trois types de récepteurs : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 présents sur différents types cellulaires (Figure 10). Ce sont des récepteurs à tyrosine kinase. Ils sont composés d'une région extracellulaire dotée de 7 domaines s'apparentant aux immunoglobulines « Ig-like » numérotées de I à VII (*au niveau du VEGFR-3, le 5<sup>ème</sup> domaine « Ig-like » est remplacé par un pont disulfure*). Ils possèdent un court domaine transmembranaire, une région intracellulaire (domaine C-terminal) contenant deux domaines kinases séparés par un insert de

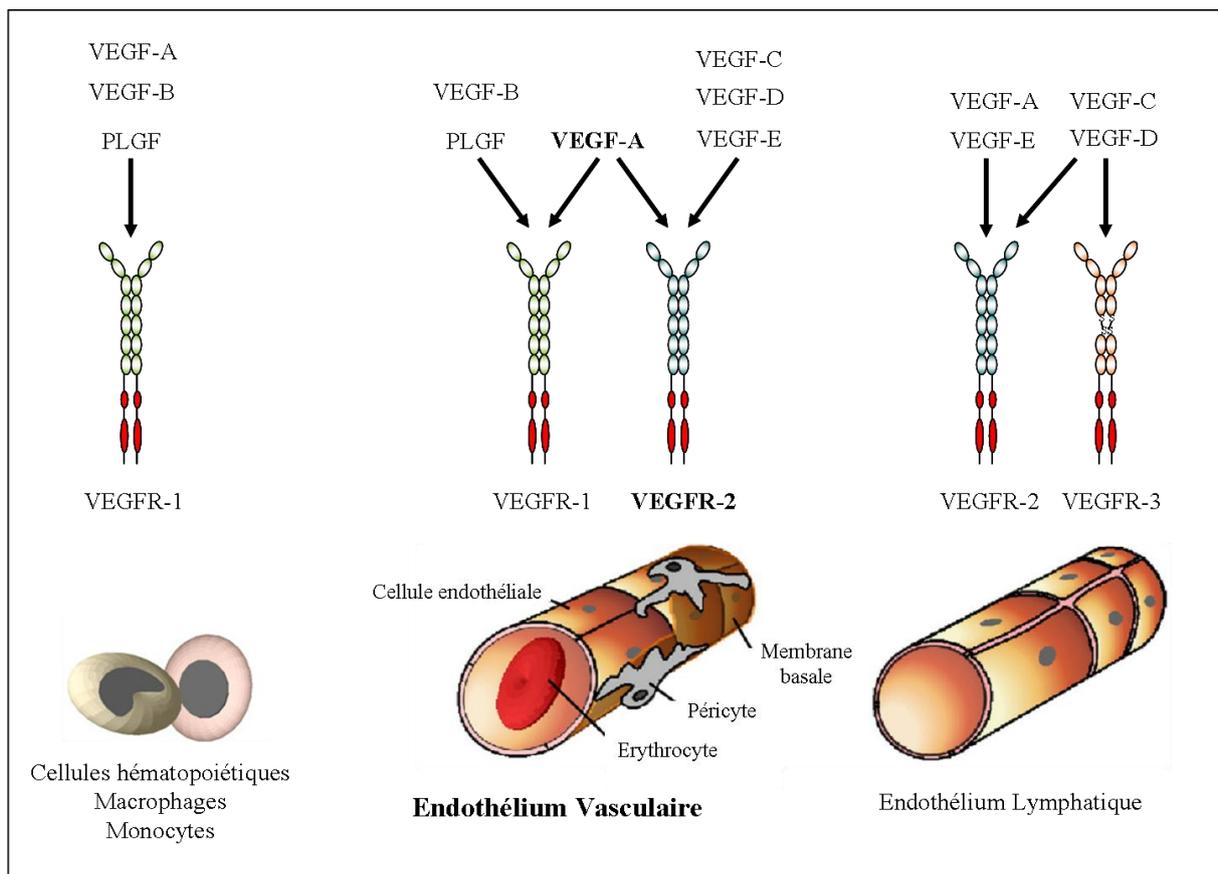
70 acides aminés. Il existe un 4<sup>ème</sup> récepteur au VEGF, le récepteur Neuropilin (NRP 1 /2). Ce récepteur n'a pas d'activité tyrosine kinase et joue le rôle de co-récepteur au VEGF (Ferrara et al. 2003) (Neufeld et al. 1999). La figure 10 représente les différents récepteurs, leurs localisations et leurs ligands.

### **Les récepteurs au VEGF**

Le **VEGFR-1** ou **Flt-1** (pour fms-like tyrosine kinase), exprimé au niveau des cellules hématopoïétiques, des monocytes, des macrophages et des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, est activé après la liaison de VEGF-A, VEGF-B et PLGF. Le VEGFR-1 est important dans la formation de vaisseaux au cours du processus inflammatoire (recrutement des précurseurs des cellules endothéliales) via la fixation du ligand PLGF. L'inactivation du domaine tyrosine kinase du récepteur aboutit à une diminution de l'angiogenèse tumorale (Koch et al. 2011). Par contre, chez des souris VEGFR-1<sup>-/-</sup>, les embryons ne survivent pas à cause d'une prolifération excessive des cellules endothéliales et d'un réseau vasculaire désorganisé et non fonctionnel (Shibuya 2011). Pendant l'embryogenèse, le VEGFR-1 servirait de « réservoir » au VEGF-A, diminuant la fixation de ce dernier au VEGFR-2 ainsi que les signaux transmis par cette fixation (Shibuya 2011).

Le **VEGFR-2**, ou Flk-1 / KDR (foetal liver kinase / kinase-insert domain receptor) est exprimé au niveau des CE des vaisseaux sanguins et lymphatiques et est activé par la fixation de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Plusieurs études ont montré l'importance de l'activation du VEGFR-2 par le **VEGF-A** dans les cellules endothéliales concernant l'induction de l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, la migration et la prolifération (Ferrara et al. 2003). En effet, la délétion de VEGFR-2 (Shalaby et al. 1995) ou de VEGF-A (Ferrara and Davis-Smyth 1997) chez la souris aboutit à un défaut dans le développement du réseau vasculaire, provoquant la mort des embryons. L'affinité du VEGF-A pour le VEGFR-2 est plus faible que pour le VEGFR-1, cependant, l'activité biologique qui en découle est 10 fois plus importante. En comparaison avec les tissus normaux, le VEGFR-2 est surexprimé à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux (Holmes et al. 2007). De plus, le VEGF-A a été détecté à des concentrations très élevées dans un certain nombre de tumeurs. Cette surexpression est accompagnée d'une augmentation significative de la densité vasculaire des tumeurs (Bikfalvi 2003).

Le **VEGFR-3**, ou Flt-4, est exprimé au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques au cours du développement embryonnaire mais son expression est ensuite restreinte aux cellules endothéliales lymphatiques chez l'adulte. Il présente une haute affinité pour les ligands VEGF-C et VEGF-D. L'extinction du gène codant pour le VEGFR-3 chez la souris entraîne la mort de l'embryon. Le blocage de la fonction du VEGFR-3 chez la souris adulte par une forme recombinante soluble entraîne une régression des vaisseaux lymphatiques mais semble sans effet sur les vaisseaux sanguins (Cross et al. 2003).

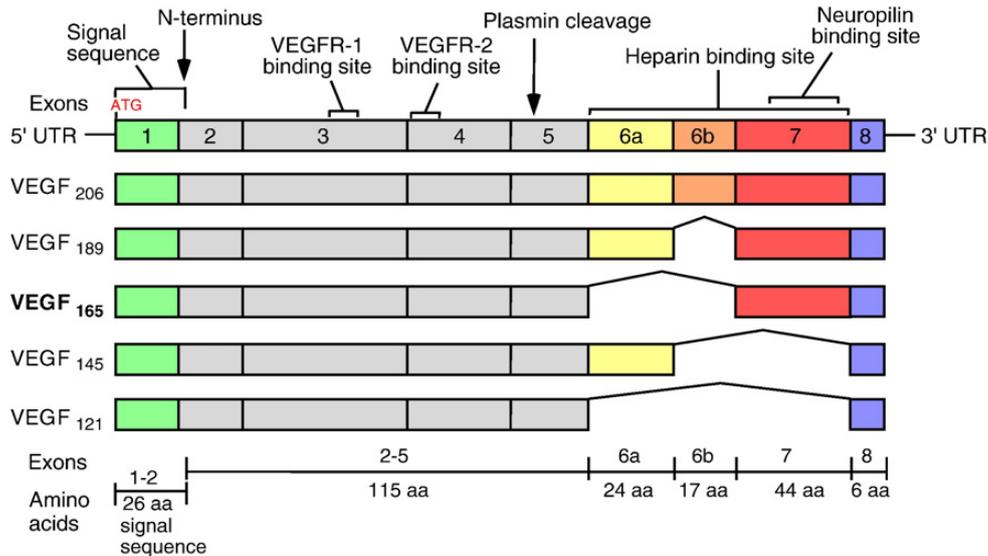


**Figure 10 : La famille des VEGF et leurs récepteurs.**

Modifié d'après (Holmes et al. 2007). Présentations des 3 types de récepteurs au VEGF, de leur localisation cellulaire et de leur ligand. Chaque ligand de la famille des VEGF (-A, -B, -C, -D, -E et PLGF), se lie de manière spécifique à un ou plusieurs des 3 récepteurs à tyrosine kinase : VEGFR-1, -2 et -3. VEGFR-1 est exprimé au niveau des cellules hématopoïétiques, des monocytes, des macrophages et des cellules endothéliales (CE) des vaisseaux sanguins. Il est activé après la liaison de VEGF-A, VEGF-B et PLGF. VEGFR-2 est exprimé au niveau des CE des vaisseaux sanguins et lymphatiques et est activé par la fixation de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. L'expression de VEGFR-3 est restreinte aux CE lymphatiques chez l'adulte. Il présente une haute affinité pour les ligands VEGF-C et VEGF-D.

### Les différentes formes du VEGF-A :

Découvert en 1983 par l'équipe de Donald Senger, le VEGF-A a été le premier membre décrit et a d'abord été appelé facteur de perméabilité vasculaire ou VPF (Cross and Claesson-Welsh 2001). Il s'agit du membre des VEGF présentant l'activité biologique la plus importante. Chez l'Homme, le gène du VEGF-A est organisé en huit exons séparés par sept introns. A ce jour, 6 isoformes ont été identifiées après épissage alternatif d'un seul ARNm (figure 11). Ces isoformes ont été nommées en fonction du nombre d'acides aminés qui les composent après le clivage de la séquence signal (« Signal sequence », en vert sur la figure 11), nous avons : VEGF<sub>206</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>145</sub> et VEGF<sub>121</sub>. La forme **VEGF<sub>121</sub>**, ne se liant pas à l'héparine, et la forme **VEGF<sub>145</sub>**, sont sécrétées sous forme soluble. La forme **VEGF<sub>165</sub>**, qui se lie de façon modérée à l'héparine est la forme plus abondante et la plus active biologiquement. C'est un homodimère de 46 kDa composé de deux sous-unités de 23 kDa chacune. La **liaison à l'héparine** (formation d'un complexe) est essentielle à l'activité du VEGF<sub>165</sub>. En effet, elle est nécessaire à la phosphorylation de VEGFR-2 et à l'activation des cellules endothéliales (prolifération et formation de pseudo-capillaires) (Ashikari-Hada et al. 2005). Les formes les plus lourdes, **VEGF<sub>206</sub>**, **VEGF<sub>189</sub>**, se lient fortement à l'héparine mais reste séquestrées dans la matrice extracellulaire. Les formes VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>183</sub> et VEGF<sub>189</sub>, sont retrouvées dans de nombreux tissus. En revanche, les formes VEGF<sub>145</sub> et VEGF<sub>206</sub> sont plus rares et semblent restreintes aux cellules d'origine placentaire (Robinson and Stringer 2001).



**Figure 11 Structure et épissage alternatif de l'ARNm du VEGF-A humain**

(D'après (Holmes et al. 2007)). Après épissage alternatif de l'ARNm du VEGF, 6 isoformes protéiques sont traduites et nommées en fonction du nombre d'acides aminés qui les composent. Le VEGF<sub>121</sub> est un polypeptide acide qui ne se lie pas à l'héparine et qui diffuse librement. VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub> sont hautement basiques et se lient à l'héparine avec une forte affinité, mais sont complètement séquestrés dans la matrice extracellulaire. Enfin le VEGF<sub>165</sub> a des propriétés intermédiaires, il se lie à l'héparine avec une affinité modérée. Il est aussi sécrété mais une fraction reste cependant liée à la surface cellulaire et à la matrice extracellulaire (Ferrara et al. 2003). La liaison à l'héparine est essentielle à l'activité du VEGF<sub>165</sub>.

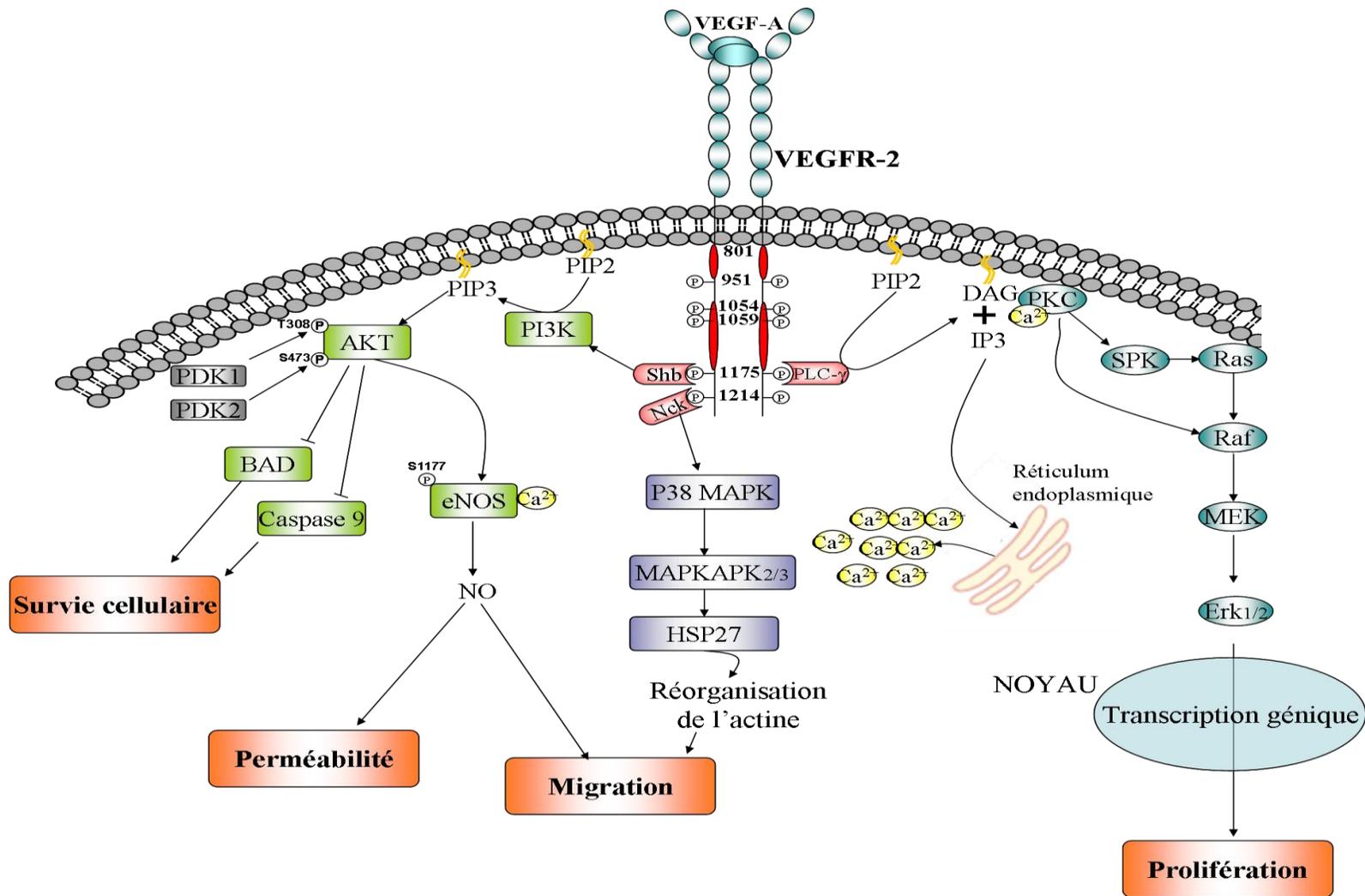
**Voies de signalisation induite par la fixation du VEGF-A au VEGFR-2.** La figure 12 présente les principales voies de signalisation induite par la fixation du VEGF-A au VEGFR-2 et impliquées dans l'angiogenèse. Ces voies sont induites par la liaison du VEGF-A au niveau des domaines Ig-like II et III du VEGFR-2. Cette liaison aboutit à la dimérisation et à l'autophosphorylation du récepteur. Sur les 11 résidus tyrosines connus à ce jour, 6 ont été identifiés comme étant les sites majeurs de phosphorylation : Tyr801, Tyr951, Tyr1054, Tyr1059, Tyr1175 et Tyr1214. La phosphorylation du résidu Tyr801 reste controversé, cependant, il semblerait qu'elle précède celle des résidus Tyr1054 et Tyr1059 et qu'elle soit requise pour l'activation de la eNOS (Blanes et al. 2007). La phosphorylation des résidus Tyr1054 et Tyr1059 est requise pour l'activité kinase maximale du récepteur. La phosphorylation de ces résidus permet le recrutement de la protéine Src, ce qui au final aboutit à la phosphorylation d'autres résidus tels que le résidu Tyr1175 (Koch et al. 2011).

La phosphorylation du résidu **Tyr1175** permet la liaison et la phosphorylation de la phospholipase C- $\gamma$  (**PLC- $\gamma$** ). PLC- $\gamma$  va hydrolyser PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) ce qui aboutit à la génération du DAG (diacylglycérol) et de IP3 (inositol 1,4,5 trisphosphate). IP3, en se fixant au niveau du réticulum endoplasmique, entraîne une

libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (activation de la protéine kinase-C et de la NOS endothéliale). Le DAG est aussi un activateur de la PKC (Protéine Kinase C, possède un site de liaison au DAG). La protéine PKC va ensuite activer la voie **Raf/MEK/ERK**, voie impliquée dans la prolifération, soit de façon indépendante de Ras (Takahashi et al. 1999); soit en stimulant Ras par l'intermédiaire de la sphingosine kinase (SPK1) (Shu et al. 2002). Ainsi, le VEGF-A induit la **prolifération des cellules endothéliales** via l'activation de la voie ERK

La phosphorylation du résidu **Tyr1175** permet aussi la fixation de la protéine adaptatrice Shb. Cette protéine, après phosphorylation, permet le recrutement de la protéine phosphoinositide 3-kinase (**PI3K**). PI3K, composée de 2 sous-unités (p110, SU catalytique : p85, SU régulatrice) permet la transformation de PIP2 en PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). La protéine **AKT** (aussi appelée protéine kinase-B, PKB) interagit avec PIP3 et est transloquée au niveau de la membrane. Elle est ensuite phosphorylée au niveau des résidus Thréonine 308 et Sérine 473 par PDK1 (phosphoinositide dependant kinase-1) et PDK2 respectivement (Franke 2008). AKT inactive les protéines proapoptotiques BAD (« Bcl-2 Associated Death promotor ») et caspase 9 aboutissant à la **survie des cellules endothéliales** (Vara et al. 2004). En parallèle, la protéine AKT va activer la protéine NO synthase endothéliale (**eNOS**) en la phosphorylant au niveau du résidu sérine 1177. La eNOS, également activée par l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, est responsable de la synthèse du monoxyde d'azote (NO), facteur impliqué dans **la migration et la prolifération des cellules endothéliales**. La synthèse de NO augmente également **la perméabilité vasculaire** (Cross et al. 2003).

La phosphorylation du résidu **Tyr1214** entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice Nck et permet l'activation de la protéine **P38 MAPK** (P38 mitogen-activated protein kinase). La P38 MAPK va à son tour activer la protéine MAPK-APK 2/3 (MAPK-activating protein kinases 2 et 3), aboutissant à la phosphorylation de la protéine HSP27 (Heat shock protein-27). HSP27 est une molécule chaperonne qui, une fois phosphorylée, perd sa capacité à inhiber la polymérisation de l'actine, aboutissant ainsi à une réorganisation de l'actine et à la **migration des cellules endothéliales** (Huang et al. 2004).



**Figure 12** Voies de signalisation activées par la fixation du VEGF-A au VEGFR-2 dans les cellules endothéliales.

Après fixation du VEGF-A sur le VEGFR-2, trois voies majeures de signalisation sont activées et propagent des signaux qui aboutissent la régulation de plusieurs fonctions cellulaires telles que la survie, la perméabilité, la migration et la prolifération. Ces voies sont PI3K/AKT, PI3K/AKT/eNOS, P38MAPK, PLC-γ (signalisation calcique) et Raf/MEK/Erk

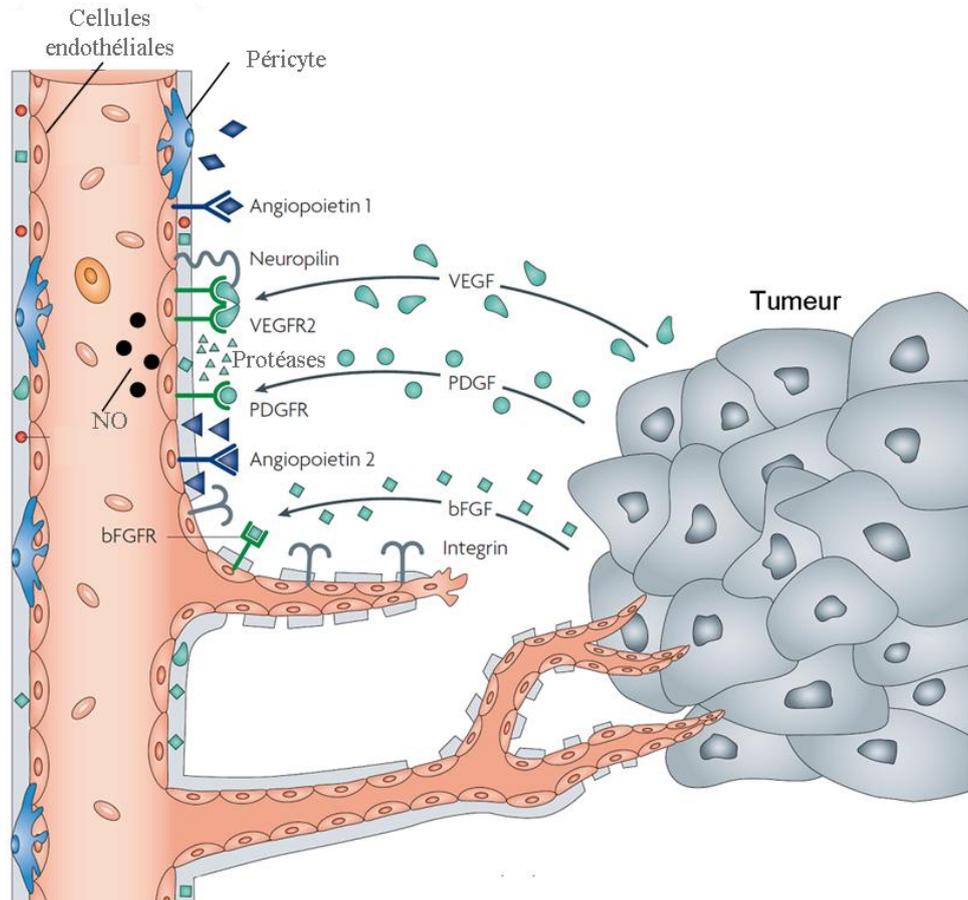
### 3. Formation de nouveaux vaisseaux tumoraux

La formation de nouveaux vaisseaux ainsi que les molécules impliquées sont résumées dans la figure 13. Les facteurs de croissances pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, bFGF) sécrétés par la tumeur vont se fixer à leurs récepteurs à tyrosine kinase exprimés au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux avoisinants (Cross and Claesson-Welsh 2001). Ces dernières passent d'un état quiescent à un état actif au cours duquel elles vont exprimer diverses molécules impliquées dans l'angiogenèse (NO synthase endothéliale ou eNOS, des molécules d'adhésion, des facteurs de croissances...). La **vasodilatation des vaisseaux**, première étape de l'angiogenèse, est induite par le monoxyde d'azote (NO, synthétisé par la NOS endothéliale) et par les prostaglandines (telles que PGE<sub>2</sub>, synthétisées par les cellules tumorales) (Dannenberg et al. 2005). En réponse au VEGF, cette étape est accompagnée par une augmentation de la **perméabilité des vaisseaux**, ce qui aboutit à l'extravasation tissulaire de protéines plasmatiques telles que le fibrinogène et le plasminogène. Ces protéines vont constituer une matrice (support) provisoire sur laquelle les cellules endothéliales actives peuvent migrer (Carmeliet and Jain 2011) (Distler et al. 2003). En effet, les cellules endothéliales activées présentent des capacités de migration, de prolifération et d'adhésion qui leur permettent de former de nouveaux vaisseaux.

Dans un second temps, les cellules endothéliales sécrètent de **l'angiopoiétine-2** (Ang2). Cette molécule, également synthétisée par les cellules tumorales, se fixe au récepteur TIE2 de manière compétitive à l'angiopoiétine-1 (Ang1, qui est impliquée dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins). Ainsi, on assiste à une **déstabilisation des vaisseaux** avec un décollement des péricytes et des cellules musculaires lisses (Bergers and Benjamin 2003). L'Ang2 est également impliquée dans la dégradation de la lame basale et la migration des cellules endothéliales, facilitant la formation de bourgeons vasculaires. Elle renforce l'action des **protéases** (métalloprotéases, collagénases, cathépsines) synthétisées par les cellules endothéliales et par les cellules tumorales. Ces molécules sont responsables de la digestion de la matrice extracellulaire entourant le bourgeon vasculaire, ce qui permet aux cellules endothéliales de migrer et de proliférer.

Ensuite, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion telles que les **intégrines**. Ces molécules, en favorisant l'attachement des cellules endothéliales avec les protéines de la matrice extracellulaire, facilitent la progression du vaisseau en formation vers la tumeur. En conditions physiologiques, les néo-vaisseaux ainsi formés vont être recouvert

de péricytes, de cellules musculaires lisses et de lame basale (Folkman 2007). Cette dernière étape, correspondant à la maturation des nouveaux vaisseaux, est décrite comme incomplète dans les tissus tumoraux.



**Figure 13 : Facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale.**

(D'après Folkman J, 2007). En réponse aux facteurs pro-angiogéniques sécrétés par la tumeur, les cellules endothéliales quittent leur état de quiescence et acquièrent un phénotype activé. La vasodilatation et la perméabilité des vaisseaux avoisinant la tumeur sont induites par le VEGF et le NO (synthétisé par les cellules endothéliales). La sécrétion de l'angiopoïétine-2 permet la déstabilisation des vaisseaux (décollement des péricytes). Elle permet aussi, avec l'aide des protéases, la dégradation de la matrice extracellulaire ce qui facilite la migration et la prolifération des cellules endothéliales. La progression du vaisseau en formation vers la tumeur est facilitée par l'expression des intégrines au niveau des cellules endothéliales.

### III. L'hypoxie et la pression interstitielle : paramètres impliqués dans la résistance des tumeurs aux agents anticancéreux

L'hypoxie (faible pression partielle en oxygène) et l'élévation de la pression interstitielle sont le reflet de la mauvaise qualité de la vascularisation tumorale. De nombreuses études cliniques et précliniques mettent en avant ces deux paramètres dans la résistance des tumeurs aux traitements anticancéreux. Jouer sur ces deux paramètres peut être un moyen d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses.

#### A. Hypoxie tumorale.

##### 1. Hypoxie et résistance des tumeurs aux traitements.

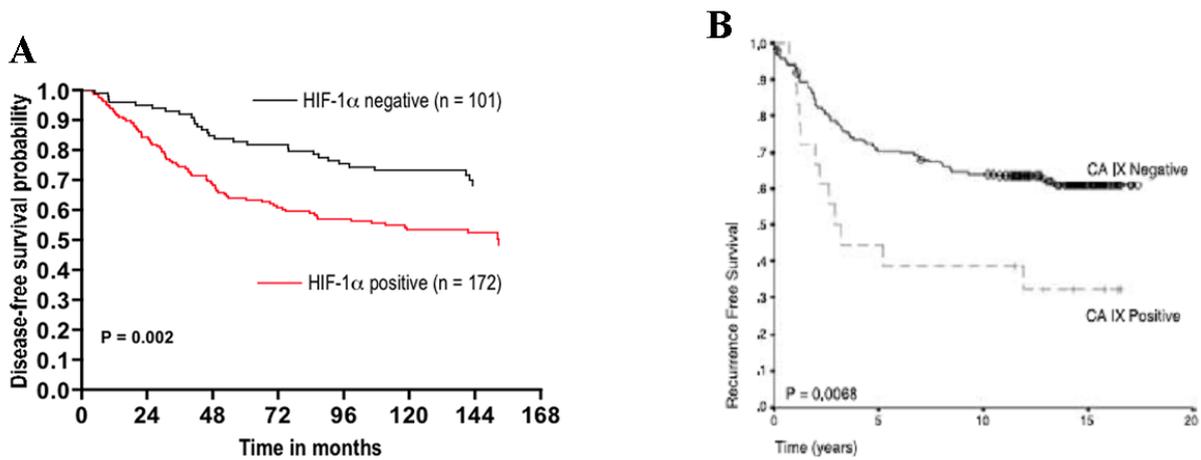
Contrairement à un tissu normal, la vascularisation tumorale est de mauvaise qualité et ne permet pas un approvisionnement en  $O_2$  suffisant au niveau des cellules tumorales. Les régions tumorales sont considérées comme hypoxiques lorsque les valeurs de pression partielle en  $O_2$  ( $PO_2$ ) sont proches ou inférieures à 10 mm Hg (Harrison and Blackwell 2004). Ces zones hypoxiques ont été retrouvées dans un grand nombre de tumeurs humaines dont : les tumeurs du sein, du col de l'utérus, des poumons, des voies aérodigestives supérieures, de la prostate, du rectum, du pancréas, du cerveau, ainsi que dans les mélanomes (Tableau IV) (Brown and Wilson 2004) (Vaupel et al. 1989). Par exemple, les tumeurs du sein présentent une  $PO_2$  cinq fois plus faible (10 mmHg) que les tissus mammaires normaux où la  $PO_2$  est de 50 mmHg.

<b>Localisation des tumeurs</b>	<b>PO2 tumorale (mmHg)</b>	<b>PO2 tissu sain (mmHg)</b>
<b>Cerveau</b>	4,9 - 5,6	24
<b>Voies aérodigestives supérieures</b>	12,2 - 14,7	40 - 51,2
<b>Poumons</b>	7,5	38,5
<b>Sein</b>	10,0	50,0
<b>Pancréas</b>	2,7	51,6
<b>Col de l'utérus</b>	3 - 5	36 - 51
<b>Prostate</b>	2,4	30,0

**Tableau IV : Valeurs de pression partielle en oxygène (PO<sub>2</sub>) dans plusieurs types de cancers en comparaison avec les tissus normaux.**

(D'après (Brown and Wilson 2004) (Vaupel et al. 1989)). Comparaison de la PO<sub>2</sub> relevée dans plusieurs tumeurs humaines avec la PO<sub>2</sub> obtenue dans les tissus sains correspondants.

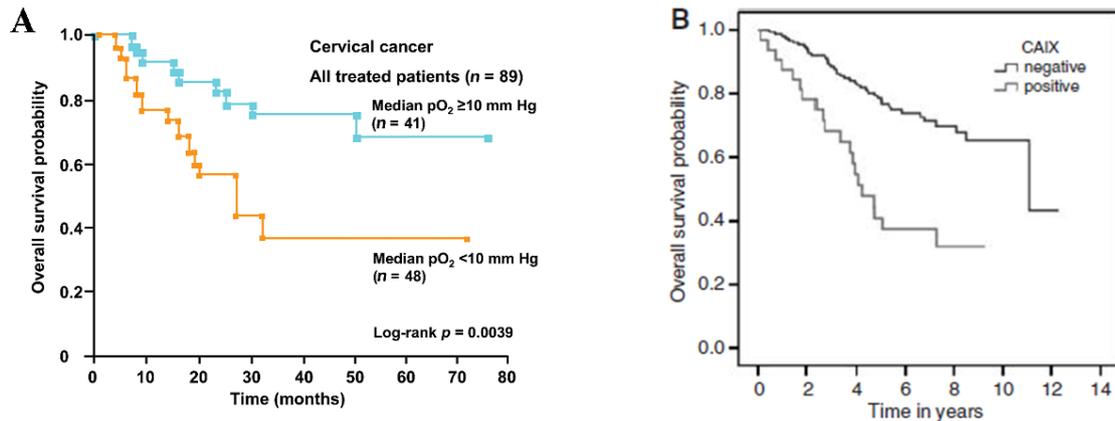
Actuellement, de nombreuses études cliniques ont associé l'hypoxie tumorale à un risque de rechute élevé. Ces associations ont été mises en évidence par une évaluation du niveau d'expression de HIF-1  $\alpha$  et / ou de la carbonique anhydrase IX, deux marqueurs de l'hypoxie. Par exemple, deux études menées séparément sur 273 (Tan et al. 2007) et 199 (Generali et al. 2006) femmes atteintes d'un cancer du sein ont montré que les femmes dont la tumeur était hypoxique présentaient un risque de rechute plus élevé. En effet, les femmes dont les tumeurs sont HIF-1  $\alpha$  positives (figure 14A) ou carbonique anhydrase IX positive (Figure 14B) ont un taux de survie sans rechute diminué. De plus, dans la deuxième étude, il a été montré que seulement 66% des femmes ont répondu favorablement aux traitements (épirubicine  $\pm$  tamoxifène) lorsque leur tumeur était hypoxique avant traitement (tumeur HIF-1  $\alpha$  positive) contre 85 % pour les patientes dont la tumeur n'exprimait pas HIF-1  $\alpha$ .



**Figure 14 : L'hypoxie tumorale entraîne la rechute des patientes.**

**A.** (Tan et al. 2007). La courbe de Kaplan-Meier présentée ici montre les probabilités de survie sans rechute de patientes traitées pour un cancer du sein. Les 2 groupes ont été comparés en fonction de l'expression ou non de HIF-1 $\alpha$  des tumeurs avant le traitement. **B.** (Generali et al. 2006). La courbe de Kaplan-Meier montre les probabilités de survie sans rechute de 199 patientes traitées pour un cancer du sein en fonction de l'expression de la carbonique anhydrase IX (CAIX) avant le traitement (épirubicine  $\pm$  tamoxifène).

D'autres études cliniques ont montré que le taux de survie global après traitement des patients atteints d'un cancer était fortement diminué lorsque les tumeurs étaient hypoxiques (faible  $PO_2$  ou forte expression de la carbonique anhydrase IX). Dans une étude menée sur 89 patientes traitées pour un cancer du col de l'utérus, il a été montré que l'hypoxie était associée à une diminution du taux de survie global des patientes. En effet, parmi les patientes dont la tumeur présentait une  $PO_2 < 10$  mmHg, le taux de survie n'était que de 40 % 36 mois après le traitement. En revanche, il approchait les 80% lorsque la tumeur présentait une  $PO_2 \geq 10$  mmHg (figure 15A) (Vaupel 2008). Dans une autre étude menée sur 427 femmes traitées pour un cancer du sein, le taux de survie global est également diminué pour les patientes dont la tumeur exprimait la carbonique anhydrase IX. Quatre ans après le traitement des patientes, ce taux était de 50% pour les patientes dont la tumeur exprimait la carbonique anhydrase IX. En revanche, il était de 80 % pour les femmes dont la tumeur n'exprimait pas ce marqueur de l'hypoxie (Tan et al. 2009) (figure 15B).



**Figure 15 : L'hypoxie des tumeurs diminue la survie globale des patients.**

**A.** (D'après (Vaupel 2008)). La courbe de Kaplan-Meier présentée ici montre les probabilités de survie de patientes traitées pour un cancer du col de l'utérus. Les 2 groupes ont été comparés en fonction des valeurs de la pression partielle en oxygène des tumeurs mesurée avant le traitement. Les patientes dont la tumeur est hypoxique ( $PO_2 < 10$  mmHg) ont un taux de survie diminué par rapport aux patientes dont la  $PO_2 \geq 10$  mmHg. **B.** (D'après (Tan et al. 2009)). La courbe de Kaplan-Meier montre les probabilités de survie de patientes traitées pour un cancer du sein en fonction de l'expression de la carbonique anhydrase IX (CAIX). Les patientes dont la tumeur est hypoxique (tumeur CAIX positive) ont un taux de survie diminué par rapport aux patientes dont la tumeur n'exprime pas la CAIX.

Ces études cliniques sous-entendent que l'hypoxie tumorale, facteur impliqué dans le risque de rechute et dans le pronostic vital, induit une résistance des tumeurs aux traitements. Il a été montré *in vitro* que l'hypoxie diminuait l'efficacité de plusieurs agents chimiothérapeutiques tels que le paclitaxel (Flamant et al. 2010), la vincristine (Hussein et al. 2006) ou encore l'étoposide (Erlor et al. 2004) envers différents types de cellules cancéreuses (mammaires, glioblastomes, de colon).

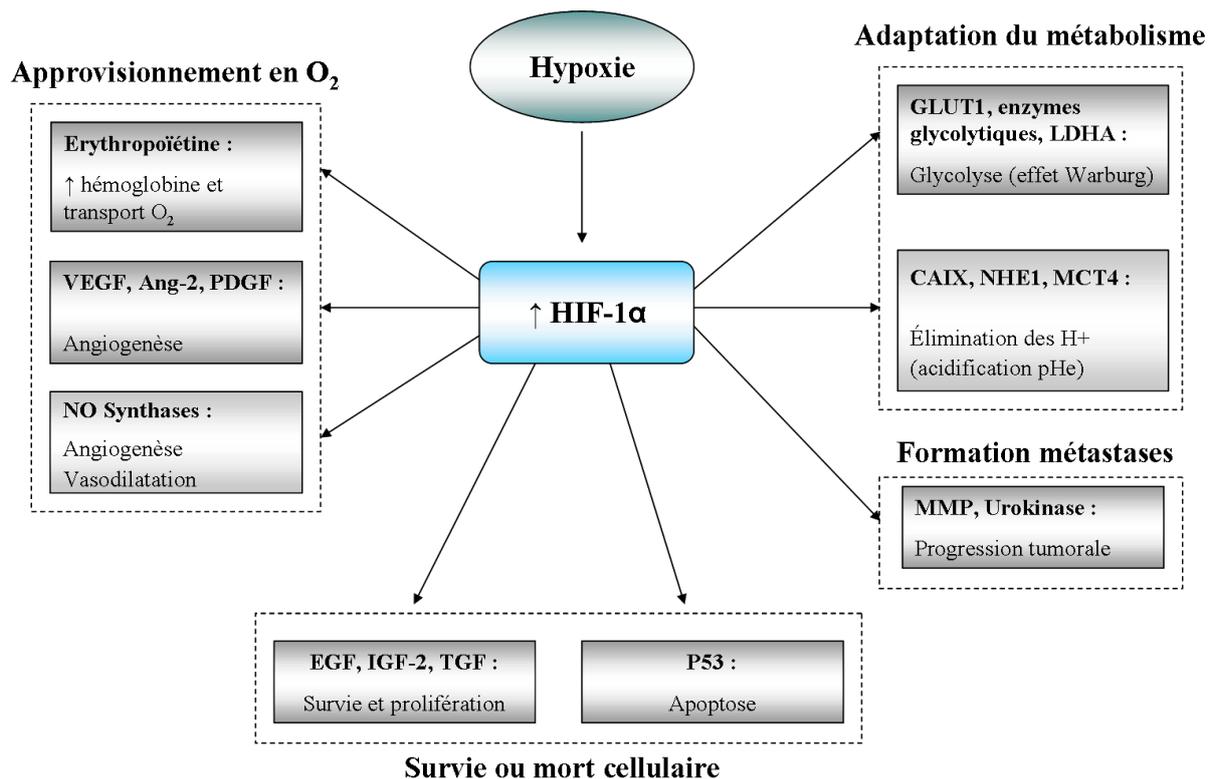
Quels sont les mécanismes induits par l'hypoxie qui peuvent expliquer cette résistance ?

## 2. Mécanismes induits par l'hypoxie impliqués dans la résistance des tumeurs

L'hypoxie induit la résistance des tumeurs de manière directe : l'absence d'oxygène diminue l'activité de certains agents anticancéreux et de manière indirecte : on assiste à la mise en place de mécanismes d'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie.

**Effets directs.** L'efficacité de la radiothérapie et de certains agents chimiothérapeutiques (cyclophosphamides, anthracyclines), est dépendante de l'oxygène. En effet, leur mécanisme d'action implique la formation de radicaux libres à fort pouvoir oxydant. En condition d'hypoxie, la formation de ces radicaux libres ainsi que les lésions à l'ADN qu'ils induisent sont diminuées. De ce fait, une diminution de l'efficacité de ces thérapies est observée (Hockel and Vaupel 2001).

**Effets indirects :** L'hypoxie induit l'activation de HIF-1 $\alpha$ , facteur qui régule positivement l'expression de nombreux gènes (Dachs and Tozer 2000). La majorité de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la survie ou la mort cellulaire, la modification du métabolisme cellulaire, l'augmentation du transport de l'oxygène ou encore l'angiogenèse (Vaupel and Harrison 2004). Ces réponses à l'hypoxie, présentées dans la figure ci-dessous, participent à la survie des cellules tumorales, à la progression de la tumeur ainsi qu'à la résistance des tumeurs aux traitements anticancéreux (figure 16).



**Figure 16 : Principales réponses des cellules tumorales induites par HIF-1 $\alpha$  en condition d'hypoxie.**

(Vaupel and Harrison 2004). L'hypoxie entraîne la stabilisation du facteur HIF-1 $\alpha$ . Ce facteur induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse des cellules tumorales à l'hypoxie. Ces réponses sont une augmentation de l'approvisionnement en oxygène (synthèse d'érythropoïétine et de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou les NO synthases), une induction de la survie (EGF, IGF-2, TGF) ou de la mort (P53) cellulaires, une adaptation du métabolisme tourné vers la glycolyse (GLUT1, enzymes glycolytiques, LDHA) avec une acidification du pH extracellulaire (CAIX, NHE1, MCT4) ou encore la formation de métastases (MMP, Urokinase). Abréviations : HIF (Hypoxia inducible factor), O<sub>2</sub> (oxygène), VEGF (vascular endothelium growth factor), Ang-2 (angiopoïétine-2), PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), EGF (Epidermal growth factor), IGF-2 (Insulin-like growth factor), TGF (transforming growth factor), GLUT-1 (transporteur du glucose 1), LDHA (lactate déshydrogénase A), CAIX(carbonique anhydrase IX), NHE1 (échangeur sodium/proton), MMP (métalloprotéases).

#### *a. Augmentation de l'approvisionnement en oxygène*

HIF-1 permet la transcription de nombreux facteurs tels que l'érythropoïétine, et des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF-B, NOS inductible et endothéliale, ANG-2) (Heinzman et al. 2008). Ces facteurs permettent l'augmentation du transport de l'oxygène (synthèse d'hémoglobine) ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux (voir chapitre vascularisation tumorale) afin d'alimenter les cellules tumorales en O<sub>2</sub>. Cependant, l'apport en O<sub>2</sub> reste inadéquat du fait de la mauvaise qualité des néo-vaisseaux tumoraux (Hockel and Vaupel 2001).

## b. *Survie ou mort cellulaire*

**Survie et prolifération** : Plusieurs gènes cibles de HIF-1 sont des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération. Il s'agit, entre autres, de l'IGF-2 (Insulin-like growth factor), de l'EGF et du TGF $\alpha$ . En se fixant à leur récepteur, ils activent les voies de signalisation **PI3K/AKT** et **ERK 1/2 (MAPK)**. La voie **ERK 1/2 (MAPK)** envoie ses signaux vers le noyau où ses principaux substrats sont des facteurs de transcriptions qui permettent la synthèse de facteurs impliqués dans la prolifération (dont la cycline D, impliquée dans le passage des cellules en phase S du cycle cellulaire). La voie **PI3K/AKT** est considérée comme une voie majeure de survie cellulaire puisqu'elle inhibe les activités pro-apoptotique de la protéine Bad et de la caspase-9 (Vara et al. 2004). Enfin, HIF-1 augmente l'expression de BNIP3 (membre de la famille de Bcl2) qui aboutit à l'autophagie des mitochondries, inhibant ainsi les voies apoptotiques (permettant la survie de la cellule en condition de stress) (Bellot et al. 2009).

L'hypoxie permet également la survie et la prolifération des cellules de façon **indépendante de HIF-1** puisqu'elle active d'autres facteurs de transcriptions comme **NF- $\kappa$ B** (Lee et al. 2007). Ce facteur est connu pour réguler un grand nombre de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaires tels que des gènes codant pour : des cytokines (Interleukines, TNF- $\alpha$ ), des protéines anti-apoptotiques et certaines cyclines (*i.e.* cycline D). NF- $\kappa$ B permet également l'activation du gène MDR-1 (multidrug resistant-1) impliqué dans la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie (Lee et al. 2007).

L'hypoxie est connue pour induire l'apoptose des cellules en diminuant l'expression de Bcl-2 ou en activant le gène de la P53. Cependant, un grand nombre de cellules tumorales possèdent un gène de la P53 muté. L'hypoxie entraîne alors la sélection de ces cellules tumorales, promouvant ainsi leur survie et leur prolifération (Semenza 2000). Cette **résistance à l'apoptose** est un des mécanismes pouvant expliquer la **diminution de l'efficacité de certains agents chimiothérapeutiques** tels que les agents alkylants (cisplatine) ou encore les anthracyclines (doxorubicine) qui agissent en induisant la mort des cellules tumorales par cytotoxicité (Anthoney et al. 1996).

Enfin, une hypoxie sévère induit un **arrêt du cycle cellulaire** (arrêt des cellules en phase G1/S) (Vaupel and Harrison 2004) Les cellules tumorales stoppent leur prolifération et la tumeur devient **réfractaire à la chimiothérapie** puisque la majorité des molécules

chimiothérapeutiques exercent leur action cytotoxique sur des cellules en prolifération (en phase S ou M).

*c. Induction de la formation de métastases.*

Via les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules tumorales ont l'opportunité d'échapper à l'environnement hostile de la tumeur primaire et d'aller coloniser les tissus sains. Il a été montré *in vitro* qu'un faible % d'O<sub>2</sub> augmentait l'invasion des cellules tumorales (Subarsky and Hill 2008). En effet, l'hypoxie diminue l'expression de molécules d'adhésions (telles que la protéine de jonction cellulaire : E-Cadhérine), permettant aux cellules tumorales de se détacher les unes des autres (Brahimi-Horn et al. 2007). L'expression de métalloprotéases (telles que MMP-2) et de sérine protéases telle que l'urokinase (clive le plasminogène en une enzyme responsable la lyse de la fibrine, la plasmine) sont augmentées par HIF-1 et permettent la dégradation de la matrice extracellulaire, mécanisme nécessaire à l'invasion tissulaire des cellules tumorales (Erler et al. 2006) (Sullivan and Graham 2007) (Vaupel 2004b).

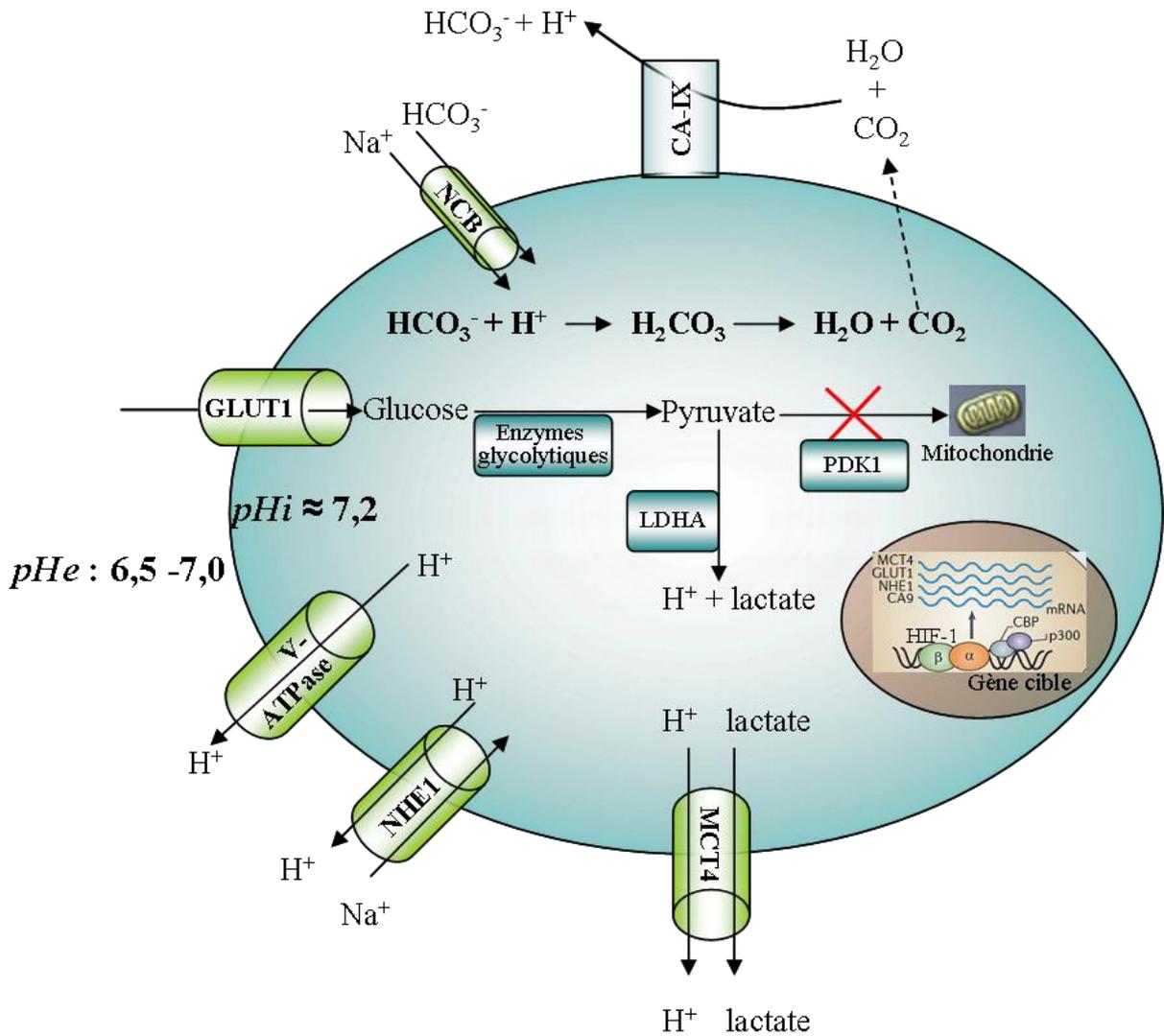
*d. Adaptation du métabolisme : effet de Warburg*

A l'inverse des cellules normales, le métabolisme des cellules tumorales est tourné vers la glycolyse (effet Warburg) avec une synthèse importante de lactate. En condition de normoxie, les cellules génèrent de l'ATP via la phosphorylation oxydative (formation d'ATP par oxydation complète du glucose via le cycle de Krebs au niveau des mitochondries). L'environnement tumoral est caractérisé par un apport limité en O<sub>2</sub> et une forte consommation de glucose. La génération d'énergie par la glycolyse anaérobie devient la voie prédominante de synthèse d'ATP (Vaupel 2004b). La quantité d'ATP formée au cours de la glycolyse (2 ATP par molécule de glucose) est beaucoup moins importante en comparaison avec la phosphorylation oxydative (38 ATP par molécules de glucose) (Semenza 2008). Cette reprogrammation du métabolisme énergétique est régulée par l'hypoxie puisque HIF-1 induit l'expression de plusieurs protéines directement liées à la glycolyse (Semenza 2000) (Clottes 2005) : les **transporteurs de glucose** (dont GLUT1, qui facilite le transport du glucose dans les cellules), les **enzymes glycolytiques** (telles que l'aldolase-A et la phosphoglycérate kinase-1, qui permettent la conversion du glucose en pyruvate), les **hexokinases** (augmentent la capacité des cellules à cataboliser le glucose), la **lactate déshydrogénase-A** (LDHA,

convertit le pyruvate en lactate) et la **pyruvate déshydrogénase kinase-1** (PDK1, inactive les enzymes responsables de la conversion du pyruvate en acetyl-CoA se déroulant au niveau des mitochondries lors du cycle de Krebs).

L'activité métabolique particulière des cellules tumorales affecte le pH des tumeurs. Après la glycolyse, la conversion du pyruvate par la lactate déshydrogénase-A aboutit à la formation de lactate et de protons  $H^+$  (figure 17). Théoriquement, l'accumulation de protons  $H^+$  devrait diminuer le pH intracellulaire. Or, on assiste à une diminution du pH extracellulaire ( $6,5 < pH < 7,0$ ) alors que le pH intracellulaire reste aux alentours de 7,2. Ceci met en évidence des mécanismes de régulation du pH intracellulaire par les cellules tumorales. Cette régulation (figure 17) résulte de l'exclusion des protons  $H^+$  hors de la cellule par des pompes ATPase à  $H^+$ , par l'échangeur sodium/protons NHE1 et par le cotransporteur MCT-4 (sortie de  $H^+$  et du lactate) (Brahimi-Horn et al. 2007). L'expression de la carbonique anhydrase IX (isoforme transmembranaire de l'enzyme anhydrase carbonique) et son activation sont également impliquées dans l'acidification du pH extracellulaire. Dans la cellule, l'acide carbonique (formé à partir de  $H^+$  et  $HCO_3^-$ ) aboutit à la formation de  $CO_2$  et  $H_2O$ . Le  $CO_2$  diffuse librement au travers de la membrane cellulaire. Il va ensuite être réhydraté grâce à la carbonique anhydrase IX résultant en l'acidification du pH extracellulaire par la formation d' $H^+$  et de  $HCO_3^-$ . Ce dernier peut-être réintégré dans la cellule par l'intermédiaire du cotransporteur  $Na^+/HCO_3^-$  (NCB). Ce recyclage contribue à l'élimination des  $H^+$  présents dans la cellule (Swietach et al. 2007).

Cette régulation du pH est une stratégie pour la survie cellulaire puisque un pH intracellulaire acide aboutit à l'apoptose des cellules (Parks et al. 1999). Elle permet également l'invasion des cellules tumorales. En effet, les protéases responsables de la digestion de la matrice extracellulaire sont activées par une acidification du pH extracellulaire (Harris 2002). **L'acidose extracellulaire** joue aussi un rôle dans la **résistance** « multidrogue » **des tumeurs** via une augmentation de l'activité de la glycoprotéine-P (P-gp) au niveau des cellules cancéreuses *in vitro* (Thews et al. 2006) (Lotz et al. 2007) et *in vivo* (Thews et al. 2011) (Sauvant et al. 2008).



**Figure 17 : Régulation du pH dans la cellule tumorale hypoxique.**

En condition d'hypoxie, l'induction de protéines (GLUT1) et d'enzymes glycolytiques (LDHA) par HIF-1 modifie le métabolisme des cellules cancéreuses au profit de la glycolyse (effet de Warburg). La glycolyse transforme le glucose en pyruvate (enzymes glycolytiques). Le pyruvate est ensuite converti en lactate et en  $H^+$  par la LDHA (lactate déshydrogénase-A) en grande quantité. Les  $H^+$  doivent être acheminés hors de la cellule cancéreuse afin que son pH intracellulaire reste stable ( $pH_i \approx 7,2$ ). Cette régulation, résultant en l'acidification du pH extracellulaire ( $pH_e : 6,5 - 7,0$ ), peut se faire grâce à l'activation de NHE1, MCT-4 et de la CA-IX (rôle CAIX : réhydratation de  $CO_2$ , qui libère les protons  $H^+$  dans le milieu extracellulaire).

## B. Pression interstitielle tumorale.

### 1. Elévation de la pression interstitielle (PI) dans les tumeurs.

La majorité des tumeurs animales et humaines présentent une pression interstitielle élevée (Gullino et al. 1964; Less et al. 1992). Le tableau V présente les valeurs de pression interstitielle obtenues dans différentes tumeurs humaines. A l'inverse des tissus sains, où la pression interstitielle est aux alentours de 0 mm Hg (0,4 et 0 mm Hg pour la peau et le sein respectivement), la pression interstitielle moyenne de différentes tumeurs varient entre 4,5 mm Hg (lymphomes), 24 mm Hg (carcinome mammaire) et 38 mm Hg (carcinome de rein). Cependant, les valeurs de pression interstitielle de chaque type de tumeurs sont très hétérogènes entre les patients. Par exemple, pour le cancer du sein les valeurs vont de 4 à 53 mm Hg (Jain et al. 2007).

<b>Pression interstitielle (mmHg) des tumeurs humaines</b>			
<b>Localisation</b>	<b>n</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Fourchette</b>
<b>Peau (normale)</b>	5	0.4	−1.0 to 3.0
<b>Sein (normal)</b>	8	0.0	−0.5 to 3.0
<b>Voies aéro-digestives supérieures</b>	27	19.0	1.5 to 79.0
<b>Col de l'utérus (carcinomes)</b>	127	20.5	−2.8 to 94.0
<b>Poumons (carcinomes)</b>	26	9.5	1.0 to 27.0
<b>Mélanomes (métastases)</b>	26	18.0	0.0 to 60.0
<b>Sein (carcinomes)</b>	21	23.7	4.0 to 53.0
<b>Cerveau</b>	28	4.6	−0.5 to 15.0
<b>Rectum (carcinomes)</b>	8	15.3	12.1 to 15.8
<b>Foie (métastases)</b>	8	21.0	6.0 to 45.0
<b>Lymphomes</b>	7	4.5	1.0 to 12.5
<b>Rein (carcinome)</b>	1	38.0	—

**Tableau V : Pression interstitielle (mm Hg) mesurée au niveau de tissus sains et de plusieurs types de tumeurs humaines.**

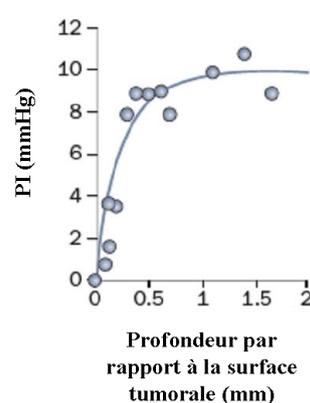
D'après (Jain et al. 2007).

Les facteurs qui influencent la pression interstitielle sont complexes et les causes de son élévation sont multifactorielles. L'absence de vaisseaux lymphatiques, la perméabilité accrue des vaisseaux sanguins et le stroma tumoral apparaissent comme trois facteurs du microenvironnement majoritairement responsables de l'augmentation de la pression

interstitielle (voir chapitre « vascularisation tumorale »). Il existe probablement de grande variabilité entre individu pour chacun de ces paramètres, ce qui contribue à l'hétérogénéité des valeurs de la pression interstitielle chez l'humain (Tableau V) et dans les modèles animaux. Par exemple, une étude menée *in vivo* chez la souris a montré que des tumeurs formées à partir de la même lignée de cellules mais implantées différemment (xénogreffe ou orthotopique) sur des sites différents présentaient des valeurs de PI différentes (Lunt et al. 2008). Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude où il est apparu que la pression interstitielle de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris était plus faible que celle mesurée dans les modèles syngéniques chez le rat. Les auteurs de cette étude ont supposé que cette différence était due à un réseau vasculaire différent avec une perméabilité vasculaire et un volume sanguin tumoraux plus élevés dans les tumeurs syngéniques. (Ferretti et al. 2009)

Ces deux études montrent l'importance du microenvironnement sur l'élévation de la pression interstitielle tumorale.

Malgré ces différences inter-tumeurs, les valeurs de pression interstitielle apparaissent homogènes au sein d'une même tumeur excepté à sa périphérie. La figure 18 montre le profil de la pression interstitielle en fonction de la distance (mm) par rapport à la surface tumorale. A partir de 0,5 mm de profondeur jusqu'à la surface, la pression interstitielle diminue très rapidement pour atteindre des valeurs proches de la normale (entre 0 et 4 mm Hg) (Jain and Stylianopoulos 2010).

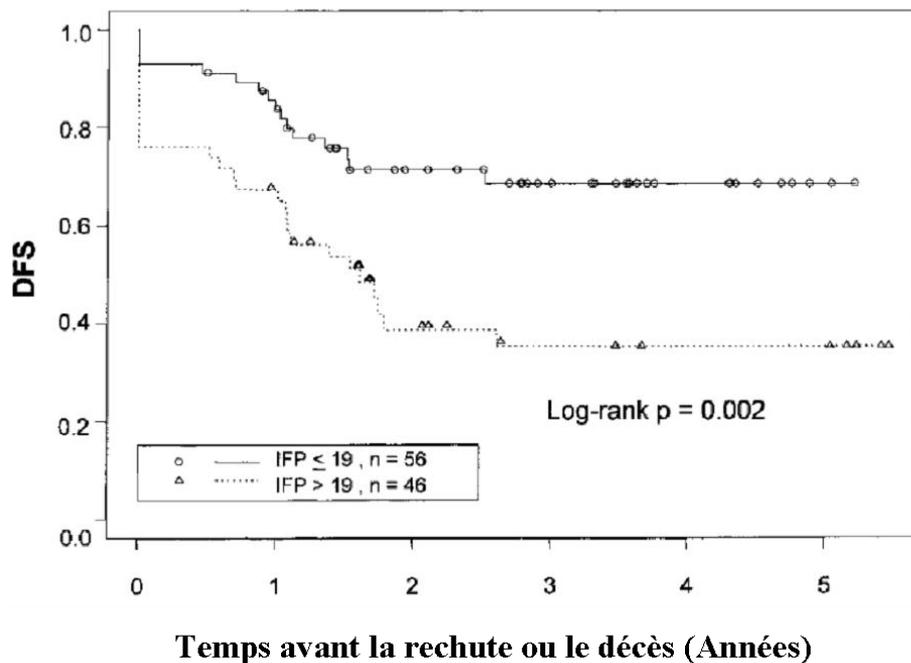


**Figure 18 : Evolution de la pression interstitielle en fonction de la profondeur par rapport à la surface.** D'après (Jain and Stylianopoulos 2010). La pression interstitielle (PI) est homogène dans la tumeur sauf au niveau de sa périphérie (de la surface à 0,5 mm de profondeur) où l'on assiste à une rapide diminution de la PI.

## 2. Conséquences d'une pression interstitielle tumorale élevée.

L'élévation de la pression interstitielle dans différents types de tumeurs a été associée à la résistance des tumeurs aux traitements. Deux études ont suivi l'évolution de la pression interstitielle tumorale de patients traités pour un cancer du col de l'utérus (par radiothérapie) (Roh et al. 1991) ou pour un mélanome (par immunothérapie) (Curti et al. 1993). Dans ces 2 études, lorsque les tumeurs n'ont pas répondu au traitement, une élévation de la pression interstitielle (entre 8 et 30 mm Hg) après traitement a été observée. Par ailleurs, la régression des tumeurs des patientes de l'étude de Roh *et al.* est associée à une forte diminution de la pression interstitielle (d'environ 13 mm Hg) (Roh et al. 1991). Dans l'étude menée par Curti *et al.* il a été observé que la pression interstitielle moyenne avant radiothérapie des patients non répondeurs était légèrement plus élevée que celle des patients répondeurs (24,4 mm Hg versus 12,2mmHg).

Cette tendance a été confirmée chez des patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus (Milosevic et al. 2001). Dans cette étude, les auteurs ont d'abord mis en évidence que les valeurs basales de la pression interstitielle (mesurées au diagnostic) n'étaient pas dépendantes de la taille des tumeurs au moment du diagnostic puisqu'aucune corrélation n'a été trouvée entre ces deux paramètres. En revanche, ils ont montré que ces **valeurs de pression interstitielle** basales étaient **prédictives de la réponse des tumeurs** à la radiothérapie. En effet comme le montre la figure 19, 68 % des femmes ont fait une rechute ou sont décédées lorsque la pression interstitielle tumorale basale était supérieure à 19 mm Hg. Ce pourcentage est nettement plus faible (34%) chez les femmes dont la pression interstitielle tumorale basale était inférieure à 19 mm Hg. De plus, cette étude a mis en évidence qu'une pression interstitielle basale élevée augmentait significativement le risque de rechute sous forme de métastases. En effet, 3 ans après la radiothérapie, des métastases ganglionnaires ont été détectées chez 47 % des femmes dont la tumeur présentait une pression interstitielle supérieure à 19 mm Hg contre seulement 13% pour les autres femmes (Milosevic et al. 2001).



**Figure 19 : Survie des patientes traitées pour un cancer du col de l’utérus en fonction des valeurs de pression interstitielle.**

D’après (Milosevic et al. 2001). Les patientes traitées par radiothérapie ont été séparées en deux groupes en fonction des valeurs de PI mesurées avant le début du traitement. DFS = disease free survival exprimé en fonction du temps observé avant la rechute ou le décès des patientes.

Une mauvaise oxygénation tumorale et une pression interstitielle élevée ont été associées de manière individuelle à la résistance des tumeurs aux traitements (risque de rechute élevé, diminution de la survie globale). La question est de savoir si la pression interstitielle tumorale est toujours associée à l’oxygénation de la tumeur. Lors d’une étude clinique menée chez des femmes ayant un cancer du sein, l’administration de paclitaxel entraîne une diminution de la pression interstitielle et une augmentation de l’oxygénation de la tumeur. Cependant aucune corrélation n’a été observée entre l’évolution de ces deux paramètres (Taghian et al. 2005). Cette absence de corrélation a également été observée dans deux modèles de tumeurs (mammaires et du col de l’utérus) chez le rongeur (Lunt et al. 2008). Milosevic *et al.* ont également mesuré la pression partielle en oxygène et déterminé le niveau d’expression de la carbonique anhydrase IX simultanément à la mesure de la pression interstitielle. Aucune corrélation n’a été trouvée entre la pression interstitielle et la  $PO_2$  ou le niveau d’expression de la carbonique anhydrase IX. De plus, lors d’une analyse à plusieurs variables qui détermine le risque de rechute ou de décès en fonction de la pression interstitielle et de la  $PO_2$ , il semblerait que la pression interstitielle soit un facteur pronostic indépendant de l’oxygénation de la tumeur (Milosevic et al. 2004).

D'après ces études, il semble que la pression interstitielle soit un meilleur indicateur de la réponse tumorale. Ainsi, la pression interstitielle peut apporter une information clinique et biologique essentielle sur la survie des patients et la réponse des tumeurs aux traitements.

### **La pression interstitielle tumorale : une barrière à la distribution de l'agent anticancéreux.**

La résistance des tumeurs aux traitements anticancéreux peut être attribuée au fait que la pression interstitielle élevée agit comme une véritable barrière à la distribution des agents chimiothérapeutiques (Heldin et al. 2004). C'est à la fin des 80 que l'équipe de Jain *et al.* a montré que la pression interstitielle tumorale élevée provoquait une mauvaise distribution des anticorps monoclonaux et d'autres macromolécules au sein de la tumeur (Jain and Baxter 1988). Une forte pression interstitielle s'oppose donc à la distribution de macromolécules qui sont généralement transportées par convection. Cependant, elle s'oppose aussi au transport des molécules de petit poids moléculaire transportées par diffusion. Ce rôle de la pression interstitielle dans le transport des molécules au sein de la tumeur a été mis en évidence *in vivo* dans différents modèles de tumeurs. La diminution de la pression interstitielle par l'utilisation de la collagénase (détruisant le réseau de fibres de collagène du stroma) augmente de deux fois le captage d'un anticorps monoclonal (Eikenes et al. 2004) et de 50 % celui du 5-fluorouracil (5-FU) (Gade et al. 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles de tumeurs colorectales et de la thyroïde chez la souris. Dans ces deux études, l'utilisation d'inhibiteurs du VEGF ou du récepteur au PDGF aboutissent respectivement à l'augmentation de la distribution des anticancéreux CPT-11 (suivi par fluorescence) (Wildiers et al. 2003) et du taxol de plus de 4 fois (suivi par radioactivité du [<sup>3</sup>H]-Taxol) (Pietras et al. 2002). La diminution de la pression interstitielle restaure les gradients de pression autour des vaisseaux expliquant la meilleure distribution des molécules au sein de la tumeur (Jain and Stylianopoulos 2010; Tong et al. 2004).

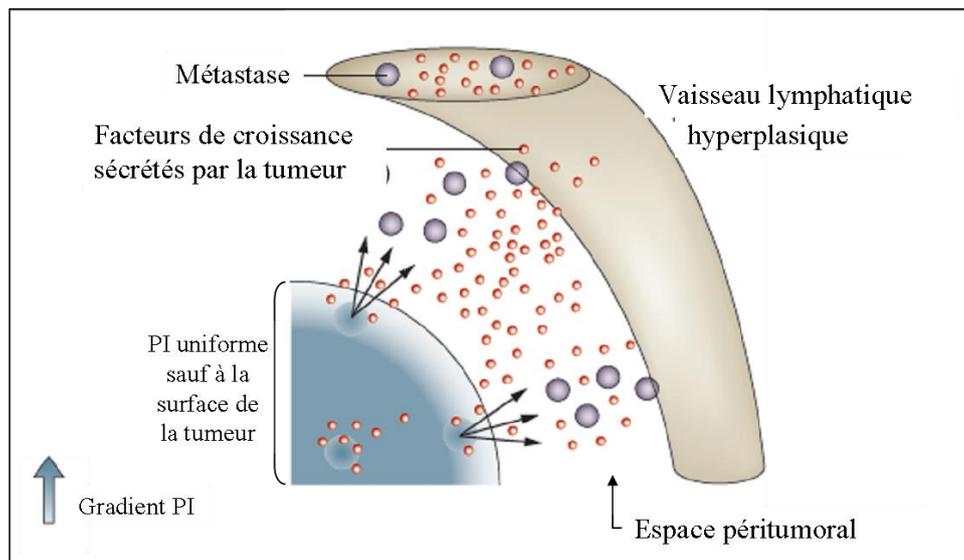
### **La diminution de la pression interstitielle est un marqueur précoce de la réponse des tumeurs à la chimiothérapie.**

Une étude récente a montré que la pression interstitielle de différents modèles tumoraux (xénogreffes ou modèles syngéniques) était diminuée par plusieurs molécules telles que Patupilone, Vatanalib et Gemcitabine (Ferretti et al. 2009). Cette diminution de la pression interstitielle a été corrélée à la régression tumorale en réponse au Patupilone ou au Vatanalib. Ces résultats indiquent que la diminution de la pression interstitielle est un **marqueur précoce** de la réponse tumorale. De plus, après la chimiothérapie, la diminution de la pression interstitielle est corrélée à la diminution du volume sanguin tumoral, mettant en évidence la relation entre la modulation de la vascularisation tumorale et les changements de la pression interstitielle (Ferretti et al. 2009).

### **Augmentation du potentiel métastatique des tumeurs.**

Les données concernant l'existence d'une corrélation entre la pression interstitielle élevée et la formation de métastases sont controversées. Une étude *in vivo* a montré qu'une pression interstitielle tumorale élevée était associée au développement de métastases ganglionnaires et pulmonaires dans un modèle de mélanomes humains xénogreffés chez la souris (Rofstad et al. 2002). Cette étude s'oppose à plusieurs autres études *in vivo* où aucune corrélation n'a été observée entre ces deux paramètres (Lunt et al. 2008) (Padera et al. 2002) (Jain et al. 2007). Dans l'étude de Milosevic *et al.*, au moment du diagnostic, aucune corrélation n'a été trouvée entre la pression interstitielle basale et le statut métastatique des patientes. Cependant, dans cette même étude les patientes présentent un risque plus important de rechute sous forme de métastases ganglionnaires lorsque la pression interstitielle basale de leur tumeur est élevée (Milosevic et al. 2001). Ces données contradictoires indiquent qu'un rôle de la pression interstitielle dans la formation de métastase n'est pas exclu, mais il reste à être éclairci. Jain et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que le gradient de pression entre la surface et le centre de la tumeur participerait à la dissémination des cellules tumorales métastatiques. La figure 20 schématise cette hypothèse. Ce gradient de pression interstitielle entraînerait la sortie dans l'espace péri-tumoral de fluides tumoraux contenant des facteurs de croissance et des cellules tumorales (Jain and Stylianopoulos 2010). Ces fluides sont drainés par des vaisseaux lymphatiques hyperplasiques présents à la périphérie de la tumeur, facilitant

l'envahissement ganglionnaire et par conséquent, la formation de métastases au niveau des tissus sains (Dadiani et al. 2006).



**Figure 20 : Schéma hypothétique de l'implication de la pression interstitielle élevée dans la formation de métastases.**

D'après (Jain and Stylianopoulos 2010). Le gradient de pression interstitielle provoqué par la rapide diminution de la PI à la surface tumorale entraîne la sortie de fluides, contenant facteurs de croissance et cellules tumorales, qui seraient collectés par les vaisseaux lymphatiques périphériques à la tumeur, favorisant ainsi la dissémination des cellules métastastatiques.

### 3. Stratégies moléculaires pour diminuer la pression interstitielle

Le fait qu'une pression interstitielle tumorale élevée agisse comme une barrière à la distribution des agents anticancéreux au sein de la tumeur en fait une cible importante pour les stratégies visant à améliorer les traitements. Plusieurs types de molécules très différentes ciblant la vascularisation tumorale (*ex* : molécules anti-VEGF et anti-VEGFR), le stroma tumoral (*ex* : anti-PDGF, collagénase), les cellules tumorales (agents anticancéreux) ou encore la perméabilité vasculaire (dexaméthasone) sont capables de diminuer la pression interstitielle. Les principales études précliniques portant sur l'effet de ces molécules, leur mode d'action et leur conséquence sur la tumeur sont présentées dans le tableau VI. Ces molécules, telles que le bevacizumab (anticorps anti-VEGF) et l'imatinib (anticorps anti-VEGFR), ciblent la vascularisation et le stroma tumoral dans différents types de tumeurs (modèles de tumeurs mammaires, du colon, du poumon...) et ont pour conséquence majeure l'augmentation de l'efficacité des agents anticancéreux. Certains agents anticancéreux sont également capables d'induire une diminution de la pression interstitielle avant même

d'induire une régression tumorale (Ferretti et al. 2009). En clinique, le bevacizumab et le paclitaxel diminuent la pression interstitielle de tumeurs rectale et du sein de 75% et de 36% respectivement. Dans l'étude menée par Taghian *et al.* les patientes atteintes d'un cancer du sein ont été séparées en deux groupes et ont reçu une chimiothérapie néoadjuvante séquentielle. Le premier groupe a d'abord reçu de la doxorubicine puis du paclitaxel. Pour le deuxième groupe, le paclitaxel a été administré avant la doxorubicine. Administré en premier le paclitaxel induit une diminution significative de la pression interstitielle de 36%. La doxorubicine n'a aucun effet significatif sur ce paramètre. A la fin de la chimiothérapie néoadjuvante, la pression interstitielle est diminuée de 39% pour les patientes du deuxième groupe (paclitaxel puis doxorubicine) alors qu'elle ne diminue que de 8% pour les patientes du premier groupe (doxorubicine puis paclitaxel). Cette différence est indépendante de la taille de la tumeur puisque la diminution du volume tumoral observé après la chimiothérapie néoadjuvante n'est pas significativement différente entre les deux groupes de patientes (Taghian et al. 2005). Enfin, l'étude clinique de phase I de Willett GC *et al.* a montré que 12 jours après l'injection du bevacizumab, la pression interstitielle tumorale était diminuée de 75% chez des patients atteints d'un cancer du rectum. Cette diminution est en adéquation avec l'étude préclinique de Lee CG *et al.* (Lee et al. 2000) et est accompagnée d'une diminution de volume et de la densité vasculaires ainsi que d'une augmentation du recouvrement des vaisseaux par les péricytes avant le début de la chimiothérapie (Willett et al. 2004).

Molécules	Modèle animal tumeur	Mécanismes d'action probables	Conséquences	Références
<b>anti-VEGF (anticorps monoclonal A.4.6.1)</b>	Adénocarcinome de colon (LS174T) et glioblastomes (U87) humains implanté chez la souris	↓ perméabilité vasculaire. ↓ densité vasculaire	↓ de PI de 70% ↑ efficacité radiothérapie	Lee CG, 2000
	Adénocarcinome de colon (HT29) humains implanté chez la souris	↓ densité vasculaire	↓ la croissance tumorale, ↑ captage et activité de CPT-11 (HT29)	Wildiers H, 2003
<b>anti-VEGF (Bevacizumab)</b>	Neuroblastomes (NB-1691) humain implanté chez la souris	<b>Remodelage vasculaire :</b> ↓ perméabilité bleu d'Evans, ↓ densité vasculaire	↓ de PI de 50% ↑ 20 % du captage du topotecan et de son efficacité	Dickson PV, 2007
<b>anti-VEGFR2 (DC101)</b>	Carcinome mammaire (MCalV), carcinome pulmonaire (54A), glioblastomes (U87) et adénocarcinome de colon (LS174T) humains implanté chez la souris	<b>Remodelage vasculaire :</b> ↓ perméabilité à l'albumine, ↓ densité microvasculaire, ↑ recouvrement des vaisseaux par les péricytes	↓ de PI, Restauration des gradients de pression, ↑ distribution de la BSA	Tong RT, 2004
<b>Inhibiteur de PI3K/mTOR (NVP-BEZ235)</b>	Carcinome mammaire (BN472), modèle syngénique chez le rat	↓ phosphorylation d'AKT et eNOS ↓ perméabilité microvasculaire au bleu d'Evans (effet similaire à un blocage de VEGFR-1/2)	↓ PI (18%) 2 heures après traitement. (Effet max : -34 %) Regression tumorale ↓ perméabilité est prédictive de la régression tumorale	Schnell CR, 2008
<b>Anti-PDGFR (STI571/ Imatinib)</b>	Modèle syngénique de tumeurs colorectal (PROb) chez le rat ; Carcinome thyroïde humain (Kat-4) implanté chez la souris ; Adénocarcinome pulmonaire humain (A549) implanté chez la souris	↓ contraction du stroma ↓ expression VEGF ↓ densité microvasculaire	↓ de PI ↑ transport transvasculaire de molécules (EDTA, taxol, 5-FU, patupilone) ↑ efficacité : taxol, patupilone, 5-FU	Pietras K, 2001 Pietras K, 2002 Pietras K, 2003 Vlahovic G, 2006
<b>Anti- TGFβ</b>	Carcinome thyroïde humain (Kat-4) implanté chez la souris	↓ de la quantité de collagène stromal	↓ de PI (50%) Regréssion tumorale (30 jours après la 1ère injection)	Lammerts E, 2002
<b>PGE1</b>	Modèle syngénique de tumeurs colorectal (PROb) et carcinomes mammaires chimioinduits (DMBA) chez le rat	Diminution de l'adhésion des fibroblastes de la contraction du collagène (Wiering TV, 2009)	↓ PI (effet max 15 minutes post traitement), ↑ captage et efficacité du 5-FU	Salnikov AV, 2003
<b>Collagénase</b>	Tumeur colorectale (HT29) et Ostéosarcome (OHS) humains implantés chez la souris	destruction collagène du stroma diminution de la résistance vasculaire et de la MVP	↓ de PI (35 à 45 %) ↑ gradient pression transvasculaire ↑ captage de 5-FU et de l'anticorps TP3	Eikness L, 2004 Gade TPF, 2009
<b>Patupilone, Vatanalib et Gemcitabin</b>	Carcinome mammaire (BN472), modèle syngénique chez le rat	Diminution du volume sanguin tumoral	↓ PI 2 jours après traitement Regression tumorale 6 jours après traitement La ↓ de la PI est prédictive de la réponse tumorale	Ferretti S, 2005 et 2009
<b>Taxanes</b>	Carcinome mammaire (MCalV),	Décompression des vaisseaux tumoraux ↓ de la MVP	↓ PI (50% max)	Griffon-Etienne, 1999
<b>Dexaméthasone</b>	Adénocarcinome de colon (LS174T) implanté chez la souris	↓ perméabilité vasculaire.	↓ PI de 50% après 4 jours. Effet réversible	Kristjansen PE, 1993

**Tableau VI : Stratégies moléculaires pour diminuer la pression interstitielle tumorale.**

## C. Le microenvironnement tumoral : une cible thérapeutique pour améliorer les traitements anticancéreux ?

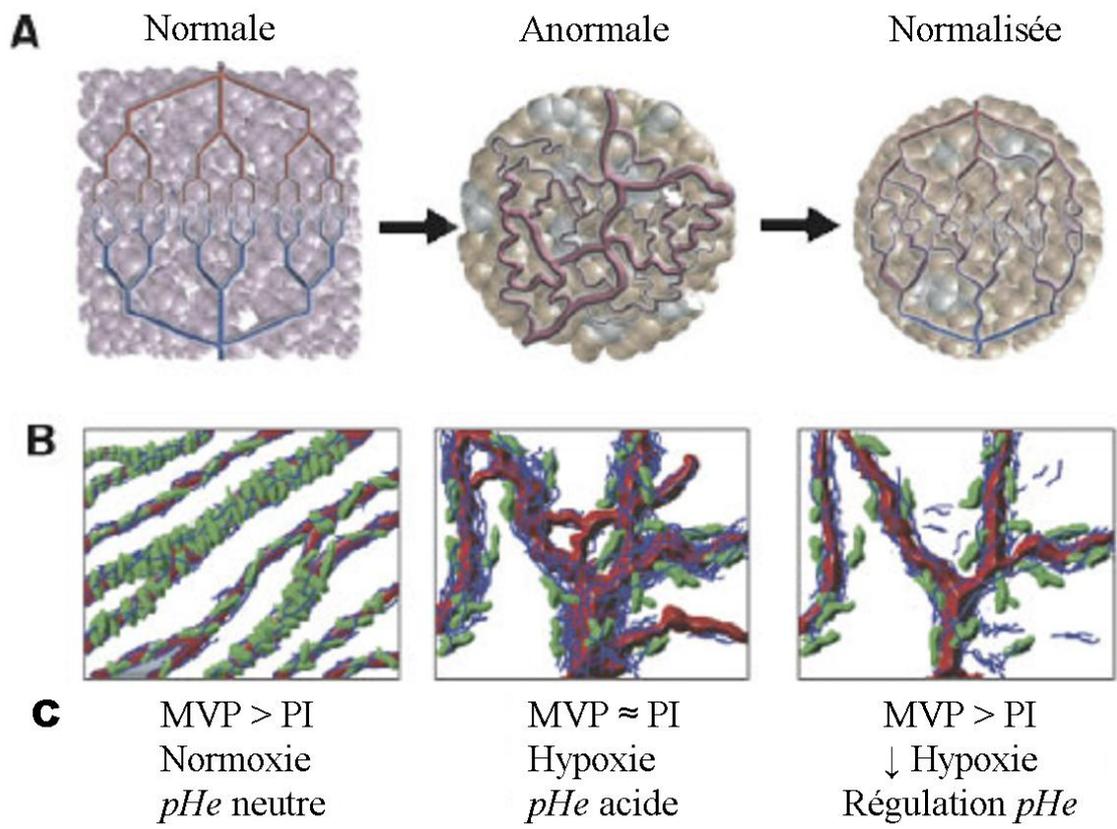
Le microenvironnement (vascularisation et stroma) d'une tumeur est anormal et contribue grandement au phénotype agressif et à la résistance de la tumeur aux traitements. Pour ces raisons, les stratégies visant à réguler ce microenvironnement sont en plein essor et permettraient d'améliorer la réponse des tumeurs aux traitements.

### 1. Stratégie de régulation de la vascularisation tumorale.

Pour croître, une tumeur a besoin d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui lui apporteront l'oxygène et les éléments nutritifs indispensables à son développement. De cette constatation, Judah Folkman a émis l'hypothèse que la destruction des vaisseaux entraînerait la régression de la tumeur (Folkman 1971). Cette idée a marqué le début de la recherche dans le développement des traitements anti-angiogéniques dont les premières molécules sont apparues dès le début des années 80 (Folkman 2007). L'hypothèse émise par Folkman a été confirmée lors d'une étude préclinique où le blocage du VEGF par anticorps spécifique (A4.6.1) diminuait significativement la densité vasculaire et la taille de tumeurs humaines (sarcomes des tissus mous et glioblastomes) xénogreffées chez la souris (Kim et al. 1993). Cependant, les effets des anti-VEGF en pré-traitement des tumeurs solides chez l'homme ont eu des résultats décevants et n'ont pas montré d'amélioration de la survie globale des patients (Goel et al. 2011).

En revanche, au cours d'une étude clinique de phase III, il a été montré que la combinaison d'un anti-VEGF (bevacizumab) avec une chimiothérapie de première ligne (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique augmente le taux de réponse des patients à la chimiothérapie (Hurwitz et al. 2004). Ceci est cependant paradoxal. La destruction des vaisseaux sanguins tumoraux par les anti-angiogéniques pourrait sérieusement compromettre la distribution de l'oxygène et des agents anticancéreux au sein de la tumeur, et de ce fait diminuer l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Les traitements anti-angiogéniques pourraient induire l'hypoxie, aggraver la progression des tumeurs et les rendre réfractaires aux traitements.

La compréhension de ce paradoxe date d'une dizaine d'années notamment grâce à l'hypothèse de la « normalisation » de la vascularisation. Ce concept, proposé par Jain *et al.* (Jain 2001; Jain 2005), se base sur les résultats d'études précliniques où l'association de thérapies anti-angiogéniques à la chimiothérapie ou à la radiothérapie améliore l'efficacité de ces traitements (Browder *et al.* 2000; Klement *et al.* 2000; Kozin *et al.* 2001). La figure 21 schématise ce concept de normalisation. Comme nous l'avons vu précédemment, les vaisseaux sanguins tumoraux sont différents des vaisseaux normaux ce qui aboutit à une élévation de la pression interstitielle, à l'hypoxie et à un pH extracellulaire acide. La normalisation de la vascularisation observée après les thérapies anti-VEGF consiste en la destruction des capillaires les plus immatures et une modification de l'architecture des vaisseaux restants (Figure 21A). Cela aboutit à une homogénéisation du flux sanguin dans les différentes régions de la tumeur. On assiste également à un remodelage de la structure des vaisseaux (figure 21B), c'est à dire une amélioration des connections des cellules endothéliales entre elles et un meilleur recouvrement des vaisseaux par les péricytes. Les vaisseaux sont moins perméables, ce qui résulte en une diminution de la pression interstitielle. Ces changements ont également pour conséquences une meilleure oxygénation de la tumeur et une diminution de l'acidose extracellulaire.

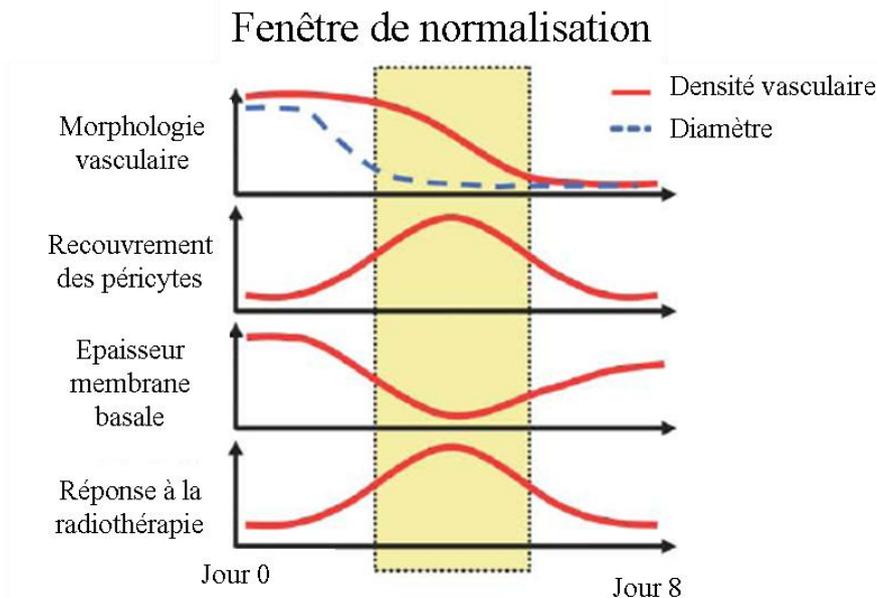


**Figure 21 : Normalisation de la vascularisation et du microenvironnement de la tumeur.** (D'après (Fukumura and Jain 2007)). **A.** Organisation du réseau vasculaire en situation physiologique et dans une tumeur. La vascularisation tumorale est anormale structurellement et fonctionnellement. Des stratégies anti-angiogénique sont capables de restaurer les fonctions et la structure des vaisseaux. Cet effet correspond à la normalisation de la vascularisation. **B.** Structure des vaisseaux en conditions normale, tumorale et normalisée avec en rouge : les cellules endothéliales, en vert : les péricytes et en bleu la membrane basale. **C.** Paramètres du microenvironnement tumoral (pression microvasculaire et interstitielle, normoxie ou hypoxie, acidose extracellulaire) dans les 3 situations possibles. Abréviations, MVP = pression microvasculaire ; PI = pression interstitielle ; pHe = pH extracellulaire.

*a. Régulation de la vascularisation par les anti-VEGF.*

Il existe différents inhibiteurs pharmacologiques du VEGF (Ferrara and Kerbel 2005). Ces molécules incluent des anticorps anti-VEGF tels que A4.6.1 (anticorps murin dirigé contre le VEGF, précurseur du bevacizumab), le bevacizumab (anticorps humanisé dirigé contre toutes les isoformes humaines du VEGF-A) ou l'aflibercept (VEGF-Trap, récepteur soluble humanisé provenant de la fusion de deux domaines de VEGFR-1 et VEGFR-2, qui bloque le VEGF). On retrouve aussi des inhibiteurs des récepteurs au VEGF, tels que le DC101 (anticorps monoclonal dirigé contre le VEGFR-2 murin) ou des inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase tels que le sorafenib, le sunitinib, le pazopanib et le vandetanib. Ces inhibiteurs de tyrosine kinase ne sont cependant pas spécifiques des récepteurs au VEGF et peuvent cibler d'autres récepteurs à tyrosine kinase (tels que PDGFR).

Plusieurs études précliniques ont mis en évidence que l'inhibition du VEGF et de sa signalisation aboutissait à la normalisation des vaisseaux sanguins tumoraux dans plusieurs modèles tumoraux chez le rongeur (tumeurs mammaires, du colon, des poumons, modèles de gliomes). Les vaisseaux sanguins tumoraux sont moins dilatés, moins tortueux, moins perméables et plus matures (meilleur recouvrement des vaisseaux par les péricytes) (Tong et al. 2004) (Winkler et al. 2004). Une diminution de la pression interstitielle (Lee et al. 2000; Tong et al. 2004), et par conséquent un meilleur captage de molécules anticancéreuses (Dickson et al. 2007; Wildiers et al. 2003), entraînent une régression tumorale plus importante. La normalisation de la vascularisation par les anti-VEGF aboutit également à une meilleure oxygénation de la tumeur augmentant ainsi l'efficacité de la radiothérapie (Winkler et al. 2004) (Lee et al. 2000) (McGee et al. 2010). Cependant, les effets des traitements anti-VEGF ne sont que transitoires et n'interviennent qu'au cours d'une fenêtre dite « fenêtre de normalisation » (figure 22). C'est pendant cette période que les traitements par chimiothérapie ou par radiothérapie sont les plus efficaces (Jain et al. 2007) (Winkler et al. 2004). En dehors de cette fenêtre, un prolongement de la thérapie anti-angiogénique aboutit à une régression trop importante des vaisseaux sanguins (figure 22) (Goel et al. 2011). Cette régression peut avoir des conséquences néfastes sur l'efficacité de ces thérapies. En effet, les tumeurs se retrouvent à nouveau en condition d'hypoxie avec la synthèse d'autres facteurs pro-angiogéniques et/ou le recrutement de progéniteurs endothéliaux entraînant une sélection de clones résistants aux thérapies anticancéreuses (Bergers and Hanahan 2008).



**Figure 22 : Définition d'une fenêtre de normalisation après traitement anti-VEGFR-2.**

D'après (Winkler et al. 2004). Dans un modèle de gliome humain xénotransplanté chez la souris, la normalisation des vaisseaux par l'utilisation du DC101 (anti VEGFR-2) intervient quelques jours après le début du traitement. Cette période est caractérisée par une diminution de la densité et du diamètre des vaisseaux. On assiste à une augmentation du recouvrement des vaisseaux par les péricytes et à une diminution de l'épaisseur de la membrane basale. C'est au cours de cette fenêtre de normalisation que la réponse à la radiothérapie est optimisée. Cependant, la période de normalisation est transitoire. Un prolongement des thérapies anti-angiogéniques aboutit à une régression trop importante des vaisseaux sanguins, à une structure vasculaire similaire à celle d'avant traitement (mauvais recouvrement en péricytes, anomalies de la lame basale) et à une diminution de l'efficacité de la radiothérapie.

En 2004, la FDA (Food and Drug Administration) approuve l'utilisation du bevacizumab en clinique pour le traitement du cancer colorectal en se basant sur les résultats de l'étude clinique de phase III au cours de laquelle, le bevacizumab associé à une chimiothérapie de première ligne (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, augmente la survie sans rechute (44%) et la durée globale de survie des patients (23%) (Hurwitz et al. 2004). Dans une récente revue, Crawford et Ferrara ont recensé les différents essais cliniques portant sur les bénéfices des thérapies anti-VEGF associées à la chimiothérapie dans différents types de cancers (Crawford and Ferrara 2009). Pour exemple, une étude clinique de phase III menée sur 722 femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique a montré que l'association bevacizumab - paclitaxel prolonge la durée de survie sans rechute de ces femmes en comparaison de celles n'ayant reçu que du paclitaxel (11,8 mois versus 6,9). Cependant le taux de survie globale est similaire dans les groupes (environ 26 mois) (Miller et al. 2007).

Les inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase (sorafenib, sunitinib, pazopanib et vandetanib) ont également été approuvés par la FDA pour leur utilisation en clinique dans le traitement du cancer du rein et de la thyroïde métastatiques puisqu'ils stabilisent la maladie et augmentent la survie des patients (Carmeliet and Jain 2011b).

*b. Thérapie anti-angiogénique indirecte.*

La normalisation de la vascularisation tumorale peut également être obtenue comme une conséquence indirecte des thérapies anticancéreuses. Dans un modèle de tumeurs mammaires sur-exprimant HER-2 (récepteur de la famille des EGFR) chez la souris, l'effet de l'Hercéptine (anticorps neutralisant anti-HER-2) sur la vascularisation a été suivi par microscopie intravitale. Outre son action antiproliférative sur les cellules tumorales, l'Hercéptine diminue également le diamètre et la perméabilité des vaisseaux, effets en accord avec le concept de normalisation (Izumi et al. 2002). Une autre étude a montré que l'erlotinib (inhibiteur de tyrosine kinase des EGFR de 1<sup>ère</sup> génération), associé à la chimiothérapie (cisplatine) ou la radiothérapie, améliore la réponse des tumeurs aux traitements (modèles de tumeurs du poumon et des voies aérodigestives supérieures chez la souris). Ces effets bénéfiques sont aussi associés à un remodelage du microenvironnement tumoral, notamment par la normalisation de la vascularisation puisqu'il a été observé une diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de VEGF, une diminution de la perméabilité vasculaire et une diminution de l'hypoxie (Cerniglia et al. 2009).

L'inhibition d'une autre voie de signalisation impliquée dans le cancer peut affecter la vascularisation tumorale, la voie PI3K/AKT/mTOR. Cette voie présente une activité angiogénique puisqu'elle active la NO synthase endothéliale (eNOS) et par conséquent permet la synthèse de NO, puissant facteur pro-angiogénique. Dans un modèle de tumeurs mammaires chez le rat (modèle syngénique), Schnell *et al.* ont montré que l'inhibiteur pharmacologique de PI3K/mTOR (NVP-BEZ-235) diminue la perméabilité vasculaire (effet similaire à un inhibiteur de VEGFR) et la pression interstitielle et ce de manière indépendante à mTOR (un inhibiteur allostérique spécifique de mTOR est sans effet sur ces deux paramètres). De plus, cet effet anti-vasculaire est associé à une diminution de la phosphorylation de la eNOS ainsi qu'à un effet anti-tumoral (Schnell et al. 2008).

Enfin, certains agents chimiothérapeutiques tels que les taxanes ont été décrits pour avoir des propriétés anti-angiogéniques. Dans une étude préclinique, les taxanes diminuent la pression interstitielle tumorale dans un modèle de carcinome mammaire et dans un modèle de sarcome chez la souris (Griffon-Etienne et al. 1999). Cette diminution a été attribuée à une diminution de la densité des cellules tumorales. En effet, l'action apoptotique des taxanes sur les cellules tumorales aboutit à une décompression des vaisseaux tumoraux et par conséquent une diminution de la pression microvasculaire (Griffon-Etienne et al. 1999). Cet effet anti-angiogénique a également été rapporté dans une étude clinique où le paclitaxel induit une diminution de la pression interstitielle et de l'hypoxie tumorales chez des patientes atteintes d'un cancer du sein (Taghian et al. 2005). Dans cette étude, ni la pression interstitielle ni l'hypoxie ne sont diminuées chez les patientes ayant reçu de la doxorubicine.

## 2. Stratégie de régulation du stroma tumoral.

Cibler le stroma tumoral apparaît également comme une stratégie pour améliorer les traitements anticancéreux. Comme nous l'avons vu dans la partie concernant la pression interstitielle, les molécules qui permettent une décontraction du stroma tumoral aboutissent à une diminution de la pression interstitielle et par conséquent une augmentation de l'efficacité des thérapeutiques (tableau VI). Ces molécules ciblent soit les fibroblastes, soit les composants de la matrice extracellulaire (Bouzin and Feron 2007).

La diminution des interactions entre les fibroblastes et la matrice extracellulaire par une inhibition de PDGF (impliqué dans la contraction des fibroblastes et donc dans la contraction de la matrice extracellulaire) normalise le microenvironnement dans différents modèles de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris. En effet, des inhibiteurs du récepteur au PDGF (tels que l'Imatinib / STI571) ou l'utilisation d'antagonistes au PDGF (se fixant de façon compétitive au PDGFR) diminuent la pression interstitielle et améliorent de ce fait la distribution et l'efficacité d'agents anticancéreux tels que le taxol, le 5-FU ou encore le Patupilone (Pietras et al. 2001; Pietras et al. 2002; Pietras et al. 2003; Vlahovic et al. 2006).

Par ailleurs, l'utilisation d'enzymes (collagénases et hyaluronidase) qui vont détruire des composants de la matrice extracellulaire aboutit à la diminution de la pression interstitielle (par décontraction de la matrice extracellulaire) et augmente ainsi le captage d'agents thérapeutiques tels des anticorps monoclonaux et le 5-FU via la restauration des gradients de pression autour des vaisseaux (Eikenes et al. 2004) (Gade et al. 2009). Enfin, l'amélioration

de l'efficacité de la chimiothérapie par la doxorubicine a également été montrée par le blocage du TGF- $\beta$ . Ce blocage entraîne une diminution de la pression interstitielle et une diminution de la quantité de collagène présent dans le stroma (Salnikov et al. 2005) (Lammerts et al. 2002).

### 3. Stratégie de régulation du réseau lymphatique.

Les ganglions lymphatiques sont considérés comme un des sites majeurs de la formation de métastases. Les vaisseaux lymphatiques intratumoraux sont décrits comme non fonctionnels. Cependant, l'existence de vaisseaux lymphatiques hyperplasiques en périphérie de la tumeur apparaît associé à la formation de métastases ganglionnaires (Padera et al. 2002). Hoshida *et al.* ont montré *in vivo* que la surexpression du VEGF-C (ligand du VEGFR-3, récepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques) induit l'hyperplasie des vaisseaux lymphatiques périphériques à la tumeur augmentant ainsi de près de 4 fois les métastases ganglionnaires (Hoshida et al. 2006). Dans le but de réguler le réseau lymphatique périphérique à la tumeur, les stratégies actuelles sont d'utiliser des anticorps neutralisant anti-VEGFR3 et anti-VEGF-C et D (Holopainen et al. 2011). Les études précliniques portant sur ce sujet ont montré que l'inhibition de la voie de signalisation du VEGFR-3 diminue l'hyperplasie des vaisseaux lymphatiques (Hoshida et al. 2006) et diminue la formation de métastases lymphatiques de 50 à 70 % (Holopainen et al. 2011).

## IV. Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO)

Le NO, synthétisé par une famille d'enzymes appelée NO synthase (NOS neuronale ou nNOS, NOS inductible ou iNOS, NOS endothéliale ou eNOS), semble être impliqué dans de nombreuses pathologies humaines et notamment dans le cancer. En effet, dans un grand nombre de tumeurs, notamment dans le cancer du sein, le niveau d'expression et l'activité des NOS endothéliale et inductible sont augmentés en comparaison des tissus sains (Thomsen et al. 1995; Tschugguel et al. 1996). De plus, il a été montré que les tumeurs qui surexpriment la protéine eNOS sont souvent à un stade plus avancé que les tumeurs ne la surexprimant pas (Gatti et al. 2004).

Le NO semble être impliqué dans l'initiation tumorale. En effet, par ses propriétés de radical libre, le NO et ses dérivés sont connus pour induire un stress oxydatif et nitrosatif résultant en un certain nombre de lésions de l'ADN (désamination, mutation par transition et / ou transversion d'acides nucléiques, alkylation et cassure des brins d'ADN) (Tamir and Tannenbaum 1996). Ces lésions peuvent conduire en une inactivation de certaines enzymes réparatrices de l'ADN, de la protéine P53 ou de certaines caspases (Dimmeler et al. 1997). Ces mutations ainsi que l'échappement des cellules à l'apoptose favorisent la sélection de clones, aboutissant à l'expansion de la nouvelle population de cellules (Fukumura et al. 2006).

Le NO présente également un rôle dans la croissance tumorale. En effet, il stimule la prolifération des ces cellules tumorales *in vitro* puisque l'ajout de L-NAME (inhibiteur des NO synthases) diminue cette propriété (Ying and Hofseth 2007) (Shang et al. 2006). Ces résultats sont appuyés par des études *in vivo*, où dans des modèles cancéreux murins, l'inhibition de la iNOS et de la eNOS ralentit la croissance des tumeurs (Jadeski and Lala 1999) (Yamaguchi et al. 2002).

Enfin, plusieurs études ont corrélé positivement l'expression de la eNOS au niveau des vaisseaux tumoraux avec une augmentation de la vascularisation dans plusieurs types de tumeurs (Fukumura et al. 2006). Ces études ont montré que le rôle du NO dans la progression tumorale pouvait être lié à l'induction de l'angiogenèse tumorale. En effet, le NO est considéré comme le principal médiateur des effets pro-angiogénique du VEGF (Bouloumie et

al. 1999; Papapetropoulos et al. 1997). L'inhibition des NO synthases bloque l'activation des cellules endothéliales induite par le VEGF *in vitro* (Ziche and Morbidelli 2000) et diminue l'angiogenèse *in vivo* (Jadeski and Lala 1999). De plus, des tumeurs formées à partir de cellules transfectées par le gène iNOS ont une croissance plus rapide et présentent une vascularisation plus développée que les tumeurs témoins (Jenkins et al. 1995). Enfin, la eNOS tient une place prépondérante dans la vascularisation tumorale puisque l'induction de l'angiogenèse par le VEGF est diminuée chez des souris eNOS<sup>-/-</sup> (Fukumura et al. 2001).

*Nous développerons à la fin de ce chapitre les mécanismes impliqués dans la promotion de l'angiogenèse tumorale par le NO. Cependant, la compréhension de ces mécanismes nécessite la compréhension du rôle du NO à un niveau physiologique. C'est pourquoi nous débutons ce chapitre avec le rôle physiologique de ce facteur ainsi que la régulation des enzymes qui le synthétisent.*

## A. Rôles physiologiques du NO

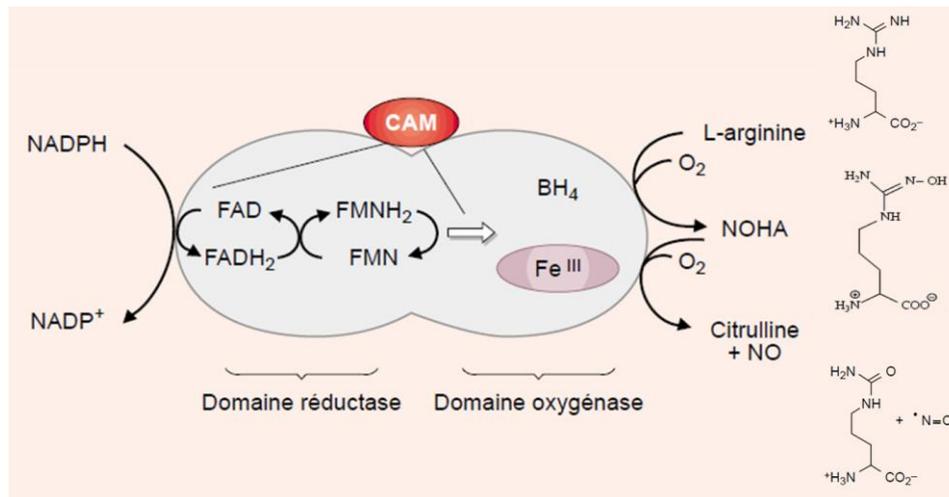
Le monoxyde d'azote (N=O) est un composé radicalaire soluble se présentant sous forme gazeuse connu pour réguler des réponses physiologiques telles que la vasodilatation (tonus vasculaire), l'angiogenèse (Kolluru et al. 2010) et la réponse immunitaire (Muntané and De la Mata 2010). Ce facteur est hautement diffusible au travers des membranes cellulaires et présente une demi-vie très courte (de quelques secondes à quelques minutes). Sa structure de radical libre lui confère la propriété de molécule très réactive avec d'autres radicaux libres, avec des complexes métalliques tels que les ions ferreux (Fe II) ou des complexes métalliques tels que le Fe-S, mais aussi avec l'O<sub>2</sub> (Sennequier and Vadon-Le Goff 1998).

La voie de signalisation majoritairement stimulée par le NO est l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC). Cette enzyme catalyse la conversion de la guanosine triphosphate en guanosine monophosphate cyclique (cGMP) qui active la PKG (protéine kinase dépendante de cGMP) et les phosphodiésterases (Denninger and Marletta 1999). Au niveau vasculaire, le **NO**, en activant la PKG, entraîne une **vasodilatation** via la relaxation des cellules musculaires lisses. Il inhibe également l'agrégation et l'adhésion des plaquettes au niveau de l'endothélium, inhibant ainsi la prolifération des cellules musculaires lisses en diminuant leur exposition au PDGF (Vallance 2003). De plus, il permet également l'augmentation de la **perméabilité vasculaire** de manière dépendante de la guanylate cyclase

soluble puisque l'inhibition de cette protéine réduit fortement la perméabilité vasculaire induite par le VEGF (Morbideilli et al. 2010). Le NO joue également un rôle critique dans l'**angiogenèse** induite par les facteurs pro-angiogéniques, et notamment en réponse au VEGF. En effet, le NO est impliqué dans l'induction de la **prolifération** en activant la voie ERK (qui requiert la cGMP) (Ridnour et al. 2005) et des phosphodiesterases (Favot et al. 2003). Il permet également la **migration des cellules endothéliales** en induisant l'expression de molécules d'adhésions telles que l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Murohara et al. 1999). De plus, la capacité du NO à s-nitrosyler des protéines impliquées dans l'apoptose (telles que les caspases) promeut la **survie cellulaire** (Dimmeler and Zeiher 1999b). Enfin, la s-nitrosylation de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires (telles que la  $\beta$ -caténine) induit la **perméabilité vasculaire** (Thibeault et al. 2010). Ces nitrosylations, qui aboutissent à une inhibition de l'activité de la molécule, contribue largement à l'action pro-angiogénique du NO (Forstermann and Sessa 2011).

## B. Biosynthèse du NO par les NO synthases.

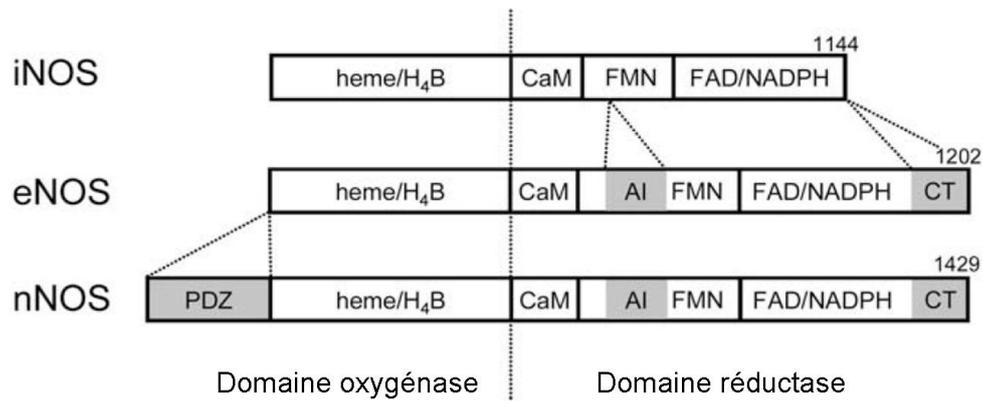
Lors de la synthèse de NO, les enzymes eNOS, iNOS et nNOS utilisent comme substrats la NADPH, l' $O_2$  et la L-Arginine, et comme co-facteurs, le BH4 (tetrahydrobiopterine, molécule impliquée dans les hydroxylations aromatiques), la FAD (flavine adénine dinucléotique), un hème (protoporphyrine IX de fer) ainsi que la FMN (flavine mononucléotide). Les NOS vont catalyser la réaction d'oxydation de la L-Arginine en Citrulline et en NO (Figure 23) : le substrat NADPH est oxydé par le domaine réductase des NOS après s'y être fixé. 2 électrons sont ainsi libérés et transitent via la FAD et la FMN jusqu'au domaine oxygénase où se trouvent les sites de fixation de BH4 et de l'hème (Fe III). Ce flux d'électrons est rendu possible par la fixation de la calmoduline (CaM) et par la fixation de la L-arginine au site actif des NOS. La L-arginine est alors hydroxylée en NOHA (N $\omega$ -hydroxyl-L-arginine) par l'hème grâce aux électrons provenant du NADPH et de l' $O_2$ . La NOHA est oxydée à son tour pour donner la citrulline et le NO. Ce dernier est capable de rétrocontrôle négatif puisqu'il va inhiber cette double oxydation en se fixant à l'atome de fer hémique (Sennequier and Vadon-Le Goff 1998).



**Figure 23 : Biosynthèse du NO, réaction catalysée par les NOS.**

Modifié d'après (Sennequier and Vadon-Le Goff 1998). Après fixation de la calmoduline (CAM) et de la L-arginine au site actif des NOS, 2 électrons libérés lors de l'oxydation de NADPH par le domaine réductase des NOS transitent via la FAD (flavine adénine dinucléotique) et la FMN (flavine mononucléotide) jusqu'au domaine oxygénase où se trouvent les sites de fixation de BH<sub>4</sub> (tetrahydrobiopterine) et de l'hème (Fe III). La L-arginine est alors hydroxylée en NOHA (N $\omega$ -hydroxyl-L-arginine) elle-même oxydée pour donner la citrulline et le NO.

**Structures des NOS.** Les 3 isoformes sont hautement homologues et possèdent une structure dimérique commune. Chaque monomère contient un domaine réductase et un domaine oxygénase (figure 24). Au niveau structural, la **iNOS** est la plus petite des 3 isoformes avec 1144 acides aminés. La **eNOS**, de taille intermédiaire (1202 acides aminés) et la **nNOS**, la plus grande (1429 acides aminés), possèdent en plus une boucle d'auto-inhibition (AI) insérée dans le domaine FMN (Daff 2010). Cette boucle interfère avec l'activation de la protéine en diminuant le transfert d'électron entre le domaine réductase et le domaine oxygénase (Nishida and Ortiz de Montellano 1999). La eNOS et la nNOS possèdent également une extension du domaine C-terminal (CT). La nNOS contient un domaine PDZ au niveau de l'extrémité N-Terminal qui lui permet d'interagir avec le domaine PDZ d'autres molécules, influençant ainsi sa localisation cellulaire et/ou son activité au niveau neuronal (Zhou and Zhu 2009). Les 3 isoformes sont activées par la fixation de la calmoduline. La liaison de cette protéine au niveau de la eNOS et de la nNOS est dépendante d'une concentration en calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire élevée. A l'inverse, la calmoduline se fixe à la iNOS même en cas de faible concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Cette différence s'explique par une différence au niveau des acides aminés du site de liaison à la calmoduline (Forstermann and Sessa 2011). Enfin, la eNOS et la nNOS ont une expression constitutive alors que l'expression basale de la iNOS est faible. Cette isoforme est fortement inductible.



**Figure 24 : Différences et points communs des NOS.**

(D'après (Daff 2010)). Les monomères de chaque isoforme présentent un domaine oxygénase (site de fixation de l'hème et de  $BH_4$ ) et un domaine réductase (site de fixation de la calmoduline, du FMN, du FAD et du NADPH). La eNOS et nNOS contiennent boucle d'auto-inhibition (AI) et une extension du domaine C-terminal (CT). La nNOS contient en plus un domaine (PDZ).

**Localisation tissulaires et cellulaires des NOS.** Le tableau VII récapitule les tissus et cellules où les NOS ont été localisées.

Isoforme	Organe/tissu	Cellules
NOS-1	cerveau	neurones
	système nerveux périphérique	neurones
	rétine	cellules photoréceptrices
	muscle squelettique	
	poumon	cellules épithéliales
	pancréas	îlots de Langerhans
	rein	macula densa
	endomètre	épithélium colonnaire
	estomac antérieur	muqueuse gastrique
NOS-2 induite		macrophages
		lymphocytes, neutrophiles
	os	ostéoblastes
	foie	cellules de Kupffer, hépatocytes
	vaisseaux sanguins	cellules musculaires lisses
	cerveau	cellules macrogliales et microgliales
NOS-3	sang	plaquettes
	vaisseau sanguin	endothélium
	cerveau	
	hippocampe, cervelet, bulbe olfactif	cellules pyramidales
	sang	plaquettes
	cœur	myocytes
	poumon (pendant 15 jours après la naissance)	cellules épithéliales alvéolaires
	rein	cellules épithéliales tubulaires

**Tableau VII : Localisation tissulaires et cellulaires des NOS.**

Modifié d'après (Sennequier and Vadon-Le Goff 1998).

La NOS endothéliale est principalement exprimée au niveau des cellules endothéliales vasculaires. Cependant, elle a également été détectée dans les myocytes cardiaques, les plaquettes, le rein et le cerveau. Au niveau cellulaire, la protéine eNOS a été localisée dans 3 compartiments différents : l'appareil de Golgi, les membranes plasmiques (notamment au niveau des cavéoles) et le cytosol (Fleming and Busse 1999). Dans les cavéoles, elle interagit avec la cavéoline-1. Cette dernière est un inhibiteur de l'activation de la eNOS. Après une stimulation (stress mécanique, VEGF), la concentration en calcium est augmentée et ce dernier se fixe à la calmoduline. La calmoduline dissocie le complexe eNOS/cavéoline-1, aboutissant à l'activation de l'enzyme.

La NOS inductible. L'expression de la iNOS n'est pas constitutive mais inductible par des facteurs pro-inflammatoires tels que l'INF- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 (interleukine-1), les prostanoïdes ou encore par une endotoxine bactérienne, le LPS (lipopolysaccharide) (Fitzpatrick et al. 2008). Elle a d'abord été identifiée dans les macrophages, mais peut également être induite au niveau de plusieurs autres types cellulaires (tels que les lymphocytes, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses, les plaquettes...).

La NOS neuronale est exprimée de façon constitutive au niveau neurones centraux et périphériques. Elle est également exprimée au niveau des cellules épithéliales des reins et des cellules musculaires lisses.

*Au cours des dernières décennies, il est apparu que les NOS inductible et endothéliale étaient impliquées dans de nombreuses pathologies, et notamment dans le cancer. Avant de parler de leurs rôles dans cette pathologie, il est important de comprendre comment ces deux enzymes sont régulées.*

## 1. Régulation de la NOS inductible (iNOS)

La régulation de l'expression de la iNOS, notamment sa régulation transcriptionnelle, est une étape primordiale dans le contrôle de l'activité de cette enzyme. Une fois exprimée, la iNOS synthétise de façon continue du NO jusqu'à ce qu'elle soit dégradée. Le promoteur du gène de la iNOS contient les sites de liaison de nombreux facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, IRF-1 (interferon regulatory factor-1), P53 et HIF-1 (Pautz et al. 2010).

Différents stimuli tels que le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1 ou encore le LPS, induisent l'expression de la iNOS via l'activation du **NF- $\kappa$ B**. D'autres, tels que les glucocorticoïdes et

certaines antioxydants, sont décrits pour l'inhiber via l'inhibition du NF- $\kappa$ B (Pautz et al. 2010). La P53, dont l'expression peut être induite par le NO est considérée comme un rétrocontrôle négatif car elle est capable d'inhiber l'activation du promoteur de la iNOS (Forrester et al. 1996). L'INF- $\gamma$  est quant-à lui capable d'induire l'expression de la iNOS via l'activation de facteur de transcription **IRF-1**. L'activation de NF- $\kappa$ B et de IRF-1 permet une induction maximale de l'expression de la iNOS dans le cas d'une réponse à un agent pathologique (type infection bactérienne) (Fitzpatrick et al. 2008). Il semblerait que l'hypoxie et l'INF- $\gamma$  agissent de manière concomitante pour induire l'expression de la iNOS dans les tumeurs via l'interaction avec HIF-1 et IRF-1 (Melillo et al. 1995) (Tendler et al. 2001).

## 2. Régulation de la NOS endothéliale (eNOS)

La régulation de la protéine eNOS est un processus complexe déterminé par des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle.

### *a. Régulation transcriptionnelle.*

L'expression de la protéine eNOS peut être modulée par de nombreux stimuli qui vont modifier le niveau d'ARNm en modifiant la transcription du gène (via des éléments de réponse situés au niveau du promoteur) ou en modifiant la stabilité des ARNm.

Par exemple, le stress mécanique (pression exercée par le flux sanguin sur l'endothélium) est connu pour augmenter l'expression de la eNOS par des mécanismes transcriptionnels. Six éléments de réponses au stress mécanique ont été identifiés au niveau du promoteur du gène codant pour la eNOS (Li et al. 2004). Ce promoteur contient d'autres éléments régulateurs fixant HIF-1, les œstrogènes, facteurs nucléaires (NF) -1, NF- $\kappa$ B, P53, AP-1 et AP-2 (protéines activatrices, AP-1 augmente l'expression de eNOS en présence d'immunosuppresseur comme la cyclosporine A) (Fleming and Busse 2003).

De nombreux autres facteurs sont connus pour réguler l'expression de la eNOS. Certains facteurs tels que le VEGF, les œstrogènes, l'insuline, bFGF, EGF et TGF- $\beta$ , augmentent la stabilité des ARNm alors que d'autres, tels que le TNF- $\alpha$  et le LPS, diminuent l'expression de la eNOS en déstabilisant ses ARNm (Fleming and Busse 2003). L'hypoxie permet également de moduler l'expression de la eNOS puisqu'il existe un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) au niveau son promoteur (Coulet et al. 2003).

### *b. Régulation post-traductionnelle.*

Au cours de sa synthèse, la protéine eNOS va subir une première modification catalysée par la N-myristoyltransférase. Elle consiste en l'attachement covalent d'un groupe myristoyl au niveau d'un résidu glycine du domaine N-terminal de la protéine eNOS. Cette modification, appelée **myristoylation** est **irréversible** et est requise pour l'association à la membrane et l'activation de la protéine (Sullivan and Pollock 2003). Une fois myristoylée, la eNOS est transloquée au niveau de **l'appareil de Golgi** où elle va subir une 2<sup>ème</sup> modification. La protéine est palmitoylée (addition de palmitate) par la palmitoyltransférase au niveau des résidus cystéine 15 et 26, situés à proximité du domaine N-terminal de l'enzyme. Cette **palmitoylation réversible**, qui requiert au préalable la myristoylation de eNOS, stabilise l'association de la eNOS au niveau des membranes plasmiques. La palmitoylation est également requise pour la translocation de la eNOS au niveau des cavéoles. Une mutation au niveau des sites de palmitoylation aboutit à une accumulation de la eNOS au niveau du Golgi et à une diminution de la production de NO. Ceci suggère que les modifications post-traductionnelles de la eNOS sont importantes pour la localisation intracellulaire de la eNOS (Ortiz and Garvin 2003).

### *c. Localisation et activation de la protéine eNOS.*

#### *i. Localisation dans les cavéoles.*

Par un transport vésiculaire, la protéine eNOS est transloquée de l'appareil de Golgi vers les membranes plasmiques où elle va être associée aux cavéoles. Les **cavéoles** sont de petites (50-100 nm) invaginations membranaires renfermant et contrôlant de nombreuses molécules de signalisation comme des récepteurs à tyrosine kinase (VEGFR), les protéines G, la eNOS et transporteur CAT-1 (cationic amino acid transporter 1, impliqué dans le transport de la L-arginine, substrat de la eNOS) (Govers and Rabelink 2001; Ozuyaman et al. 2008). Les cavéoles sont riches en cholestérol, sphingolipides et contiennent des protéines appelées **cavéolines**, dont la cavéoline-1 (ou Cav-1). **La cavéoline-1** est abondante dans les cellules endothéliales et sa liaison avec la eNOS inhibe l'activité de l'enzyme car elle interfère avec la liaison de la calmoduline. Le complexe eNOS/Cav-1 est maintenu tant que la concentration en calcium intracellulaire est faible. Seule une synthèse basale de NO peut alors être mesurée (Fleming and Busse 1999) (Sbaa et al. 2005).

- ii. Cycle d'activation / désactivation de la eNOS dépendant du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire

#### ***Activation et translocation de la eNOS dans le cytosol.***

Lorsque les cellules endothéliales sont activées par des facteurs tels que le VEGF on assiste à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Ce dernier, se fixe à la calmoduline. Le complexe calmoduline / calcium se fixe à la protéine eNOS dissociant ainsi la cavéoline-1 et déplaçant la boucle auto-inhibitrice de l'enzyme (Fleming and Busse 2003). Le flux d'électrons du domaine réductase vers le domaine oxygénase est alors facilité. En même temps, la eNOS est phosphorylée par la protéine AKT au niveau du résidu sérine 1177 (Dimmeler et al. 1999), dépalmitoylée et transloquée dans le cytosol (Dudzinski and Michel 2007). L'activité de l'enzyme est augmentée permettant ainsi la synthèse de NO. La eNOS s'associe également à la protéine chaperonne HSP90 qui facilite la liaison avec la CaM et qui permet le recrutement de kinases (dont AKT) modulant l'activité de la protéine eNOS (Fulton et al. 2001).

#### ***Activation complémentaire de la eNOS par phosphorylation / déphosphorylation des résidus sérine et thréonine.***

Parmi les 6 sites de phosphorylations connus, 2 ont été largement étudiés. Il s'agit de la phosphorylation du résidu sérine 1177 (Ser1177, situé au niveau du domaine réductase) activant l'enzyme ; et de la phosphorylation du résidu thréonine 495 (Thr495, situé dans le domaine de liaison à la CaM) qui inhibe l'enzyme. Il existe une coordination entre la phosphorylation du résidu Ser1177 et la déphosphorylation du résidu Thr495.

**Le résidu Ser1177** n'est pas phosphorylé dans les cellules endothéliales quiescentes mais l'est rapidement après stimulation des cellules par le VEGF (Fleming and Busse 2003). Sa phosphorylation augmente le flux d'électrons, aboutissant à une augmentation de la synthèse du NO. Plusieurs kinases sont décrites pour phosphoryler le résidu Ser1177 de la eNOS : **i)** AKT est la kinase activée en réponse au VEGF (Dimmeler et al. 2000; Kawasaki et al. 2003; Papapetropoulos et al. 1997), **ii)** la PKA est impliquée lors d'un stress mécanique, **iii)** l'AMPK pour la réponse insulinique et **iv)** la CaMKII (calmoduline kinase II) lors de la stimulation des cellules endothéliales par la bradykinine (Mount et al. 2007). Le résidu Ser1177 apparaît comme le plus important site de régulation de l'activité de l'enzyme. En effet, l'induction *in vitro* par l'endostatine (facteur anti-angiogénique) de sa

déphosphorylation via une phosphatase (PP2A) bloque l'angiogenèse induite par le VEGF (Urbich et al. 2002).

**Le résidu Thr495** est phosphorylé de façon constitutive par la protéine kinase C dans les cellules endothéliales. Il se présente comme un site de **régulation négative** : sa phosphorylation est associée à une diminution de l'activité de l'enzyme via une interférence avec le site de fixation de la calmoduline. Lorsque la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire augmente, le résidu Thr495 est déphosphorylé par les protéines phosphatase-1 (PP1) et la calcineurine (PP2B) (Mount et al. 2007). La fixation du complexe calmoduline / calcium à la protéine eNOS est alors possible.

#### ***Désactivation et recyclage de la eNOS.***

Lorsque la concentration en calcium intracellulaire diminue, la protéine eNOS est désactivée. La calmoduline se dissocie et la eNOS est à nouveau transloquée vers l'appareil de Golgi (possédant la palmitoyl transférase). La localisation de la eNOS au niveau du Golgi est nécessaire pour la repalmitoylation de la protéine après son activation. Ainsi, la eNOS est en permanence recyclée entre la membrane plasmique et le Golgi (Govers and Rabelink 2001). Une fois repalmitoylée, l'enzyme retourne au niveau des cavéoles via les vésicules de transport comme décrit précédemment, où son association à la cavéoline-1 réduira à nouveau son activité (Feron et al. 1998).

- iii. Activation de la eNOS de façon indépendante du calcium intracellulaire.

Malgré le fait que la eNOS soit classée comme une enzyme dépendante du complexe calmoduline / calcium, une activité basale a été reportée à de faible concentration de calcium, suggérant que du NO est produit de manière basale et ce de façon indépendante au calcium (Fleming and Busse 1999). Dans une étude *in vitro* menée sur des cellules endothéliales bovines, il a été montré que les céramides (sphingolipides dérivés de l'acylation de la shingosine) augmentaient l'activité de la eNOS de manière indépendante du calcium (un chélateur de calcium n'a pas inhibé cette activation) et induisaient la translocation de l'enzyme dans le cytosol (Igarashi et al. 1999).

Dans une autre étude *in vitro* menée sur des cellules endothéliales humaines, la protéine eNOS, en réponse à l'insuline, est activée de manière indépendante au calcium (un chélateur de calcium est sans effet sur cette phosphorylation). Il semblerait que cette

activation requiert la phosphorylation de la eNOS au niveau du site Ser1177 par la protéine AKT (Montagnani et al. 2001).

## C. Rôles du NO et de la eNOS dans la progression tumorale.

### 1. Rôle du NO dans l'angiogenèse

Le NO, synthétisé par les deux isoformes eNOS et iNOS, peut promouvoir la progression tumorale en induisant l'angiogenèse tumorale. Il semblerait cependant que la synthèse de NO par la eNOS soit particulièrement impliquée dans ces effets pro-angiogéniques. En effet, dans des modèles de tumeurs chez des souris eNOS<sup>-/-</sup> ou iNOS<sup>-/-</sup>, l'induction de l'angiogenèse par le VEGF est diminuée uniquement chez les souris eNOS<sup>-/-</sup>. Cette diminution est d'ailleurs associée à une régression tumorale (Fukumura et al. 2001) (Gratton et al. 2003). Dans un autre modèle de tumeurs, l'extinction de la eNOS (souris eNOS<sup>-/-</sup>) a mis en évidence que le NO permettait l'élongation et la formation de nouveaux embranchements vasculaires, augmentant ainsi la densité vasculaire (Brown et al. 1999; Kashiwagi et al. 2005). Une inhibition de la eNOS chez la souris (souris eNOS<sup>-/-</sup> ou par le L-NAME) bloque l'hyperperméabilité vasculaire induite par le VEGF (Fukumura et al. 2001; Fukumura et al. 1997). De plus, la Cavtratin (peptide dérivé de la cavéoline-1 inhibant spécifiquement la eNOS) inhibe la perméabilité vasculaire induite par le VEGF. Ceci indique le rôle prépondérant du NO dans la perméabilité vasculaire tumorale (Gratton et al. 2003).

Ces observations *in vivo* ont été complétées par un grand nombre d'études *in vitro* sur le rôle du NO dans l'activation des cellules endothéliales. Ces études ont montré que le NO agit au niveau des différentes étapes caractérisant l'angiogenèse tumorale : la perméabilité vasculaire, la prolifération, la migration des cellules endothéliales et leur capacité à former des pseudocapillaires. L'utilisation d'inhibiteur de la eNOS diminue la prolifération des cellules endothéliales et leur capacité à former des pseudocapillaires (Urbich et al. 2002) (Polytarchou and Papadimitriou 2005). A l'inverse, l'activation de cette enzyme augmente la prolifération cellulaire et la formation de pseudocapillaires (Dimmeler et al. 2000) (Chung et al. 2010). D'autre part le NO est également impliqué dans la migration des cellules endothéliales puisqu'il induit l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$ , molécule d'adhésion indispensable à la migration des cellules endothéliales (Murohara et al. 1999).

Enfin, il a été montré *in vitro* par l'équipe de Gratton JP *et al.* que la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales induite par le VEGF est bloquée lorsque la eNOS est inhibée par la cavtatrin (Oubaha and Gratton 2009). Un des mécanismes pouvant expliquer cet effet est la capacité du NO à modifier les jonctions cellulaires. Il interfère avec le complexe VE-cadhérine /  $\beta$ -caténine / p120caténine /  $\alpha$ -caténine connu pour son rôle dans les jonctions et adhérences cellulaires. En effet, le NO permet la dissociation de ce complexe via la S-nitrosylation du résidu Cys619 de la  $\beta$ -caténine (Thibeault et al. 2010).

Il a été montré que le NO régulait positivement certains facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, en augmentant la transcription du gène du VEGF et en stabilisant les ARNm (augmentation de sa demi-vie) (Chin et al. 1997) (Jozkowicz et al. 2001). Le NO active la transcription de HIF-1 $\alpha$  (Sandau et al. 2001), stabilise ce facteur en inhibant l'action des prolyl hydroxylases ou PHD (Metzen et al. 2003), ce qui au final augmente l'expression du VEGF puisqu'un HRE a été identifié au niveau du promoteur du gène codant pour le VEGF (Kimura et al. 2000).

## 2. Rôle du NO dans la formation de métastases

Le NO semble jouer un rôle important dans la progression tumorale notamment en favorisant le processus métastatique. Dans un modèle de tumeurs mammaires chez la souris, il a été mis en évidence que toutes les cellules tumorales retrouvées au niveau du site métastatique exprimaient la eNOS alors que les cellules tumorales de la tumeur primaire n'expriment pas toutes cette protéine. Cette observation suggère que la surexpression de la eNOS est associée au potentiel métastatique des cellules tumorales. (Jadeski et al. 2000). Le NO interviendrait à toutes les étapes du processus métastatique. Ainsi, la eNOS et la iNOS induisent la migration et l'invasion de cellules cancéreuses (mammaires et colorectales) via la phosphorylation de la protéine ERK  $\frac{1}{2}$  (Fukumura et al. 2006; Jadeski et al. 2003). L'invasion des cellules cancéreuses mammaires est également stimulée par le NO via l'activation de la MMP-2 et/ou l'inhibition des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-2 et TIMP-3) (Gauthier et al. 2004; Orucevic et al. 1999). De plus, il a récemment été montré que le NO augmentait le risque d'invasion des ganglions lymphatiques. En effet, le blocage de la production de NO (inhibition pharmacologique ou délétion génétique de eNOS) diminue l'envahissement ganglionnaire et par conséquent la formation de métastases (Lahdenranta et al. 2009).

Ainsi, le NO présente un rôle primordial dans le développement tumoral, aussi bien au niveau des cellules tumorales qu'au niveau de la vascularisation de la tumeur. L'inhibition de la synthèse de ce facteur peut être considérée comme une cible pour le développement de thérapies contre le cancer.

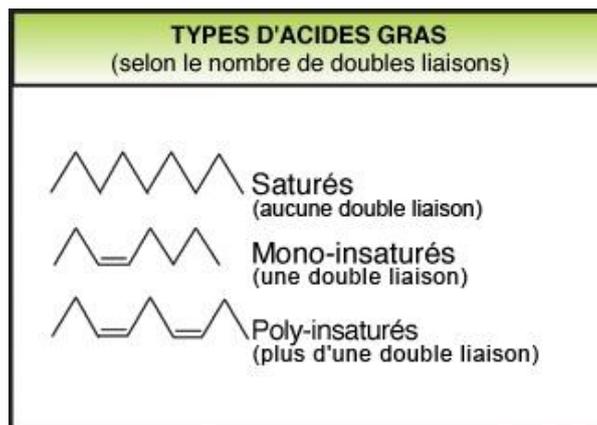
## V. Acides gras oméga-3 et cancer.

### A. Généralités.

#### 1. Structure et nomenclature des acides gras.

Les acides gras, de formule générale  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ , sont composés d'une chaîne hydrocarbonée linéaire dont la longueur varie le plus souvent entre 12 et 22 atomes de carbones, dont les extrémités sont constituées par des groupements carboxyle ( $\text{COOH}$ , partie hydrophile) et méthyle ( $\text{CH}_3$ , partie hydrophobe). Les acides gras peuvent être classés de plusieurs manières suivant leur structure (Guesnet 2005; Legrand 2007) :

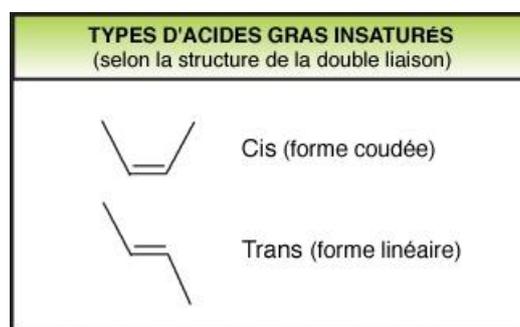
- En fonction de la **longueur de la chaîne carbonée** : les acides gras à chaîne courte ou moyenne ont un nombre de carbones compris entre 4 et 12, et les acides gras à chaîne longue à partir de 14 carbones.
  
- En fonction de leur **degré d'insaturation**, c'est-à-dire du nombre de doubles liaisons éthyléniques qu'ils renferment. On distingue alors les acides gras saturés (aucune double liaison), les acides gras monoinsaturés (une seule double liaison) et les acides gras polyinsaturés (AGPI, plusieurs doubles liaisons) (figure 25).



**Figure 25 : Classification des acides gras en fonction de leurs insaturations.**

(Source. <http://www.eufic.org/article/fr/expid/basics-graisses/>)

- En fonction de la position (**isomérisation de position**) et de la conformation (**isomérisation géométrique**) des doubles liaisons. A l'état naturel, les doubles liaisons sont systématiquement séparées par 3 carbones et sont en configuration *cis*. Cette configuration *cis* indique que les deux parties de la chaîne hydrocarbonée situées de part et d'autre de la double liaison sont du même côté par rapport au plan de la double liaison (formation d'un « coude ») (figure 26). Les doubles liaisons peuvent également se trouver en conformation *trans*, les deux parties de la chaîne hydrocarbonée sont de part et d'autre de la double liaison (forme linéaire) (figure 26). Ces acides gras *trans* peuvent être d'origine naturelle et sont présents dans le rumen des ruminants. Ils peuvent aussi être d'origine industrielle où ils sont produits par l'hydrogénation partielle des acides gras insaturés contenus dans les huiles végétales (Guesnet 2005).



**Figure 26 : Isomérisation géométrique des doubles liaisons.**  
(Source. <http://www.eufic.org/article/fr/expid/basics-graisses/>)

Il existe deux types de **nomenclature des acides gras** : *i*) la nomenclature normalisée IUPAC (ou nomenclature des chimistes) et *ii*) la nomenclature des « physiologistes » (formule simplifiée la plus couramment utilisée).

La première permet de numéroter les doubles liaisons en comptant les atomes de carbone à partir de l'extrémité carboxyle (numérotation en  $\Delta$ , où  $\Delta$  représente la double liaison) : **C<sub>x</sub> : y  $\Delta$  a**. La seconde permet de caractériser les acides gras en mentionnant successivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la position de la première double liaison numérotée à partir de l'extrémité méthyle : **C<sub>x</sub> : y n-b**.

Dans ces nomenclatures, **x** représente le nombre de carbones de la molécule, **y** le nombre d'insaturation, **a** la position des doubles liaisons à partir du groupement carboxyle et **b** la position des doubles liaisons à partir du groupement méthyle.

Ainsi, un nom systématique et une formule simplifiée peuvent être attribués à chaque acide gras. Cependant, en fonction des graisses dans lesquelles on les retrouve, on peut également leur attribuer un nom commun, nom plus facilement utilisé (Tableau VIII). Quatre familles d'acides gras se distinguent par la position de la première double liaison numérotée à partir de l'extrémité méthyle. Parmi les acides gras monoinsaturés, on retrouve : les acides gras n-7 et n-9 ; et parmi les acides gras polyinsaturés : la famille des n-6 (AGPI n-6), et la famille des n-3 (AGPI n-3).

	Nom systématique	Nom commun / abréviation)	Formule simplifiée
<b>AGS</b>	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique	16:0
	Acide octadécanoïque	Acide stéarique	18:0
	Acide eicosanoïque	Acide arachidique	20:0
	Acide docosanoïque	Acide béhénique	22:0
	Acide tétracosanoïque	Acide lignocérique	24:0
<b>AGMI</b>	Acide 9-hexadécénoïque	Acide palmitoléique	16:1 n-7
	Acide 9-octadécénoïque	Acide oléique / (OA)	18:1 n-9
	Acide 11-eicosénoïque	Acide gadoléique	20:1 n-9
	Acide 13-docosénoïque	Acide érucique	22:1 n-9
	Acide 15-tétracosénoïque	Acide nervonique	24:1 n-9
<b>AGPI n-6</b>	Acide 9,12-octadécadiénoïque	Acide linoléique / (LA)	18:2 n-6
	Acide 6,9,12-octadécatriénoïque	Acide $\gamma$ -linoléique / (GLA)	18:3 n-6
	Acide 8,11,14-eicosatriénoïque	Acide dihomogamma-linoléique / (DGLA)	20:3 n-6
	Acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque	Acide arachidonique / (AA)	20:4 n-6
	Acide 7,10,13,16-docosatetraénoïque	Acide docosatetraénoïque	22:4 n-6
	Acide 4,7,10,13,16-docosapentaénoïque		22:5 n-6
<b>AGPI n-3</b>	Acide 9,12,15-octadécatriénoïque	Acide $\alpha$ -linoléique / (ALA)	18:3 n-3
	Acide 11,14,17-eicosatriénoïque		20:3 n-3
	Acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	Acide eicosapentaénoïque / (EPA)	20:5 n-3
	Acide 7,10,13,16,19-docosapentaénoïque	Acide docosapentaénoïque / (DPA)	22:5 n-3
	Acide 4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	Acide docosahexaénoïque / (DHA)	22:6 n-3

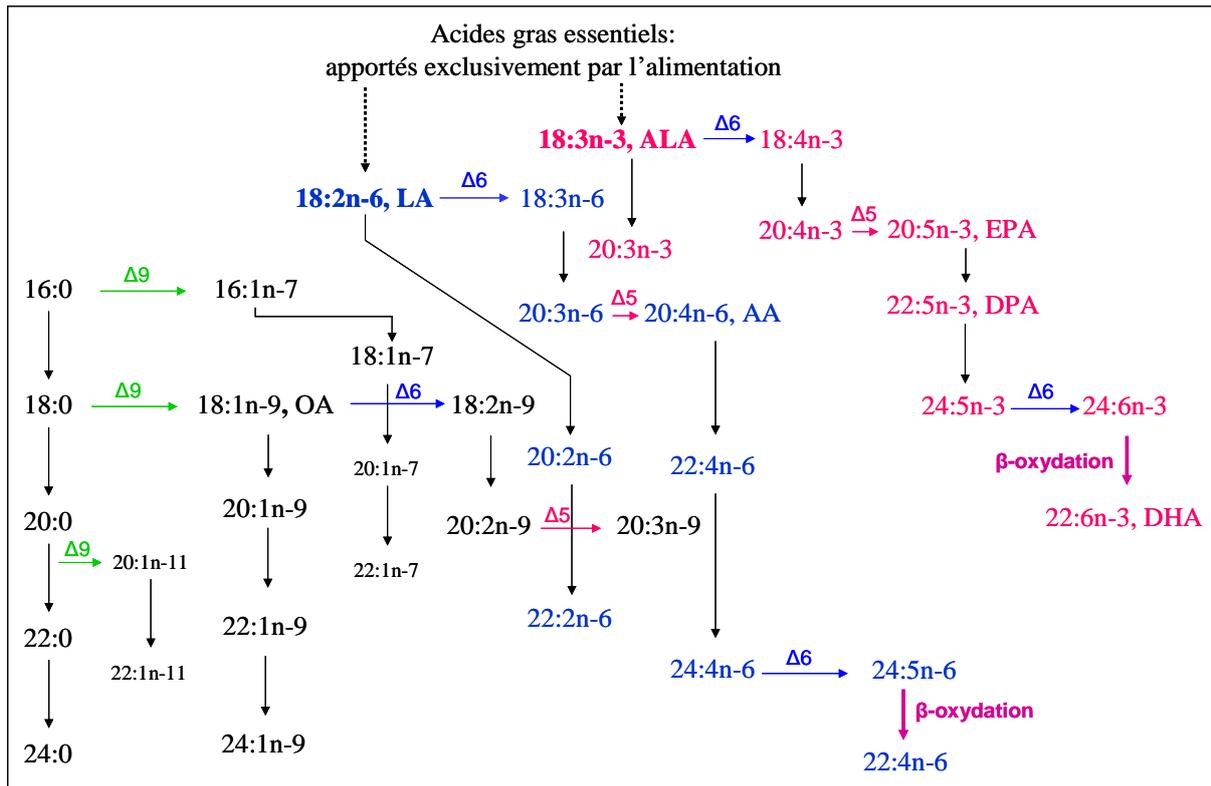
**Tableau VIII : Nomenclatures systématique (selon la nomenclature des chimistes) et commune des principaux acides gras ainsi que leur formule simplifiée (selon la nomenclature des physiologistes).**

Abréviations. AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés

## 2. Biosynthèse et métabolisme des AGPI

La biosynthèse des acides gras comprend trois grandes phases (figure 27) (Guesnet 2005; Legrand 2007; Wallis et al. 2002) :

- La synthèse *de novo* (ou lipogénèse) des acides gras saturés à partir de l'acétate
- L'élongation de la chaîne carbonée à partir des acides gras issus de la synthèse *de novo* ou des acides gras d'origine alimentaire.
- La synthèse des acides gras insaturés par les désaturases  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  et  $\Delta 5$



**Figure 27 : Biosynthèse des acides chez les mammifères.**

(D'après (Guesnet 2005; Legrand 2007; Wallis et al. 2002). L'acide linoléique (18:2n-6 ou LA) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3 ou ALA) sont des acides gras essentiels car ils sont uniquement apportés par l'alimentation. La biosynthèse des autres acides gras est sous le contrôle d'enzymes (désaturases) qui ajoutent des doubles liaisons entre les atomes de carbone 9 et 10 pour la  $\Delta$ -9 désaturase, 6 et 7 pour la  $\Delta$ -6 désaturase et 5 et 6 pour la  $\Delta$ -5 désaturase. Les réactions d'élongation permettent d'allonger la chaîne carbonée de deux atomes de carbone. A l'inverse, la  $\beta$ -oxydation raccourcit de 2 carbones la chaîne carbonée des acides gras et permet la formation du DHA (22:6 n-3). Sur le schéma, les désaturations sont représentées par des flèches horizontales, l'élongation par des flèches verticales noires et la  $\beta$ -oxydation par des flèches verticales violettes. Abréviations. OA (18:1n-9) : acide oléique, LA (18:2n-6) : acide linoléique, ALA(18:3n-3) : acide  $\alpha$ -linoléique, AA (20:4n-6) : acide arachidonique, EPA (20:5n-3) : acide eicosapentaénoïque, DPA(22:5n-3) : acide docosapentaénoïque, DHA(22:6n-3) : acide docosahexaénoïque.

#### a. Synthèse de novo des acides gras saturés.

La synthèse *de novo* permet la synthèse des acides gras saturés par condensation de 2 molécules d'acétate (2 carbones). Chez les mammifères, ce processus est exclusivement cytosolique et se déroule principalement dans le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires. Il fait intervenir un complexe multi-enzymatique du nom de « fatty acid synthase » (FAS) qui permet uniquement la synthèse d'acides gras saturés avec un nombre maximum de 16 atomes de carbone. Ce complexe enzymatique ajoute séquentiellement des unités à deux carbones à partir de l'acétate jusqu'à l'obtention du palmitate (16:0) après 7 cycles d'élongation. Les acides gras sont ensuite libérés du complexe enzymatique par une hydrolase.

### *b. Elongation de la chaîne carbonée.*

L'élongation de la chaîne carbonée des acides gras (> à 16 carbones) s'effectue au sein du réticulum endoplasmique. Les étapes sont identiques à la synthèse *de novo* mais sont réalisées par les élongases. Ces enzymes ajoutent deux atomes de carbones supplémentaires à l'extrémité carboxyle. L'acide palmitique (16:0) va être converti en acide stéarique (18:0) et en acides gras saturés à plus longue chaîne carbonée (jusqu'à 24 carbones).

### *c. Synthèse des acides gras insaturés.*

Les acides gras saturés peuvent être désaturés par les désaturases, enzymes qui permettent la formation de doubles liaisons entre les carbones 9 et 10 ou 6 et 7 ou 5 et 6. Ces désaturations, effectuées respectivement par la  $\Delta$ -9 désaturase, la  $\Delta$ -6 désaturase et la  $\Delta$ -5 désaturase, se déroulent dans le réticulum endoplasmique et peuvent se faire sur tous les acides gras saturés et insaturés.

Les acides gras monoinsaturés proviennent de l'alimentation et de la synthèse endogène. La  $\Delta$ -9 désaturase introduit une double liaison au niveau de l'acide palmitique (16:0) et de l'acide stéarique (18:0), ce qui conduit respectivement à la synthèse de l'acide palmitoléique (16:1 n-7) et l'acide oléique (AO, 18:1 n-9). Quantitativement, l'acide oléique représente l'acide gras majeur des acides gras monoinsaturés, il est activement synthétisé par les cellules et très abondant dans les aliments d'origines végétale et animale. L'acide palmitoléique est faiblement synthétisé par rapport à l'acide oléique et est quasiment absent de l'alimentation (Legrand 2007).

La synthèse des acides gras polyinsaturés de la famille n-6 et n-3 est particulière. En effet, la plupart de ces AGPI peuvent être synthétisés par les mammifères mais leurs précurseurs, l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide  $\alpha$  linoléique (18:3 n-3), doivent obligatoirement être apportés à l'organisme par une alimentation d'origine végétale. Le 18:2 n-6 et le 18:3 n-3 sont qualifiés d'acides gras **essentiels**. En effet, les cellules de mammifères sont dépourvues des désaturases  $\Delta$ -12 et  $\Delta$ -15 qui génèrent le l'acide linoléique et l'acide  $\alpha$  linoléique à partir de l'acide oléique (18:1 n-9).

L'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide  $\alpha$  linoléique (18:3 n-3) conduisent, par une succession de désaturations ( $\Delta$ -6 désaturase et  $\Delta$ -5 désaturase) et d'élongations (élongases), à la synthèse d'acides gras à plus longue chaîne de la famille des AGPI n-3 et n-6. Les principaux AGPI ainsi formés sont pour la famille n-6 : l'acide arachidonique (AA, 20:4 n-6)

et pour la famille n-3 : les acides eicosapentaénoïque (**EPA**, 20:5 n-3) et docosahexaénoïque (**DHA**, 22:6 n-3). La synthèse du DHA nécessite une étape terminale de  $\beta$ -oxydation (figure 27). Chez l'homme, le faible taux de conversion de l'acide  $\alpha$ -linoléique en EPA (5 à 20%) et en DHA (0,5 à 9%) (DeFilippis and Sperling 2006; Wall et al. 2010) suggère que l'apport par l'alimentation des ces deux acides gras (EPA et DHA) est nécessaire pour satisfaire les besoins des tissus chez l'homme (MacLennan and Ma 2010).

### 3. Sources alimentaires, transport et répartition tissulaire des acides gras.

Chez l'Homme, les acides gras, apportés par l'alimentation sont présents dans l'organisme principalement sous forme de triglycérides, de phospholipides et d'esters de cholestérol. Les triglycérides représentent 95 à 98 % des lipides alimentaires ingérés. Ils sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras semblables ou différents. Les phospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphatidique.

#### *a. Principales sources alimentaires des acides gras.*

Les sources alimentaires apportent, selon leurs origines animale ou végétale, les différentes classes d'acides gras. Le tableau suivant présente les principales sources alimentaires des acides gras.

	Source animale	Source végétale
<b>Acides gras saturés</b>	Lait, fromages, beurre, viandes et dérivés.	Margarine, huile de noix de coco, huile de palme
<b>Acides gras monoinsaturés</b>	Produits laitiers, viandes, charcuteries, le saindoux et la graisse d'oie .	Huile d'olive (riche en acide oléique), huiles de colza, de noix, d'arachide et de tournesol
<b>Acides gras polyinsaturés</b>	<b>AGPI n-6</b> : Porc, volaille, lapin, charcuteries, œufs, beurre et graisse d'oie.	<u>Acide linoléique</u> : Huiles de maïs, tournesol, colza, noix, pépins de raisin, soja <u>Acide <math>\gamma</math>-linoléique</u> : Huiles d'onagre, de bourrache et de cassis
	<b>AGPI n-3</b> : Poissons marins gras comme le saumon, la sardine et le hareng (principalement riches en <u>DHA</u> et <u>EPA</u> )	<u>Acide <math>\alpha</math>-linoléique</u> : Graines oléagineuses et huiles végétales de colza, de noix, de soja, de lin et de germe de blé.

**Tableau IX : Principales sources alimentaires des différentes classes d'acides gras.**

Les acides gras saturés sont retrouvés principalement dans les aliments d'origines animales mais également dans certaines huiles et les graisses industriels (margarine). Les acides monoinsaturés sont présents à la fois dans les aliments d'origine végétales et animales. Les acides gras polyinsaturés sont plus faiblement présents dans notre alimentation en comparaison des deux autres classes d'acides gras. Parmi eux, le DHA et l'EPA, de la famille des n-3, sont surtout retrouvés dans les poissons gras marins tels que le saumon, la sardine et le hareng.

#### *b. Transport et répartition tissulaires des acides gras*

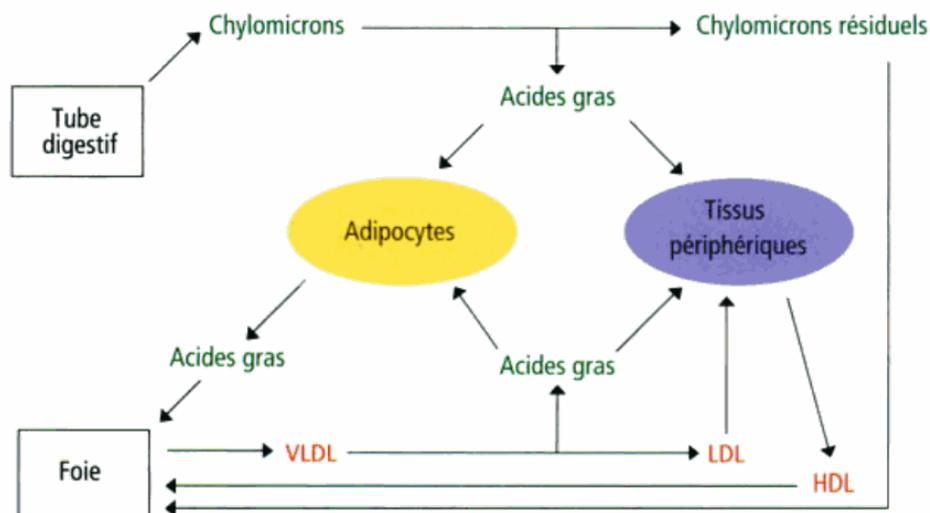
Au cours de la digestion, le cholestérol, les acides gras et les monoglycérides (obtenus après émulsion par les sels biliaires et hydrolyse par la lipase pancréatique des triglycérides) sont absorbés par la muqueuse intestinale.

Dans le plasma, ces lipides sont véhiculés entre les différents tissus et organes pour leur utilisation ou leur stockage. Etant insolubles dans l'eau, ils sont transportés sous forme de triglycérides par des apolipoprotéines, l'ensemble formant des complexes appelés lipoprotéines. Ces dernières sont constituées d'un noyau central composé de cholestérol estérifié et de triglycérides, et d'une monocouche externe composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines, assurant ainsi la solubilité de la lipoprotéine dans le plasma et le transport des lipides en milieu aqueux. Les lipoprotéines se distinguent par leur teneur en apolipoprotéines, en lipides et en cholestérol. Elles se répartissent en quatre classes selon leur densité :

- les **chylomicrons** sont produit par les entérocytes. Ces derniers, transforment les acides gras issus de la digestion en triglycérides qui vont être intégrés dans les chylomicrons. Ces derniers sont expulsés dans la lymphe au niveau du

canal thoracique et rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine cave supérieure.

- les **lipoprotéines de très basse densité (VLDL)** produites dans le foie et qui sont composées à 80% par les triglycérides.
- les **lipoprotéines de basse densité (LDL)** proviennent du métabolisme des VLDL et sont riches en cholestérol.
- les **lipoprotéines de haute densité (HDL)** qui interviennent dans l'élimination du cholestérol des tissus.



**Figure 28 : Transport des acides gras par les lipoprotéines et leur répartition tissulaire.**  
D'après (Médart 2009). Explication ; voir texte ci-dessous.

La figure ci-dessus (figure 28) schématise le transport des acides gras dans l'organisme par les différentes lipoprotéines (Médart 2009). Une fois dans le plasma, les chylomicrons sont hydrolysés au niveau des capillaires par la lipoprotéine lipase (Goldberg 1996). Les acides gras ainsi libérés sont captés par les tissus périphériques ou stockés dans les adipocytes où ils sont retransformés en triglycérides. Au fur et à mesure de leur hydrolyse, les chylomicrons deviennent plus petits (formation de chylomicrons résiduels) puis sont captés et dégradés par le foie (Green and Glickman 1981)

Dans le foie, les acides gras provenant de la synthèse *de novo* ou libérés par les adipocytes servent à la formation de triglycérides qui sont incorporés dans les VLDL. Ces

lipoprotéines sont également hydrolysées par la lipoprotéine lipase, permettant également aux acides gras d'être captés par les tissus périphériques ou stockés dans le tissu adipeux. Les VLDL, après l'action de la lipase hépatique et de la lipoprotéine lipase, se transforment en LDL qui sont assimilées par endocytose au niveau des différents organes, fournissant ainsi les cellules en cholestérol libre (constituant des membranes, et permet la synthèse des sels biliaires et des hormones stéroïdiennes) (Médart 2009).

En cas de besoin énergétique de l'organisme (par exemple, un jeun), la lipase hydrolyse les triglycérides stockés dans les adipocytes du tissu adipeux. Les acides gras libres peuvent se lier à l'albumine plasmatique et sont acheminés au niveau des tissus où ils sont une source énergétique importante.

Dans l'organisme, les acides gras sont principalement stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides et constituent une source importante d'énergie. Ils sont cependant présents dans tous les tissus où ils ont un *rôle structural* en tant que constituants essentiels des membranes biologiques (sous forme de phospholipides et de glycolipides) et *un rôle fonctionnel* en tant que précurseurs de médiateurs lipidiques bioactifs (eicosanoïdes) et modulateurs de l'expression de certains gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que les PPAR (Guesnet 2005). La composition des lipides membranaires n'est pas figée et est directement influencée par les acides gras provenant de l'alimentation. En effet, les AGPI n-3 provenant de l'alimentation sont incorporés dans les membranes des cellules (Schley et al. 2007). 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 (rafts lipidiques), l'activité d'un grand nombre d'enzymes, de transporteurs et de récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire (Stillwell et al. 2005) (Schmitz and Grandl 2008).

## B. Sensibilisation des tumeurs par les AGPI n-3.

La sensibilité des tumeurs aux AGPI n-3 a pu être analysée grâce à l'existence de techniques permettant de mesurer la consommation passée et récente d'acides gras.

L'évaluation de la consommation passée des AGPI est possible grâce à l'analyse de la composition en acides gras du tissu adipeux. Une telle analyse permet d'obtenir une information concernant l'alimentation sur le long terme. 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). Ainsi, le tissu adipeux est un biomarqueur fiable et non influencé par les derniers repas.

L'analyse de la composition en acides gras du sérum (Maillot et al. 2005) et des phospholipides membranaires des érythrocytes permet d'obtenir des informations sur l'apport alimentaire récent d'acides gras (Thiebaut et al. 2005). Par exemple, la demi-vie de l'EPA est d'environ 5 jours dans le sérum et de 4 semaines dans les membranes des érythrocytes (Sun et al. 2007).

Par ailleurs, au niveau des tumeurs, les acides gras proviennent non seulement de la synthèse *de novo*, mais également des lipides apportés par l'alimentation. La fraction phospholipidique des cellules tumorales présente un renouvellement très rapide (Pardini 2006). Cet aspect est intéressant notamment dans le cadre d'expérimentation étudiant l'effet d'une supplémentation alimentaire sur l'efficacité des thérapies anticancéreuses

## 1. Les AGPI n-3 apportés par l'alimentation sensibilisent les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux.

### a. *Données cliniques.*

Association entre AGPI et sensibilisation des tumeurs du sein. Une étude prospective a été menée chez 121 patientes traitées pour un cancer du sein invasif mais non métastatique où la composition en acides gras du tissu adipeux a été analysée. Cette étude a rapporté que le risque de développer des métastases après le traitement était associé à un faible taux d'acide  $\alpha$  linoléique mesuré dans le tissu adipeux ( $< 0,38\%$ ). Une association proche de la significativité entre le taux de DHA ( $\geq 0,17\%$ ) et la diminution de la formation de métastases a été observée (Bougnoux et al. 1994). De plus, cet AGPI n-3 est corrélé à la réponse des tumeurs à la chimiothérapie néoadjuvante. En effet, le taux de DHA dans le tissu adipeux était plus élevé chez les patientes présentant une réponse complète ou partielle en comparaison avec les patientes n'ayant pas répondu (Taux de DHA dans le tissu adipeux des patientes ayant répondu : 0,20% contre un taux de 0,14% dans le tissu adipeux des patientes n'ayant pas répondu) (Bougnoux et al. 1999).

Cette association entre la composition en acides gras polyinsaturés de l'environnement lipidique des tumeurs et la réponse aux traitements anticancéreux, suggère qu'une

modification des taux de DHA et d'EPA dans le tissu adipeux mammaire et dans le plasma par une supplémentation alimentaire peut augmenter la sensibilité des tumeurs mammaires aux traitements.

Interventions nutritionnelles. Récemment, il a été montré que l'apport quotidien de DHA et d'EPA (sous forme de capsules) pendant 6 mois permet d'enrichir le tissu adipeux mammaire de façon significative chez 48 femmes (avec un risque de développer un cancer du sein). Par exemple, avant l'intervention nutritionnelle, le taux de DHA dans le tissu adipeux mammaires de ces femmes est de 0,21%. Six mois après l'intervention nutritionnelle, ce taux est augmenté significativement chez des femmes ayant reçu une dose quotidienne de DHA/EPA de 2,52 g/jour et est de 0,37%. Dans cette étude, aucune toxicité n'a été relevée suite à la supplémentation alimentaire en DHA/EPA (Les taux d'alanine aminotransférase sont stables et les fonctions plaquettaires ne sont pas modifiées) (Yee et al. 2010).

Dans une étude publiée en 1998, il a été rapporté que l'apport quotidien d'EPA (170 mg/jour) et de DHA (115 mg/jour) par voie orale augmentait significativement la survie de patients traités pour différents types de cancers généralisés dont le cancer du sein (Gogos et al. 1998). Plus récemment, les résultats d'une étude clinique de phase II menée par Bougnoux *et al.* chez 25 patientes traitées par chimiothérapie (à base d'anthracyclines) pour un cancer du sein hautement métastatique ont été publiés en 2009. Les patientes ont reçu 1,8 g de DHA par jour (par voie orale) pendant les 5 mois de chimiothérapie. De façon surprenante, les patientes ne présentaient pas le même taux d'incorporation du DHA (mesuré dans les phospholipides du plasma). Deux groupes ont pu être distingués : les patientes présentant une haute incorporation de DHA (augmentation du taux de DHA > 2,5 %) et les patientes avec une faible incorporation (augmentation du taux de DHA < 2,5 %). En classant les patientes selon ce facteur, Bougnoux *et al.* ont montré que le taux de survie des patientes ayant bien incorporé le DHA était augmenté (médiane du temps de survie : 34 mois) en comparaison avec l'autre groupe de patientes (médiane du temps de survie : 18 mois) (Bougnoux et al. 2009).

#### *b. Données précliniques*

Plusieurs études *in vivo* chez le rongeur ont montré que la supplémentation du régime alimentaire en AGPI n-3 (EPA et DHA), améliorait l'efficacité de la chimiothérapie ou la radiothérapie. Cette sensibilisation des tumeurs a été retrouvée dans différents modèles de

tumeurs chez le rongeur (modèles de tumeurs mammaires, du colon, la prostate et de lymphomes) (Biondo et al. 2008; Calviello et al. 2009).

Modèle animal	Modèle de tumeurs mammaires	Régime nutritionnel	Traitement	Effet du régime	Références
Rat	NMU	Huile de sardine vs Huile de sardine + Vitamine E	Epirubicine	↑ cytotoxicité épirubicine stress oxydant	Germain E, 1999
Rat	NMU	DHASCO vs huile de palme	Epirubicine	↑ efficacité épirubicine ↓ vascularisation	Colas S, 2006
Souris nude	Cellules MDA-MB-231 xénogreffées	Huile de poisson vs huile de maïs	Doxorubicine	↑ efficacité doxorubicine, stress oxydant	Hardman WE, 2001
souris athymique	cellules MX-1 xénogreffées	Huile de Menhaden vs huile de maïs	Doxorubicine / Mitomycine C	↑ oxydation des acides gras (↑ activité carnitine acyltransférase)	Borgeson CE, 1989
souris athymique	cellules MX-1 xénogreffées	Huile de Menhaden vs huile de maïs	Mitomycine C	↑ stress oxydant (↑ peroxydation lipidique)	Shao Y, 1995
souris athymique	cellules MX-1 xénogreffées	Huile de Menhaden vs huile de maïs	Cyclophosphamide	↑ effet antitumoral	Shao Y, 1997
Souris nude	Cellules MDA-MB-435 xénogreffées	Huile de Menhaden vs huile de maïs	Indométhacine	↓ métastases pulmonaires ↓ prostaglandines	Connolly JM, 1997
Souris nude	Cellules MCF-7 xénogreffées	Huile de poisson vs huile de maïs	CPT-11	↑ efficacité CPT-11, protection contre effets secondaires	Hardman WE, 1999
Rat	NMU	DHASCO vs huile de palme	Radiothérapie	↑ efficacité radiothérapie, stress oxydant	Colas S, 2004

**Tableau X : Sensibilisation des tumeurs mammaires par les AGPI n-3, données expérimentales *in vivo*.** D'après (Biondo et al. 2008; Pardini 2006). NMU (N-méthyle-nitroso-urée), CPT-11 (irinotecan).

Les études précliniques portant sur la sensibilisation des tumeurs mammaires par les AGPI n-3 sont présentées dans le tableau X. Dans des modèles de tumeurs mammaires xénogreffées chez la souris ou chimioinduites chez le rat, les AGPI n-3 apportés par différents régimes nutritionnels (DHASCO, huiles de sardine, poissons ou Menhaden) sont capables d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie (Colas et al. 2004) et de plusieurs classes d'agents chimiothérapeutiques tels que les anthracyclines (épirubicine ou doxorubicine) (Colas et al. 2006) (Germain et al. 1999) (Hardman et al. 2001), les agents alkylants (mitomycine C ou cyclophosphamide) (Shao et al. 1995) (Shao et al. 1997), ou encore les inhibiteurs de topoisomérase I (CPT-11) (Hardman et al. 1999).

### c. Données expérimentales *in vitro*

Un enrichissement en AGPI n-3 augmente la sensibilité de plusieurs types de cellules cancéreuses (mammaires, du côlon, du poumon, de glioblastomes, de neuroblastomes) à différents agents anticancéreux (anthracyclines, paclitaxel, docétaxel, 5-FU, mitomycine, trioxide arsenic) (Pardini 2006) (Biondo et al. 2008).

Parmi les différents AGPI testés, le DHA est apparu comme étant le plus efficace pour augmenter la sensibilité des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 aux anthracyclines (Germain et al. 1998). Cet effet sensibilisant est sélectif et ne concerne pas toutes les lignées tumorales mammaires. Alors qu'il augmente la sensibilité des cellules MDA-MB-231, le DHA n'influe pas sur la sensibilité des MCF-7 à la doxorubicine (Vibet et al. 2008).

L'effet cytotoxique du paclitaxel et du docétaxel (taxanes) est également augmenté lorsque les cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 (Menendez et al. 2005) et MCF-7 (Wang et al. 2007) sont enrichies en AGPI n-3.

Enfin, un enrichissement en AGPI n-3 (EPA et DHA) restaure la sensibilité des cellules tumorales mammaires MFC-7 résistantes au tamoxifène (DeGraffenried et al. 2003) et des cellules SKBR3 résistantes au trioxyde d'arsenic (Baumgartner et al. 2004).

*d. Les AGPI n-3 augmentent-ils la toxicité de la chimiothérapie au niveau des tissus sains ?*

Si la sensibilisation des cellules tumorales aux agents anticancéreux par les AGPI n-3 présente un bénéfice pour le traitement des tumeurs, il est important de prendre en compte la sensibilité des cellules et tissus normaux. Plusieurs études menées *in vivo* et *in vitro* n'ont pas montré d'augmentation de la sensibilité aux traitements des cellules et tissus sains après leur exposition aux AGPI n-3. Par exemple, la supplémentation en DHA et EPA de cellules normales *in vitro* (cellules endothéliales, macrophages, cellules mononuclées humaines et fibroblastes humains, murins et de rats) n'augmente pas leur sensibilité au trioxyde d'arsenic (Baumgartner et al. 2004), à la mytomicine C (Tsai et al. 1997) ou encore à la doxorubicine (Pardini 2006). Un effet protecteur des AGPI n-3 vis-à-vis du stress oxydant a également été rapporté au niveau des cellules normales puisqu'une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes (telles que la glutathion peroxydase) a été observée (Lemaitre et al. 1997) (Crosby et al. 1996).

Autre exemple, les anthracyclines ont pour effet secondaire majeur une toxicité cardiaque. *In vivo*, il a été mis en évidence que cette toxicité n'est pas augmentée lorsque l'alimentation des rongeurs est supplémentée en AGPI n-3 (Germain et al. 2003; Germain et al. 1999). De même, une diminution de la toxicité exercée par le CPT-11 (Hardman et al. 1999) (Xue et al. 2007), le 5-FU (Gomez de Segura et al. 2004) et le méthotrexate (Horie et al. 1998) sur les muqueuses intestinales a été observée.

Enfin, au cours de l'étude clinique de phase II citée précédemment, il a été observé une diminution de l'anémie et de la thrombopénie induite par la chimiothérapie chez les patientes ayant un fort taux d'incorporation de DHA (Bougnoux et al. 2009).

## 2. Mécanismes d'action des AGPI n-3 au niveau des cellules tumorales.

La compréhension des mécanismes impliqués dans les effets sensibilisants des AGPI n-3 aux traitements anticancéreux doit prendre en compte les effets propres des acides gras polyinsaturés sur le fonctionnement des cellules.

### *a. Modification de la structure et de la fluidité membranaire ; modification du captage des agents anticancéreux*

La structure des AGPI n-3, notamment l'existence des doubles liaisons, leur confère une certaine flexibilité conformationnelle. Une fois incorporés au niveau des phospholipides membranaires, les AGPI n-3 modifient les propriétés physiques et fonctionnelles des membranes cellulaires augmentant leur fluidité *in vivo* et *in vitro* (Biondo et al. 2008). Cette modification de la fluidité membranaire augmente le captage (qui s'effectue par diffusion passive) et l'efficacité de certaines molécules anticancéreuses hydrophobes telles que la doxorubicine (Abulrob et al. 2000), la vincristine (Ikushima et al. 1991) ou encore la mitoxantrone (Vibet et al. 2007).

Il a également été rapporté que l'augmentation du captage des molécules anticancéreuses était due aux effets des AGPI n-3 sur les transporteurs membranaires. Dans le cas du méthotrexate (agent anticancéreux de la famille des antimétabolites), l'augmentation du taux d'insaturations dans les membranes des cellules leucémiques murines (L1210) après l'incorporation des AGPI n-3, améliore l'affinité du transporteur pour l'agent anticancéreux (Burns et al. 1979). Dans le même modèle cellulaire, la supplémentation en DHA et EPA des cellules, a permis une augmentation du transport des purines par leurs transporteurs spécifiques (Martin and Meckling-Gill 1996).

### *b. Modification du stress oxydant*

**Augmentation de la peroxydation lipidique.** Cette réaction est initiée par le retrait d'un atome d'hydrogène au niveau des acides gras insaturés par les espèces réactives de l'oxygène. Le radical d'acide gras ainsi formé réagit avec une molécule d'O<sub>2</sub> et forme un radical peroxy lui-même capable de réagir avec un autre acide gras, permettant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire. La peroxydation lipidique conduit à la formation d'aldéhydes (tels que le malondialdéhyde ou le 4-hydroxynonéal) qui présentent une forte réactivité vis-à-vis des protéines, des phospholipides et de l'ADN. Les effets majeurs de ces produits sont l'inhibition de la synthèse d'ADN, de la division cellulaire et l'induction de la mort des cellules tumorales (Biondo et al. 2008).

Outre leur action inhibitrice des topoisomérases, les anthracyclines induisent un stress oxydant en produisant des radicaux libres. Ces derniers peuvent favoriser l'action cytotoxique de la drogue en entraînant la mort de la cellule tumorale par apoptose (Malhotra and Perry 2003). Deux études *in vivo* ont montré que la sensibilisation aux anthracyclines des tumeurs mammaires de rat par les AGPI n-3 impliquait le stress oxydant (Colas et al. 2006; Germain et al. 1999). En effet, cette sensibilisation est annulée lorsque de la vitamine E (antioxydant) est ajoutée au régime alimentaire (Colas et al. 2006). A l'inverse, elle est augmentée par l'ajout de molécules pro-oxydantes (Germain et al. 1999).

Cette relation entre les AGPI n-3 et le stress oxydant a également été retrouvée *in vitro*. En effet, la sensibilisation à la doxorubicine des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 est annulée par l'ajout d'antioxydants (tels que l' $\alpha$ -tocophérol) et augmentée par l'ajout d'agents pro-oxydants (ménadione couplé à l'ascorbate de sodium) (Germain et al. 1998). Les AGPI n-3, et particulièrement ceux à longue chaîne, sont une cible idéale des radicaux libres produit par les anthracyclines du fait de leurs nombreuses insaturations. La sensibilisation des cellules tumorales mammaires augmente avec le nombre d'insaturations des acides gras polyinsaturés. En effet, le DHA, acide gras le plus peroxydable (6 doubles liaisons), entraîne la plus forte réponse des MDA-MB-231 à la doxorubicine (Germain et al. 1998).

Ainsi les AGPI n-3, après leur incorporation membranaire, potentialisent l'effet des anthracyclines en augmentant la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives de l'oxygène.

***Diminution des défenses antioxydantes.*** Il est connu que contrairement aux cellules normales, les défenses antioxydantes (telles que l'enzyme superoxyde dismutase à manganèse) de certaines cellules tumorales sont diminuées (Oberley 2002). La sensibilisation par le DHA des cellules tumorales MDA-MB-231 à la doxorubicine est accompagnée d'une augmentation des marqueurs de stress oxydant tels que les espèces réactives de l'oxygène (Vibet et al. 2008), le malondialdéhyde (produit de lipoperoxydation), le glutathion (utilisé pour détoxifier la cellule en cas de stress oxydant) et les hydroperoxydes lipidiques (Maheo et al. 2005) (Germain et al. 1998). De plus, il a été montré que les DHA diminuaient l'activité de la glutathion peroxydase (enzyme antioxydante qui élimine les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques) (Vibet et al. 2008) (Ding and Lind 2007) et de la superoxyde dismutase à manganèse (Ding et al. 2004). Dans les MCF-7, cellules dont la sensibilité à la doxorubicine n'est pas augmentée par le DHA, ces marqueurs ne sont pas augmentés (Maheo et al. 2005). De plus, il a été montré que, contrairement aux cellules tumorales, le DHA augmente l'activité de la glutathion peroxydase dans les cellules normales (plaquettes et cellules endothéliales) (Lemaitre et al. 1997) (Crosby et al. 1996). Ces études suggèrent que les AGPI n-3 sensibilisent certaines cellules tumorales aux traitements anticancéreux en diminuant leurs défenses antioxydantes.

Cette action du DHA a également été observée *in vivo* chez le rongeur. En effet, l'augmentation de l'efficacité de la doxorubicine envers les tumeurs mammaires par les AGPI n-3 (DHA/EPA) alimentaires est associée à une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase-1 (Vibet et al. 2008) et à une diminution du rapport de l'activité glutathion peroxydase /superoxyde dismutase (indicateur du stress oxydant) (Hardman et al. 2001).

### *c. Modification de la signalisation cellulaire.*

Il existe au sein des membranes cellulaires des microdomaines membranaires connus sous le nom de rafts lipidiques dont font partie les cavéoles. Il a été décrit que l'incorporation des AGPI n-3 au sein de la membrane plasmique pouvait modifier la structure de ces cavéoles (Stillwell et al. 2005) (Schmitz and Grandl 2008). Ces dernières renferment un grand nombre de protéines (telles que eNOS ou Ras), de transporteurs et de récepteurs (tels que EGFR, VEGFR) impliqués dans la signalisation cellulaire. Ainsi, l'augmentation de l'incorporation des AGPI n-3 dans les membranes peut modifier la fonction de ces différentes protéines et de ce fait modifier la signalisation cellulaire (Ma et al. 2004).

**Signalisation de EGFR et Her-2/neu (EGFR-2).** EGFR-1 et Her-2 sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'EGF. L'enrichissement en DHA de trois types de cellules tumorales (colon, sein, poumons) diminue le niveau de EGFR-1 présent dans les rafts lipidiques (Rogers et al. 2010). Cette diminution est associée à une augmentation de la quantité totale des récepteurs phosphorylés dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 (Schley et al. 2007). Cette phosphorylation de EGFR a été associée à l'activation de la P38 MAPK, protéine impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules. Une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des MDA-MB-231 a en effet été observée après enrichissement des cellules en EPA et DHA (Schley et al. 2005).

La surexpression de Her-2/neu est retrouvée dans de nombreux cancer et est associée à un mauvais pronostic (Nicholson et al. 2001). De plus, la diminution de son expression sensibilise les cellules tumorales aux taxanes (Ueno et al. 1997; Yu et al. 1998). *In vitro*, les AGPI n-3 sensibilisent les cellules tumorales MDA-MB-231 aux taxanes (paclitaxel et docétaxel) (Menendez et al. 2001) et diminuent de l'expression de Her-2/neu (Menendez et al. 2005).

**Signalisation de PI3K/AKT.** La voie de signalisation PI3K/AKT joue un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Elle promeut la prolifération, la croissance, la différenciation et la survie cellulaire (Manning and Cantley 2007) (Franke 2008). Cette voie de signalisation est souvent suractivée dans de nombreux cancers (Nicholson and Anderson 2002) et la surexpression d'AKT est souvent liée à la résistance des cellules tumorales à la doxorubicine (Clark et al. 2002), aux taxanes (Vara et al. 2004) et au tamoxifène (DeGraffenried et al. 2003). L'inhibition de cette voie de signalisation par différents inhibiteurs augmente la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie (Clark et al. 2002) (Krystal et al. 2002) (Van Meter et al. 2006). Il a été montré que les AGPI n-3 inhibent la prolifération des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 (Schley et al. 2005) et sensibilisent les MCF-7 au tamoxifène (DeGraffenried et al. 2003). Dans ces deux études, l'effet des AGPI n-3 (DHA et EPA) a été associé à une diminution de la phosphorylation d'AKT (Schley et al. 2005) et de son activité (DeGraffenried et al. 2003). Récemment, une étude a montré que le DHA et l'EPA diminuaient l'activité de PI3K et d'AKT dans un modèle de tumeurs mammaires chez la souris (Ghosh-Choudhury et al. 2009). Dans cette même étude, une augmentation de l'expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*, antagoniste de l'activité de PI3K) et de l'apoptose (activation de la caspase-

3 et inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL) a été observée dans les cellules MDA-MB-231 en culture (Ghosh-Choudhury et al. 2009).

**Signalisation de Ras.** L'activation constitutive de la voie de signalisation de Ras joue un rôle majeur dans le développement et la progression tumorale (croissance, différenciation) (Seo et al. 2006) et est associée à la survie et à la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Plusieurs études ont rapportés que les AGPI n-3 pouvaient interagir avec cette voie de signalisation. La localisation de Ras au niveau des membranes étant nécessaire à son activation (Ma et al. 2004), un blocage par les AGPI n-3 de la translocation de cette protéine au niveau des membranes plasmique par l'inhibition de la farnesyl-transférase (Singh et al. 1998) aboutit à une inhibition de son activation (Seo et al. 2006) (Ma et al. 2004). L'inhibition de la voie de signalisation de Ras dans un modèle de cancer du colon chez la souris a été associée à un effet antitumoral des AGPI n-3 (Singh et al. 1997; Singh et al. 1998).

#### *d. Régulation de facteurs de transcription (PPAR, NF- $\kappa$ B)*

Les AGPI n-3 modulent l'expression de certains gènes notamment en régulant des facteurs de transcription comme par exemple les PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) et le NF- $\kappa$ B (Guesnet 2005).

**PPAR.** Le premier facteur de transcription qui a été identifié comme étant régulé par les AGPI est le PPAR $\alpha$  (Jump 2002), membre de la famille des PPAR comprenant également les membres PPAR $\beta$  (aussi mentionné comme PPAR $\delta$ ) et PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  fixe l'acide linoléique (18:2 n-6), l'acide alpha linoléique (18:3 n-3), l'acide arachidonique (20:4 n-6) et l'EPA (20:5 n-3) (Houseknecht et al. 2002). PPAR $\alpha$  peut lier plusieurs types d'acides gras (saturés ou polyinsaturés) comme l'acide palmitique, l'acide oléique (18:1 n-9), l'acide linoléique, l'acide arachidonique et l'EPA (Larsson et al. 2004). Pour finir, PPAR $\beta$  va lier l'acide palmitique, (16:0) l'acide dihomog-linoléique (18:3 n-6), l'acide arachidonique et l'EPA (Berger and Moller 2002).

Ces facteurs sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique, dans la prolifération et la différenciation cellulaires et dans l'inflammation (Grimaldi 2001). Activés par leurs ligands, les PPAR s'hétérodimérisent et se lient à des éléments de réponse situés au niveau des promoteurs des gènes cibles, les PPRE (élément de réponse aux PPAR) (Bardon et al. 2005). PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont également connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires

(Larsson et al. 2004). Actuellement, le rôle des PPAR dans le cancer du sein reste controversé. En effet, il a été montré que l'activation de PPAR $\gamma$  par un ligand synthétique induit l'apoptose et inhibe la prolifération de cellules cancéreuses mammaires (MCF-7 et MDA-MB-231) ainsi que la croissance de tumeurs mammaires xénogreffées chez la souris (Elstner et al. 1998). A l'inverse chez des souris transgéniques, la surexpression constitutive de PPAR $\gamma$  dans le tissu mammaire est associée à une augmentation de la croissance tumorale (Koeffler 2003). Le rôle des PPAR dans le cancer reste encore à être éclairci.

**NF- $\kappa$ B.** Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance, la prolifération, l'adhésion et la différenciation cellulaire et des tumeurs (Bharti and Aggarwal 2002; Garg et al. 2003; Yeh et al. 2003). L'inhibition de NF- $\kappa$ B par une augmentation du gène represser I $\kappa$ B $\alpha$ , augmente l'apoptose des cellules tumorales induite par divers agents anticancéreux en induisant. Ceci indique que NF- $\kappa$ B contribue à la chimiorésistance en induisant la résistance des cellules tumorales à l'apoptose (Bharti and Aggarwal 2002; Garg et al. 2003; Yeh et al. 2003). De plus, il est connu que NF- $\kappa$ B augmente l'expression de la glycoprotéine-P (Pgp, récepteur transmembranaire de la famille des transporteurs ABC) (Bentires-Alj et al. 2003) (Zhou and Kuo 1997), contribuant ainsi au phénotype « multi-drogue résistant » (Lee et al. 2007). Chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, cette surexpression de NF- $\kappa$ B, a été associée à une efficacité diminuée de la chimiothérapie (Montagut et al. 2006). Il a été montré que les AGPI n-3, en diminuant l'activité et l'expression de ce facteur de transcription, inhibent l'activation de la protéine AKT et de ce fait induisent l'apoptose des cellules MDA-MB-231 (Schley et al. 2005).

#### *e. Modification de la production des eicosanoïdes*

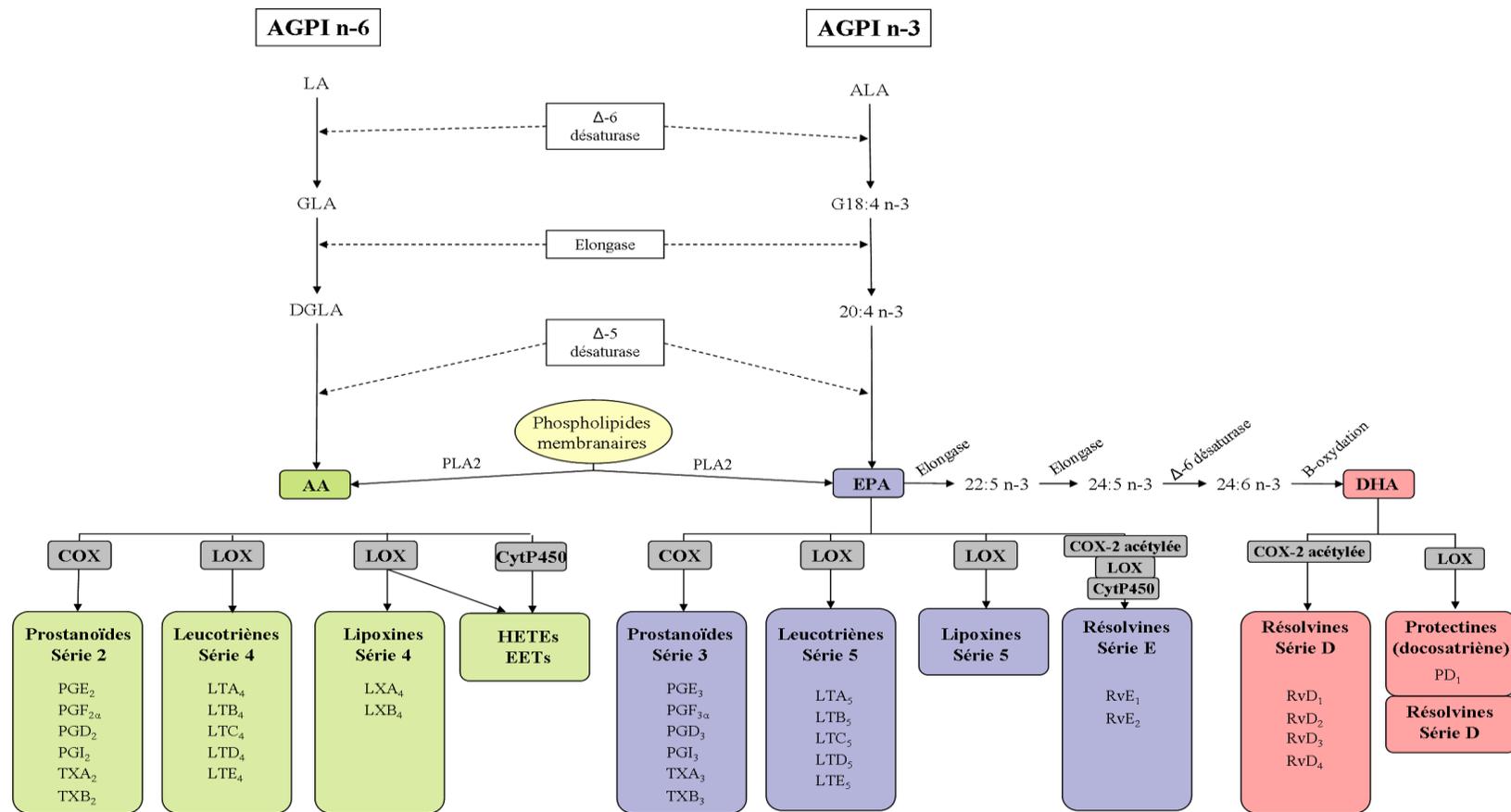
Les eicosanoïdes sont une famille de médiateurs lipidiques dérivés des AGPI n-3 et n-6 et composés de 20 atomes de carbones (*eicosa* = 20). Ces molécules sont très actives biologiquement et présentent des activités très diversifiées. Ce sont des médiateurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire qui peuvent jouer un rôle dans l'agrégation des plaquettes, la croissance et la différenciation cellulaire. Les acides gras précurseurs de la formation des eicosanoïdes sont, l'acide arachidonique (20:4 n-6), l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3) (figure 29).

Ces acides gras sont libérés des membranes plasmiques par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), puis servent de substrats à 3 classes d'enzymes à l'origine de la synthèse des eicosanoïdes (Larsson et al. 2004) (Greene et al. 2011).

✓ Les cyclooxygénases (Cox). Ces enzymes catalysent la production des prostanoïdes des séries 2 et 3, parmi lesquelles on trouve les prostaglandines (PG), les prostacyclines (PGI), et les thromboxanes (TX). Il existe de 2 formes de cyclooxygénases. L'isoforme COX-1 est exprimée de façon constitutive dans divers tissus et permet le maintien d'un niveau basal de prostanoïdes et joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire. A l'inverse, l'isoforme COX-2, faiblement exprimée dans certains tissus normaux (tels que les muqueuses intestinales) (Dubois et al. 1998), est induite rapidement lors de processus inflammatoires et au cours de la progression tumorale (Wang and Dubois 2010). L'isoforme 2 de la cyclooxygénase peut être acétylée de manière irréversible par l'aspirine (Serhan et al. 2004). L'enzyme COX-2 acétylée permet la synthèse des résolvines de série E et D (figure 29).

✓ Les lipoxygénases (Lox). Elles catalysent la biosynthèse des leucotriènes (LT) et des lipoxines (LX) des séries 4 et 5 ainsi que la synthèse des acides gras hydroxylés (HETE).

✓ Les cytochromes P450 monooxygénases. Ils génèrent des acides gras hydroxylés (HETE) et époxylés (EET). Ces enzymes sont également impliquées dans la synthèse des résolvines de la série E.



**Figure 29 : Biosynthèse des eicosanoïdes dérivés des AGPI n-6 et des AGPI n-3.**

(D'après (Greene et al. 2011; Larsson et al. 2004)). Après conversion de l'acide linoléique et de l'acide  $\alpha$ -linoléique en acide arachidonique et EPA, on assiste à la formation de deux types d'eicosanoïdes par les enzymes cyclooxygénase et lipoxygénase. Les eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique sont des prostanoides de la série 2 et des leucotriènes et lipoxines de la série 4 (c'est-à-dire, qui possèdent 2 et 4 doubles liaisons respectivement). Les eicosanoïdes dérivés de l'EPA sont des prostanoides de la série 3, des leucotriènes de la série 5 et des lipoxines. Plus récemment, il a été découvert une nouvelle famille d'eicosanoïdes dérivés de l'EPA et du DHA : les résolvines et protectines. Abréviations. LA (acide linoléique), ALA (acide  $\alpha$ -linoléique), GLA (acide  $\gamma$ -linoléique), DGLA (acide dihomogamma-linoléique), AA (acide arachidonique), EPA (acide eicosapentaénoïque), DHA (acide docosahexaénoïque), COX (cyclooxygénase), LOX (lipoxygénase), CytP450 (cytochromes P450 monooxygénases), COX-2 acétylée (COX-2 acétylée par l'aspirine), PG (prostaglandines), PGI (prostacyclines), TX (thromboxanes), LT (leucotriènes), LX (lipoxines), RvE (résolvines série E), RvD (résolvines série D), PD (protectine ou docosatriène), HETEs (acides gras hydroxylés), EETs (acides gras époxylés).

### ***Synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique et leurs rôles dans le cancer.***

Les enzymes responsables de la synthèse de ces eicosanoïdes sont décrites pour être impliquées dans le cancer. En effet, une surexpression de la cyclooxygénase-2, rapportée dans de nombreux cancers tels que les cancers colorectaux, de l'estomac, de l'œsophage, du foie, des poumons, de la prostate et du sein, est associée à une diminution du taux de survie des patients (de Groot et al. 2007). De plus, les lipoxygénases exprimées chez les humains, 5-LOX, 12-LOX, et 15-LOX sont impliquées dans la progression de plusieurs types de tumeurs (poumons, prostate, colon et sein pour 5-LOX ; ovarien pour 12-LOX ; lymphome de Hodgkins et cancer colorectal pour 15-LOX) (Greene et al. 2011).

L'AGPI majoritairement présent dans les membranes cellulaires étant l'acide arachidonique, la plupart des eicosanoïdes produits sont des prostanoides dits de la série 2 (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub>), des leucotriènes (LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) et des lipoxines (LXA<sub>4</sub>, LXB<sub>4</sub>) de la série 4, comportant respectivement 2 et 4 doubles liaisons (Larsson et al. 2004) (figure 29). Ces eicosanoïdes présentent des effets pro-inflammatoires et jouent un rôle dans le cancer. Par exemple, la PGE<sub>2</sub> est la prostaglandine la plus retrouvée dans les cancers humains (colon, sein, poumon) et promeut la croissance et l'angiogenèse tumorale (Greene et al. 2011). Le leucotriène LTB<sub>4</sub>, plus exprimé dans les tissus tumoraux que dans les tissus périphériques à la tumeur (Larre et al. 2008), peut promouvoir la croissance tumorale en inhibant l'apoptose (Hennig et al. 2004). L'acide gras hydroxylés 5-HETE stimule la prolifération des cellules cancéreuses et inhibe leur apoptose (Ghosh and Myers 1997; Ghosh and Myers 1998). Enfin, l'acide gras hydroxylés 12-HETE présente un rôle inducteur de l'angiogenèse, de la survie et de la prolifération cellulaire (Rose and Connolly 1999b).

### ***Inhibition de la synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique par les AGPI n-3.***

Les phospholipases libèrent les AGPI des phospholipides de manière indépendante de la famille (n-3 ou n-6) à laquelle ils appartiennent. Ainsi, un enrichissement des membranes en AGPI n-3 peut diminuer la synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique (Calviello et al. 2009). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montrés que les AGPI n-3 entraînent en compétition avec les AGPI n-6 à plusieurs niveaux :

*i)* Une supplémentation en AGPI n-3 diminue la disponibilité de l'acide arachidonique en le remplaçant partiellement dans les membranes (Larsson et al. 2004). Cette substitution est à l'origine de la diminution de la synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique au profit de ceux dérivés de l'EPA et du DHA.

*ii)* L'acide  $\alpha$ -linoléique entre en compétition avec l'acide linoléique pour les désaturases ( $\Delta$ -6 et  $\Delta$ -5) et l'élongase (Figure 29 haut). De plus, les AGPI n-3 présentent une meilleure affinité pour ces enzymes, ainsi, ils diminuent la désaturation et l'élongation de l'acide linoléique en acide arachidonique (Rose and Connolly 1999) et par conséquent, diminuent la synthèse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique.

*iii)* Les AGPI n-3 sont compétitifs avec les AGPI n-6 vis-à-vis de la production d'eicosanoïdes par les cyclooxygénases (Bardon et al. 2005). En comparaison avec l'acide arachidonique, l'EPA est un substrat préférentiel des lipoxygénases (Grimm et al. 2002).

*iv)* Les AGPI n-3 inhibent l'expression de la COX-2, ce qui aboutit à la diminution de la prostaglandine PGE<sub>2</sub> (impliquée dans la croissance et l'angiogenèse tumorale) (Calviello et al. 2004).

### ***Les eicosanoïdes dérivés des AGPI n-3.***

A l'inverse des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, ceux dérivés des AGPI n-3 présentent des propriétés anti-inflammatoires. L'EPA conduit à la formation de prostanoïdes de la série 3 (PGE<sub>3</sub>), de leucotriènes de la série 5 (LTB<sub>5</sub>, LTE<sub>5</sub>) et de lipoxines de la série 5 (Calder 2006) (figure 29). Récemment, l'équipe de Serhan *et al.* a mis en évidence l'existence d'une nouvelle famille de médiateurs lipidiques dérivés des AGPI n-3 (EPA et DHA) qui contribuent à la diminution de l'inflammation et à la neuroprotection (Serhan et al. 2004). Il s'agit des **résolvines** et des **protectines** qui sont synthétisées par les enzymes lipoxygénases, la cyclooxygénase acétylée et les cytochromes P450. Les résolvines dérivées de l'EPA sont nommées résolvines de série E (RvE) et comprennent les RvE1 et RvE2. Les résolvines dérivées du DHA sont les résolvines de série D (RvD) et comprennent les RvD1, RvD2, RvD3 et RvD4. Ces molécules, synthétisées au cours du processus inflammatoire, permettent le retour à l'homéostasie des tissus en diminuant l'infiltration et l'activation (induite par NF- $\kappa$ B et l'anion superoxyde) des leucocytes polynucléaires (Levy 2010). Les **protectines**, aussi connues sous le nom de docosatriènes, sont **dérivées du DHA** et nommées PD1 (Figure 29). Plusieurs types cellulaires participent à la biosynthèse des

protectines telle que les cellules microgliales et les cellules mononucléaires humaines. Les protectines, tout comme les résolvines, possèdent des propriétés immunorégulatrices puisqu'elles jouent le rôle de molécules anti-inflammatoires (Ariel and Serhan 2007).

A l'heure actuelle, le rôle de ces eicosanoïdes dans les actions anti-tumorales des AGPI n-3 n'est pas encore connu.

### 3. Mécanismes d'action des AGPI au niveau des cellules endothéliales

L'action anti-tumorale des AGPI n-3 peut également être expliquée par leur potentiel anti-angiogénique. Des études *in vitro* ont montré que les AGPI n-3 diminuaient la migration et la formation de pseudocapillaires par des cellules endothéliales humaines (Tsuzuki et al. 2007) et bovines (Tsuji et al. 2003; Yang et al. 1998). Cette inhibition était associée à une diminution *in vitro* de la synthèse de MMP<sub>2</sub> et des ARNm de la MMP<sub>9</sub>, enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux (Tsuzuki et al. 2007). Une autre étude a montré que le DHA induisait l'apoptose des cellules endothéliales en prolifération (Kim et al. 2005). Dans un modèle de tumeurs mammaires chez la souris, une supplémentation du régime alimentaire en huile de Menhaden (contenant 20% d'AGPI n-3) inhibe la croissance tumorale et diminue significativement la surface vasculaire (Mukutmoni-Norris et al. 2000). De plus, au laboratoire, dans un modèle de tumeurs mammaires chimioinduites chez le rat, la régression tumorale observée chez les animaux nourris avec le régime enrichi en AGPI n-3 a été associé à une diminution de la vascularisation avant et pendant la chimiothérapie (Colas et al. 2006).

Les mécanismes par lesquelles les AGPI n-3 diminuent l'angiogénèse restent encore à clarifier mais plusieurs études ont permis d'éclaircir quelques uns de ces mécanismes. Une des cibles des AGPI n-3 est la voie de signalisation VEGF/VEGFR-2/AKT/NO. En effet, il a été rapporté que l'expression du récepteur au VEGF, le VEGFR-2 était diminuée dans les cellules endothéliales en culture enrichies en AGPI n-3 (Mukutmoni-Norris et al. 2000; Sterescu et al. 2006; Tsuji et al. 2003; Yang et al. 1998). Une étude menée *in vivo* a quant-à elle montré que les AGPI n-3 diminuaient les niveaux d'ARNm du VEGF-A (Tevar et al. 2002). La phosphorylation d'AKT est également diminuée par les AGPI n-3 dans les cellules endothéliales. Cette diminution est associée à une induction de l'apoptose via l'activation de

la caspase-3 (Schaefer et al. 2008). Enfin, plusieurs études ont rapporté que les AGPI n-3, et notamment le DHA, pouvaient inhiber la synthèse de NO *in vivo* et *in vitro*. En effet, la synthèse de NO par les cellules du microenvironnement tumoral (macrophages) est diminuée lorsque les cellules sont enrichies en AGPI n-3 (Jeyarajah et al. 1999; Komatsu et al. 2003). Par ailleurs, une diminution de la phosphorylation (Ser1177) et de l'activité de la eNOS a été associée à une modification de la composition des cavéoles après incorporation des AGPI n-3 dans les membranes (Gousset-Dupont et al. 2007) (Couloubaly et al. 2007). Ainsi, la diminution de la synthèse de NO par les AGPI n-3 peut expliquer leurs effets anti-angiogénique. Cependant, les résultats concernant la modulation de la eNOS par les AGPI n-3 restent contradictoires. *In vitro*, une augmentation de la phosphorylation de la eNOS par le DHA a été observée dans un modèle de cellules endothéliales humaine (Stebbins et al. 2008).

Comme nous l'avons vu précédemment, les AGPI n-3 entraînent une diminution de la synthèse d'eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique. Or, certains de ces eicosanoïdes sont connus pour leurs propriétés pro-angiogéniques (Greene et al. 2011). L'EPA et le DHA diminuent *in vitro* l'expression de COX-2, de la PGE<sub>2</sub>, prostaglandine décrite pour induire la synthèse de VEGF (Dannenberget al. 2005; Wang and Dubois 2010) et du 12-HETE. Ceci est associée à une diminution de l'expression du VEGF (Calviello et al. 2004), et à une inhibition de l'angiogenèse et du volume des tumeurs du colon (Calviello et al. 2004) et des tumeurs mammaires (Rose and Connolly 1999b) chez la souris.

*Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux modifications de la vascularisation induites par les AGPI n-3 afin de déterminer quelle est leur implication dans la sensibilisation des tumeurs mammaires au docétaxel.*

## Objectifs de la thèse

*Les objectifs de cette thèse ont été établis à partir de précédents travaux menés au sein de notre laboratoire. Dans cette partie, nous verrons les résultats obtenus au cours de ces travaux qui nous ont permis de définir les différents axes de recherche qui ont orienté cette thèse.*

## I. Travaux précédents à la thèse

Lors de deux précédentes études menées au laboratoire, il a été montré que les acides gras oméga-3 (AGPI n-3) 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).

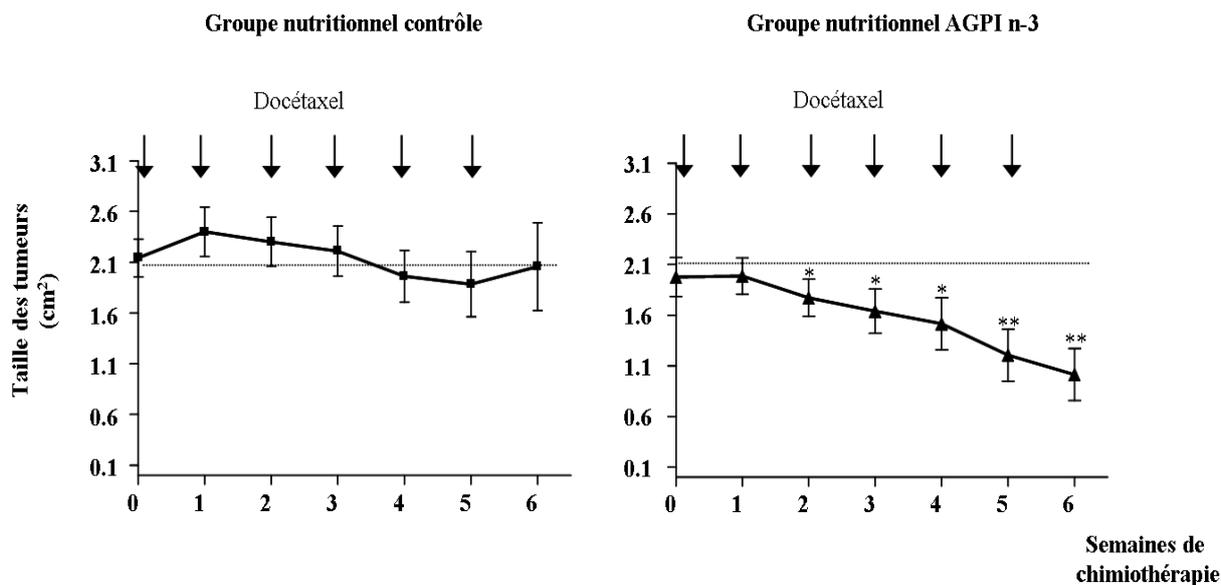
Une troisième expérimentation a montré que les AGPI n-3 apportés par l'alimentation augmentaient la sensibilité des tumeurs à un autre agent chimiothérapeutique appartenant à la classe des taxanes : le docétaxel. Dans cette étude, les animaux étaient séparés en deux groupes nutritionnels (un groupe contrôle et un groupe AGPI n-3). L'incorporation des AGPI n-3, apportés par l'alimentation, avaient été contrôlée par l'analyse de la composition en acide gras des phospholipides des tumeurs. Le tableau XI montre un enrichissement de 2,5 fois des taux d'AGPI n-3 ( $p < 0,001$ ) dont une augmentation de 1,7 fois des taux de DHA (22:6 n-3,  $p < 0,001$ ) dans le groupe nutritionnel AGPI n-3 en comparaison du groupe nutritionnel contrôle. Alors que l'EPA (20:5 n-3) n'était pas détecté dans le groupe nutritionnel contrôle, le régime alimentaire enrichi en AGPI n-3 avait conduit à la présence de  $1,1 \pm 0,15$  % d'EPA dans les phospholipides. Le régime enrichi en AGPI n-3 montrait une diminution de 25 % des AGPI n-6 ( $p < 0,001$ ). Aucune différence entre les deux groupes n'avait été observée pour les acides gras saturés.

<b>Acides Gras</b>	Régime contrôle	Régime AGPI n-3	Statistiques
<b>Saturés</b>			
16:0	22,27 ± 0,36	22,14 ± 0,53	NS
18:0	14,74 ± 0,42	14,67 ± 0,41	NS
<b>TOTAL</b>	<b>40,85 ± 0,23</b>	<b>40,80 ± 0,58</b>	<b>NS</b>
<b>Monoinsaturés</b>			
16:1	0,78 ± 0,06	1,02 ± 0,10	*
18:1n-9c	13,88 ± 0,41	16,64 ± 0,60	**
<b>TOTAL</b>	<b>22,19 ± 0,52</b>	<b>25,07 ± 0,78</b>	<b>*</b>
<b>AGPI n-6</b>			
18:2n-6c	3,28 ± 0,20	4,23 ± 0,72	*
20:3n-6	0,60 ± 0,04	1,00 ± 0,09	**
20:4n-6	17,11 ± 0,62	11,27 ± 0,81	***
<b>TOTAL</b>	<b>24,38 ± 0,75</b>	<b>18,18 ± 0,84</b>	<b>***</b>
<b>AGPI n-3</b>			
20:5n-3	0,03 ± 0,01	1,06 ± 0,15	***
22:6n-3	1,74 ± 0,05	2,94 ± 0,08	***
<b>TOTAL</b>	<b>1,99 ± 0,05</b>	<b>5,05 ± 0,27</b>	<b>***</b>

**Tableau XI : Composition en acides gras des phospholipides des tumeurs de rats nourris avec un régime contrôle ou un régime enrichi en AGPI n-3.**

Les acides gras ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse. La surface des pics obtenus pour chaque acide gras est exprimée en pourcentage de la surface totale des pics. Moyenne ± SEM n = 8 rates dans chaque groupe. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

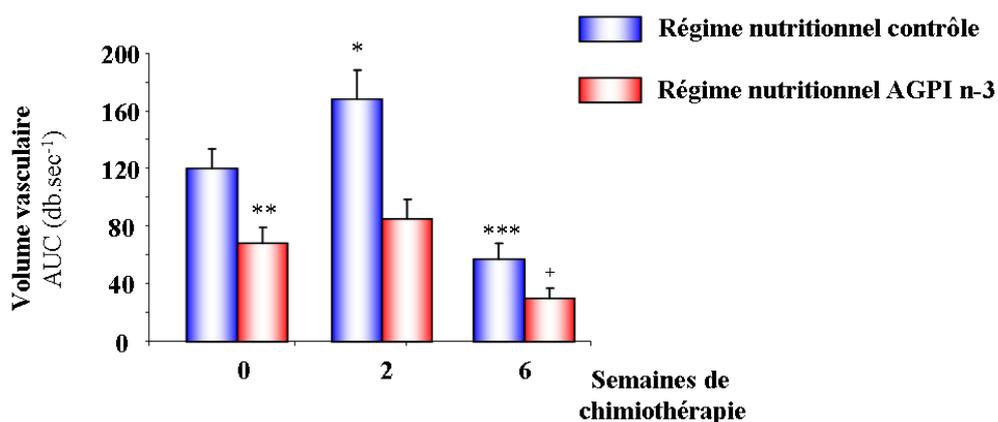
Lorsque la taille des tumeurs atteignaient 2 cm<sup>2</sup>, les rats avaient reçu une injection de docétaxel (ip 6 mg/kg) chaque semaine pendant 6 semaines. La figure 30 montre les courbes d'évolution de la taille des tumeurs dans les deux groupes nutritionnels au cours des semaines de chimiothérapie. Alors que l'on assistait à une stagnation de la taille des tumeurs dans le groupe contrôle, les tumeurs du groupe AGPI n-3 régressaient de façon importante. En effet, dès 2 semaines de chimiothérapie, il avait été observé un début de régression tumorale de 10 % (p < 0,05). En fin de traitement les tumeurs avaient régressé de 50 % (p < 0,01).



**Figure 30 : Les AGPI n-3 augmentent la sensibilité des tumeurs au docétaxel (gauche : groupe nutritionnel contrôle ; droite : groupe nutritionnel AGPI n-3).**

Lorsque les tumeurs atteignaient 2 cm<sup>2</sup>, les rates recevaient une injection de docétaxel à 6mg/kg/semaine pendant 6 semaines (injections représentées par des flèches). Chaque point représente la moyenne de la taille des tumeurs  $\pm$ SEM (n=21 dans chaque groupe). \* p <0,05 et \*\* p <0,01, ANOVA pour mesures répétées suivi d'un test de FISHER LSD permettant de faire apparaître la significativité des différences observées entre les deux groupes nutritionnels si elles existent.

Au cours de cette étude, la densité et le volume vasculaires avaient été quantifiés respectivement par échographie Doppler puissance et par échographie avec agent de contraste (Sonovue®). Il est apparu que les AGPI n-3 entraînaient une diminution de la vascularisation des tumeurs mammaires, et ce avant même le début de la chimiothérapie. Les AGPI n-3 peuvent donc être considérés comme des molécules ayant des propriétés anti-angiogéniques. Avant le début de la chimiothérapie, le volume vasculaire était diminué de 40% dans le groupe AGPI n-3 (Figure 31, p < 0,01) en comparaison du groupe contrôle. Au cours de la chimiothérapie le docétaxel a agi différemment sur la vascularisation en fonction du temps d'application. A 2 semaines, le docétaxel a entraîné une augmentation du volume vasculaire de 40% (p < 0,05) en comparaison des données du groupe contrôle avant chimiothérapie. Cet effet n'a pas été observé dans le groupe AGPI n-3. En fin de chimiothérapie (à la semaine 6), le docétaxel a eu un rôle anti-angiogénique aussi bien dans le groupe contrôle (diminution de 50% par rapport au groupe contrôle à la semaine 0, p < 0,001) que dans le groupe AGPI n-3, mais avec un effet plus important dans ce dernier groupe (diminution de 50% par rapport au groupe contrôle à 6 semaines, p < 0,05).



**Figure 31 : Diminution du volume vasculaire par les AGPI n-3 dans les tumeurs mammaires.**

Après induction et apparition des tumeurs mammaires, les rats recevaient une injection de docétaxel (6mg/kg) toutes les semaines pendant 6 semaines. Les échographies étaient réalisées sur les tumeurs des 2 groupes nutritionnels juste avant la chimiothérapie (tumeurs d'environ 2 cm<sup>2</sup>), au cours (semaine 2) et en fin (semaine 6) de chimiothérapie. La figure représente un paramètre vasculaire (AUC = aire sous la courbe) obtenu par échographie avec agent de contraste, le SONOVUE®. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM (n compris entre 15 et 18 tumeurs par groupe. Test de Mann-Whitney :

\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, en comparaison avec le groupe contrôle à la semaine 0.

+ P < 0,05, en comparaison avec le groupe contrôle à la semaine 6.

La pression partielle en oxygène avait été mesurée au cours de cette étude avant et après chimiothérapie dans les deux groupes nutritionnels. Avant la chimiothérapie, la moyenne des valeurs de PO<sub>2</sub> mesurées était de 21 ± 11,6 mm Hg pour le groupe contrôle et 20 ± 11,9 mm Hg pour le groupe AGPI n-3. Dans cette étude, 25 % des tumeurs du groupe contrôle et 28 % des tumeurs du groupe AGPI n-3 étaient hypoxiques (PO<sub>2</sub> < 10 mm Hg). Avant de débiter la chimiothérapie, les AGPI n-3 n'avaient modifié ni la PO<sub>2</sub> ni l'hypoxie des tumeurs.

En fin de chimiothérapie (6 semaines), aucune tumeur hypoxique n'avait été détectée dans les deux groupes nutritionnels. L'effet éventuel d'un enrichissement de l'alimentation en AGPI n-3 sur l'oxygénation des tumeurs en fin de chimiothérapie n'avait pas pu être montré.

Ainsi, cette étude *in vivo* a montré que les AGPI n-3 apportés par l'alimentation étaient capables de sensibiliser les tumeurs mammaires aux taxanes. Cette chimiosensibilisation est associée à un effet anti-angiogénique des AGPI n-3, effet également observé avant la chimiothérapie.

## II. Objectifs de la thèse

Cette thèse a eu pour objectif principal de comprendre comment les AGPI n-3 sensibilisent les tumeurs mammaires de rats au docétaxel. Parmi les différents mécanismes déjà décrits, la modulation de la vascularisation semble jouer un rôle important. L'étude précédente menée au laboratoire (Cf. page 134) a montré que la diminution de la quantité de vascularisation par les AGPI n-3 et la régression des tumeurs mammaires sous chimiothérapie sont associées. Cependant, diminuer la quantité vasculaire pourrait aboutir à la formation de zones hypoxique et à une diminution de la distribution de l'agent anticancéreux dans les tumeurs et, par conséquent à l'apparition de tumeurs résistantes aux traitements. Ces observations lèvent une question essentielle : comment les AGPI n-3 peuvent-ils augmenter la sensibilité des tumeurs mammaires au docétaxel tout en diminuant leur vascularisation ?

Afin de répondre à cette question, 3 axes ont été définis :

### A. Effets d'une supplémentation du régime alimentaire en AGPI n-3 sur la qualité de la vascularisation

Pour répondre à cet objectif, nous avons réalisé une intervention nutritionnelle dans un modèle de tumeurs mammaires chimio-induites (par injection de NMU) chez le rat. Excepté pour la durée de la chimiothérapie, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales identiques à l'expérimentation précédemment menée au laboratoire.

Nous avons évalué l'effet d'un régime alimentaire riche en AGPI n-3 sur la qualité et la fonctionnalité de la vascularisation à l'aide de 3 paramètres. Les valeurs de **pression interstitielle tumorale** ainsi que l'**extravasation tissulaire** d'une molécule ont été évaluées. L'**hypoxie** des tumeurs a été mesurée de manière indirecte via l'étude de l'expression de la carbonique anhydrase IX (CAIX, marqueur moléculaire induit par l'hypoxie).

Dans un second temps, afin de compléter les données échographiques obtenues précédemment, des casts ou empreintes vasculaires ont été réalisés et ont permis d'observer les vaisseaux sanguins de la tumeur en trois dimensions.

## B. Effets du DHA sur les étapes de l'angiogenèse modélisées *in vitro*

Au cours de la progression tumorale, le VEGF, synthétisé par les cellules tumorales, active les cellules endothéliales des vaisseaux avoisinants de la tumeur. Le VEGF aboutit à la synthèse du monoxyde d'azote, facteur ayant un rôle clé dans l'angiogenèse.

A l'aide de culture primaire de cellules endothéliales, nous avons modélisé *in vitro* quatre étapes majeures de l'angiogenèse qui sont : prolifération, migration, formation de pseudocapillaires et perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales. Ces différents tests nous ont permis d'évaluer la réponse au VEGF de cellules endothéliales enrichies ou non en DHA.

## C. Déterminer les cibles moléculaires impliquées dans l'effet anti-angiogénique des AGPI n-3

Cet objectif a eu pour but de déterminer les cibles moléculaires des AGPI n-3 pouvant expliquer les effets anti-angiogéniques que nous avons observé.

Une étude portant sur les niveaux d'expression d'une centaine de gènes impliqués dans l'angiogenèse nous a permis de déterminer si les AGPI n-3 modifiaient l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse.

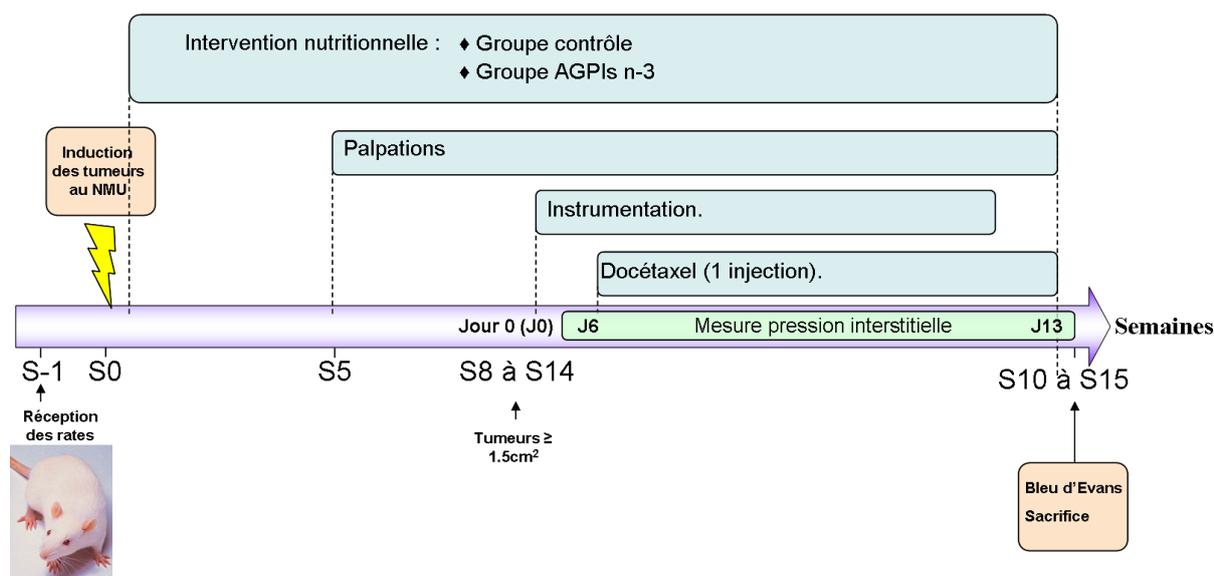
Une des principales voies de signalisation activée par la liaison du VEGF au VEGFR2 est la voie de signalisation AKT / eNOS / NO. Nous avons étudié l'effet des AGPI n-3 sur l'induction par le VEGF de la phosphorylation des protéines AKT et eNOS au niveau des tumeurs mammaires, et de cellules endothéliales et tumorales en culture.

## Matériels et méthodes

# I. Mesure *in vivo* des paramètres fonctionnels de la vascularisation tumorale

## A. Chronologie de l'expérimentation animale

Une expérimentation animale a été menée au cours de cette thèse afin de mesurer les paramètres fonctionnels de la vascularisation tumorale. La chronologie de cette expérimentation est présentée dans la figure ci-dessous (figure 32). Nous détaillerons les étapes de notre expérimentation dans les différentes parties de ce chapitre.



**Figure 32 : Chronologie de l'expérimentation animale.**

Les tumeurs ont été induites par le NMU lorsque les rates étaient âgées de 47 jours. Les animaux ont par la suite été séparés en deux groupes afin de les soumettre à une intervention nutritionnelle. Cinq semaines après l'induction au NMU (N-Méthyl-N-Nitrosurée), les rates ont été palpées et les tumeurs ont commencées à être décelées 6 semaines après injection du NMU. Les tumeurs ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. La première tumeur de chaque rate à atteindre la taille de 1,5 cm<sup>2</sup>, considérée comme la tumeur cible, a été choisie pour être instrumentée (implantation d'un capteur de pression dans la tumeur). Les instrumentations se sont déroulées de la semaine 8 à la semaine 14 (S8 à S14). Les mesures de pression interstitielle ont débuté 24 heures après l'instrumentation. Après 6 jours de stabilisation de la pression interstitielle, les rates ont subi une injection de docétaxel. Pendant 7 jours, les variations de la pression interstitielle ont été enregistrées. 30 minutes avant le sacrifice des animaux, du bleu d'Evans a été injecté chez les rates anesthésiées. La taille des tumeurs a été mesurée le jour de l'instrumentation, juste avant l'injection du docétaxel sous anesthésie, et une dernière fois au moment du prélèvement de la tumeur. A l'autopsie, les tumeurs ont été prélevées et congelées à -80°C. Un échantillon de la tumeur cible a été au préalable prélevé pour l'analyse de l'extravasation du Bleu d'Evans.

## B. Induction des tumeurs mammaires

Nous avons utilisé 40 rates de race Sprague-Dawley en provenance de l'élevage JANVIER CERJ (Le Genest Saint Isle). Les rates, dont le poids au premier jour de l'étude était compris entre 120 et 170 grammes, ont été reçues 6 jours avant le début de l'étude (respect de la période d'acclimatation). Les animaux, placés à raison de 2 à 3 par cages et distingués par un marquage au niveau de la queue, ont été séparés de façon aléatoire en deux groupes de 20 animaux chacun. Les cages ont été placées à l'animalerie où la température était comprise entre 20 et 24°C avec un taux d'humidité d'environ 50% et où le cycle artificiel jour/nuit comprenait 12 heures de lumière et 12 heures de nuit. Les tumeurs mammaires ont été chimioinduites par un carcinogène, le NMU (N-Méthyle Nitrosourée, 25 mg/kg) sur des rates âgées de 47 jours (période de maturation des glandes mammaires). Les tumeurs sont des adénocarcinomes et se forment à partir des cellules de l'hôte. Elles sont décrites pour être bien vascularisées et sensibles aux œstrogènes (Thompson et al. 2002). L'incidence tumorale a été d'environ 90 %.

## C. Intervention nutritionnelle et suivi de la croissance tumorale

La supplémentation nutritionnelle a débuté 2 jours après l'induction des tumeurs au NMU. Les deux groupes de rates ont reçu une alimentation comprenant 15 % de lipides. Pour les rates du premier groupe, nommé groupe contrôle, les 15 % de lipides correspondaient à 12 % d'huile d'arachide et 3 % d'huile de colza. Pour le deuxième, groupe AGPI n-3, ils correspondaient à 8 % d'huile d'arachide, 2 % d'huile de colza et 5 % d'huile de poisson (Phosphotec, Saint Herblain, France) contenant 20% d'EPA (acide eicosapentaénoïque) et 50% de DHA (acide docosahexaénoïque). La composition en acides gras (en % d'acides gras présents dans les 15% de lipides) des régimes nutritionnels contrôle et AGPI n-3 est présentée dans le tableau XII.

	<b>Composition en acides gras (AG) des régimes nutritionnels (en %)</b>	
	<b>Contrôle</b>	<b>AGPI n-3</b>
<b>AG saturés</b>	<b>14,8</b>	<b>10,3</b>
<b>AG monoinsaturés</b>	<b>60,8</b>	<b>42,8</b>
<b>AGPI n-6</b>		
Acide linoléique (18:2 n-6)	22,1	14,9
Acide arachidonique (20:4 n-6)	0,0	0,56
Acide docosapentaénoïque (22:5 n-6)	0,0	0,4
<b>Total</b>	<b>22,3</b>	<b>16,2</b>
<b>AGPI n-3</b>		
Acide $\alpha$ -linoléique (18:3n-3)	0,9	0,8
Acide eicosapentaénoïque (20:5n-3)	0,0	7,7
Acide docosahexaénoïque (22:6 n-3)	0,1	17
<b>Total</b>	<b>1,0</b>	<b>28,8</b>

**Tableau XII : Composition en acide gras des régimes nutritionnels contrôle et AGPI n-3.**

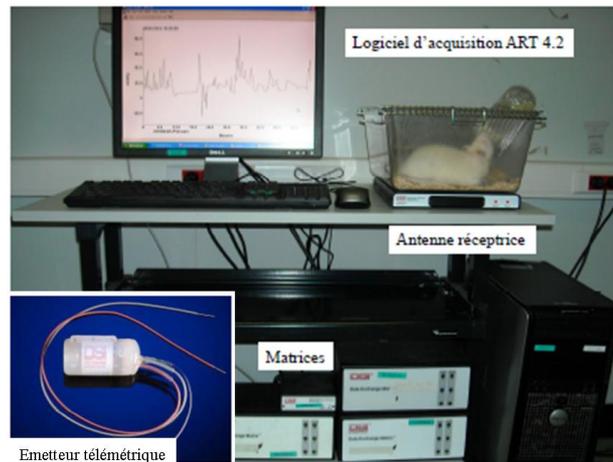
Les 2 régimes nutritionnels apportent chacun 15 % de lipides. Sachant que 15 % de lipides apportent 17 % de DHA et 7,7 % d'EPA, le régime AGPI n-3 apporte au final 2,5 % de DHA et 1% d'EPA.

Dès la 5<sup>ème</sup> semaine après injection du NMU, des palpations ont été effectuées chaque semaine. Les premières tumeurs sont apparues 6 semaines après induction. La taille des tumeurs a été mesurée deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. La première tumeur à atteindre 1,5 cm<sup>2</sup> a été définie comme tumeur cible pour la mesure de la pression interstitielle.

#### D. Mesure de la pression interstitielle (PI).

Initialement conçue pour la mesure de la pression artérielle, la technique de mesure par télémétrie a été adaptée à la mesure de la pression interstitielle dans une tumeur (Schnell

et al. 2008). Elle permet le suivi de la pression interstitielle de façon continue chez un animal conscient et vigile. Cette technique présente l'avantage d'un suivi en temps réel de l'effet d'une molécule sur la pression interstitielle contrairement à la technique du « wick-in-needle » ne permettant la mesure de la pression interstitielle qu'à un instant t sur un animal anesthésié. La technique que nous avons utilisé a consisté en l'implantation d'un capteur de pression dans la tumeur de l'animal (instrumentation), et permet l'enregistrement des valeurs de pression et d'activité de l'animal (système d'acquisition présenté dans la figure 33).



**Figure 33 : Système d'acquisition de la pression interstitielle.**

L'**émetteur téléométrique** (*en bas à gauche*) a été placé dans la cavité abdominale du rat et le capteur de pression a été implanté dans la tumeur mammaire. L'animal a ensuite été placé dans une cage située au-dessus de l'**antenne réceptrice**. Cette dernière était reliée aux **matrices** (conversion du signal) elles-mêmes reliées à l'ordinateur équipé du **logiciel d'acquisition ART** (Advance Research Technology, version 4.2, Data Science Inc).

Pour procéder à l'instrumentation de la tumeur cible, les rats ont été anesthésiés par de l'isoflurane sous forme de gaz à 2,5 %. Le corps de l'émetteur (TL11M2-C50-PXT, Data Sciences Inc, figure 33) a été placé dans l'abdomen de l'animal. Le capteur a été tunnélisé sous la peau jusqu'à la tumeur. Une aiguille de diamètre égal à celui du cathéter a été insérée dans la tumeur pour faciliter l'implantation du cathéter à environ 0,5 cm de profondeur et a été fixé à l'aide d'une colle tissulaire (Histoacryl®). Les mesures de pression interstitielle débutent 24 heures après la chirurgie. Pour cela, les animaux sont placés dans des cages individuelles déposées au-dessus de l'antenne réceptrice (figure 33), celle-ci étant reliée à un ordinateur disposant d'un logiciel d'acquisition des données ART™ (Advance Research Technology, version 4.2, Data Sciences Inc). Les mesures sont faites en continu (à une fréquence de 500 Hz) avec un enregistrement des valeurs par intervalles de 10 secondes. Les données sont ensuite exportées grâce au module d'analyse fourni avec le logiciel ART et nous avons obtenu des valeurs moyennes de pression pour des intervalles de cinq minutes. En

parallèle, l'activité locomotrice des animaux a pu être déterminée grâce au corps de l'émetteur téléométrique. Les données sont exprimées en mouvement par minute.

Les premières tumeurs instrumentées l'ont été 8 semaines après induction par le NMU. Les instrumentations se sont poursuivies jusqu'à 14 semaines après induction par le NMU.

## E. Chimiothérapie

Une semaine après l'instrumentation des tumeurs (temps nécessaire à la stabilisation de la PI), la chimiothérapie a été initiée. Le docétaxel a été préparé juste avant le traitement. La chimiothérapie a consisté en l'injection d'une dose unique de docétaxel à 6 mg/kg par voie intra péritonéale (dose similaire à l'expérimentation animale précédente). Cette dose avait été choisie en fonction de ce qui est administré chez l'humain. En clinique, la dose est de 100 mg/m<sup>2</sup> avec une injection toutes les 3 semaines, ce qui équivaut à une dose hebdomadaire comprise entre 25 et 35 mg/m<sup>2</sup>. La dose équivalente chez le rat se situe aux alentours de 6 mg/kg.

## F. Mesure de l'extravasation d'une molécule et autopsie

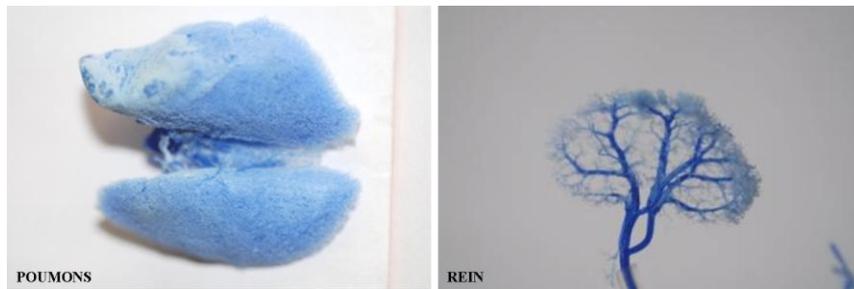
*Principe* : Nous avons utilisé une molécule fluorescente, le bleu d'Evans, injecté en i.v. Son extravasation a été suivie par fluorescence.

Une semaine après l'injection du docétaxel, les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital sodique (voie intrapéritonéale, 45 mg/kg). La solution de bleu d'Evans (25 mg/kg) a été injectée dans la veine caudale du rat 30 minutes avant euthanasie (par dose létale de pentobarbital sodique) et autopsie de l'animal. La tumeur cible a été prélevée et un échantillon (1 cm<sup>3</sup>) a été recouvert de Tissue Tek® (Qiagen). L'échantillon, fixé par de l'isopentane à -50°C pendant 2 minutes a été conservé à -80°C. Des coupes de tumeurs de 20 µm ont été réalisées dans un laboratoire situé à Nantes. Les coupes ont été montées sur lame et fixées à l'acétone (*milieu de montage* : Prolong Gold Antifade Reagent, Invitrogen). Nous avons analysé les lames et quantifié la fluorescence à l'aide d'un microscope à Epi-fluorescence au grossissement X 100. L'excitation a été obtenue à l'aide d'une lampe à mercure (Nikon, C-SHG1) et d'un filtre Texas-Red (longueurs d'onde d'excitation et d'émission du bleu d'Evans :  $\lambda_{\text{excitation}} = 540\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 610\text{ nm}$ ). 3 photos par tumeur ont

été prises grâce au logiciel NIS-Elements Software (version 3.0) et l'intensité de la fluorescence du bleu d'Evans a été quantifiée à l'aide du système d'analyse Leica (Qwin, version 3.4.4). Pour cela, 256 niveaux de rouge ont été définis et appliqués à chacune des photos où le nombre de pixels appartenant à chaque niveau de rouge a été calculé. L'intensité de fluorescence a été déterminée pour chaque coupe de tumeurs des deux groupes nutritionnels.

## G. Empreinte vasculaire des tumeurs.

*Principe* : L'empreinte vasculaire d'organes, ou « casting », consiste en la polymérisation d'une résine à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Cette technique permet de visualiser la vascularisation de l'organe en 3 dimensions. (figure 34).



**Figure 34 : Exemple d'empreintes vasculaires obtenues après polymérisation de la résine et digestion des tissus.**

Empreinte vasculaire de poumons (à gauche) et d'un rein (à droite) de rat.

Cependant, les casts obtenus pour les tumeurs sont fragiles et ne se maintiennent pas à sec. Afin de résoudre ce problème de conservation de l'empreinte vasculaire des tumeurs, nous avons amélioré la technique du CAST en ajoutant un agent de contraste à la résine. Ceci nous a permis de visualiser la vascularisation sous rayon X. Ainsi, toutes les données relatives à la vascularisation de la tumeur sont enregistrées sous fichier informatique. A posteriori, cette amélioration permettra de quantifier la vascularisation et de déterminer les diamètres des vaisseaux tumoraux.

Trois rats (1 du groupe contrôle et 2 du groupe AGPI n-3 n'ayant pas reçu de docétaxel) ont été anesthésiés par du pentobarbital sodique à 60 mg/kg. L'apex du cœur a été incisé et un cathéter y a été inséré jusque dans l'aorte. Chaque rat a ensuite été perfusé avec 1L de milieu Krebs-Henseleit hépariné à 35°C (composition tableau XIII) avec une pression comprise entre 100 et 150 mm Hg à l'aide du système Perfusion One™ (myNeuroLab, St Louis, MO). Lorsque le liquide ressortant de l'oreillette droite du cœur (préalablement incisée) était clair,

nous avons procédé à la perfusion du rat avec la résine PU4ii additionnée de l'agent de contraste, le Lipiodol (Guerbet).

<b>Milieu Krebs-Henseleit (1 L)</b>	
NaCl	118 mM
KCl	4,7 mM
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	24,9 mM
Glucose	5,6 mM
Héparine (5 000 UI / mL)	10 mL

**Tableau XIII : Composition du milieu de Krebs-Henseleit utilisé pour la perfusion des rats.**

60 mL de résine ont été préparés juste avant la perfusion du rat. 12 mL de Lipiodol (Guerbet, France), 36 g de résine PU4ii (VasQtec, Suisse) et 6 g de durcisseur ont été ajoutés à du pigment bleu (42 mg) dissout dans du solvant EMK (2-butanone, Sigma). 50 mL de ce mix ont été perfusés à la vitesse de 4 mL/minutes à l'aide d'une pompe à perfusion HARVARD. Après perfusion, l'animal est placé au moins 24 heures (temps nécessaire à la polymérisation totale de la résine) à 4°C. Le lendemain, les tumeurs ont été prélevées et placées dans du Formol à 4% puis envoyées au CIPA d'Orléans (Centre d'Imagerie du Petit Animal) afin d'y être analysées par un scanner à rayon X (équipé d'un système d'acquisition CT120, General Electric Healthcare). Les images ont été acquises puis reconstituées à l'aide d'un algorithme de reconstruction nous permettant d'obtenir des images en 3-dimensions avec une résolution volumétrique de 50  $\mu\text{m}^3$  (micro View Analysis and release 2.3a7, GE Healthcare).

## II. Culture cellulaire

### A. Type de cellules utilisées

Les cellules HUVEC, provenant de la société Promocell (Allemagne), sont des cellules de veines de cordons ombilicaux humains issues d'un pool de donneurs. Ces cellules sont des cultures primaires, c'est à dire non immortalisées. Pour éviter toute dérive des cellules, nous les avons utilisé jusqu'au 5<sup>ème</sup> passage maximum. Les cellules sont cultivées dans du milieu de croissance pour cellules endothéliales (Endothelial cell basal medium – MV) complété avec du sérum de veau fœtal (SVF, 5%), du supplément de croissance (ECGS, 0,4%), du facteur de croissance épidermal (EGF, 10ng/mL), de l'héparine (90µg/mL) et de l'hydrocortisone (1 µg/mL).

Les MDA-MB-231, MCF-7 et SKBR3 proviennent de chez ATCC. Ce sont des cellules cancéreuses épithéliales adhérentes issues d'adénocarcinomes mammaires. Elles sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant les éléments nécessaire à leur survie et à leur prolifération : vitamines, acides aminés, D-Glucose 4,5 g/L, L-Glutamine 584 mg/L et 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>. A ce milieu de base, 5 % de SVF (Lonza, France) sont ajoutés.

Les MDA-MB-231 et les SKBR3 présentent une protéine suppresseur de tumeur (P53) mutée et non fonctionnelle et sont insensibles aux œstrogènes (Cailleau et al. 1974) (Trempe 1976). Les cellules sontensemencées à la densité de 5 000 cellules/cm<sup>2</sup> et 9 000 cellules/cm<sup>2</sup> respectivement.

Les MCF-7, à l'inverse des deux autres lignées, présentent une P53 normale et sont sensibles aux œstrogènes (Soule et al. 1973). Les cellules sontensemencées à la densité de 20 000 cellules/cm<sup>2</sup>.

### B. Culture des cellules

Les cellules ont été cultivées dans une étuve où l'atmosphère est saturée en humidité, la température est à 37°C et l'air contient 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont trop

confluentes, cela entraîne des modifications dans leur comportement (inhibition de contact, de la prolifération, différenciation des cellules...). Il est nécessaire de contrôler ce paramètre en trypsinant de manière régulière (une fois par semaine) les cellules lorsqu'elles atteignent 80-90 % de confluence. Toutes les cellules utilisées ont été décollées à l'aide de la trypsine (enzyme qui, par protéolyse, clive les liaisons cellules-cellules et cellules-support). Chaque trypsination correspond à un passage.

### C. Mesure de la prolifération des cellules endothéliales (test MTT)

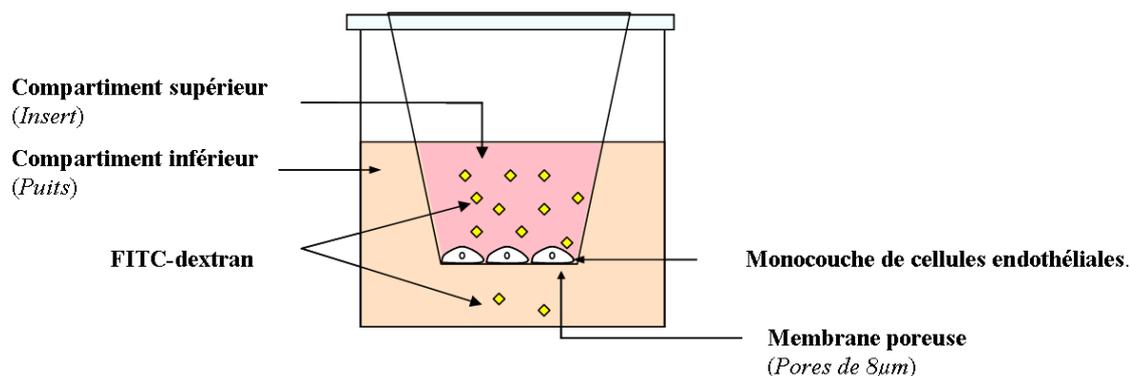
*Principe* : Le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphényle tétrazolium bromide) est une méthode colorimétrique basée sur la réduction des sels de tétrazolium. Ce test permet d'évaluer l'activité d'une enzyme mitochondriale : la succinate déshydrogénase. Cette enzyme transforme le sel de tétrazolium, de couleur jaune, en cristaux de formazan, de couleur violette. Après solubilisation de ces cristaux dans du Diméthyle Sulfoxyde (DMSO), une lecture de la densité optique (DO) par spectrophotométrie est effectuée à la longueur d'onde de 570nm. L'intensité de la DO mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Ce test est utilisé pour déterminer de manière indirecte la prolifération des cellules et/ou la toxicité de molécules.

Les cellules HUVEC ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (2 cm<sup>2</sup> par puits) à la densité de 5 000 cellules par cm<sup>2</sup>. *i*) Pour étudier l'effet du DHA sur la prolifération des HUVEC, les cellules ont été traitées par du DHA (5, 10 ou 30 µM), de l'acide oléique (acide gras monoinsaturé, 30 µM) ou de l'éthanol (contrôle) pendant 5 jours à raison d'un traitement tous les deux jours. *ii*) Pour étudier l'effet du DHA sur la sensibilité des cellules au docétaxel, les cellules ont été enrichies en DHA 10 µM pendant 4 jours puis co-traitées par du docétaxel (0,1, 1 et 10 nM) pour une durée de 1 à 7 jours.

A la fin du traitement, le milieu a été remplacé par 400 µL de MTT à 0,5 mg/mL (Sigma, France) pendant 1 heure à 37°C. Les cristaux de formazan ont ensuite été solubilisés dans 200 µL de DMSO pendant 30 minutes sous agitation et à l'abri de la lumière. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables dans la condition traitée par rapport à la condition contrôle (cellules traitées avec l'éthanol).

## D. Mesure de la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales

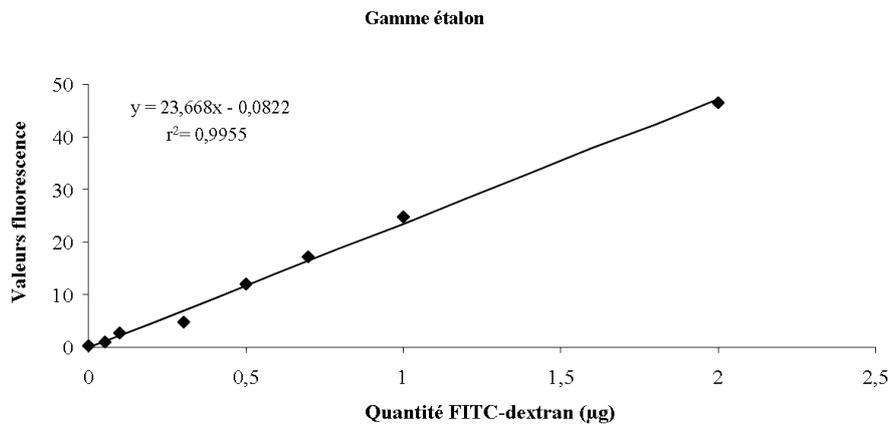
*Principe* : La technique permet d'évaluer la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales en mesurant le passage d'une molécule fluorescente au travers de cette monocouche. La perméabilité de la monocouche a été testée en chambre de Boyden (Figure 35)



**Figure 35 : Mesure de la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales en chambre de Boyden.**

Les HUVEC ont étéensemencées (5 000 cellules par insert) sur des inserts (8 µm, Becton et Dickinson) préalablement coatés avec de la fibronectine bovine. Jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence (6 jours de culture), les cellules ont été traitées par du DHA 1 µM ou par de l'éthanol (contrôle) en présence de VEGF (0,5 ng/mL) tous les deux jours. Le jour de l'expérimentation, les cellules ont été sevrées en SVF pendant 4 heures puis 300 µL de milieu contenant du FITC-dextran (Sigma, masse molaire : 40 kDa) ont été déposés dans le compartiment supérieur (concentration finale de FITC-dextran : 1 mg/mL). La perméabilité basale a été déterminée 1 heure après addition de FITC (prélèvement de 20 µL dans le compartiment inférieur). Du VEGF (10 ng/mL), ou du PBS a ensuite été rajouté dans le compartiment supérieur et dans le compartiment inférieur (nouveau prélèvement de 20 µL dans le compartiment inférieur à la fin de la 2<sup>ème</sup> heure). La fluorescence a été mesurée par un spectrofluorimètre (Hitachi, F-2500) dans une cuve en quartz aux longueurs d'onde d'excitation/émission de 492 / 520 nm. La quantité de FITC présente dans le compartiment inférieur a été déterminée à l'aide d'une gamme étalon de FITC-dextran (de 0 à 10 µg) (figure 36). La perméabilité est exprimée par un rapport entre la quantité de FITC-dextran présent dans le compartiment inférieur en fin d'expérimentation (2 heures) et la quantité présente au

bout d'une heure : perméabilité =  $\mu\text{g FITC}_{2\text{h}} / \mu\text{g FITC}_{1\text{h}}$ . Une augmentation de la perméabilité se traduit par un rapport supérieur à 1.



**Figure 36 : Exemple de gamme étalon de FITC-dextran.**

L'équation de droite obtenue permet de déterminer la quantité de FITC-dextran présent dans l'échantillon.

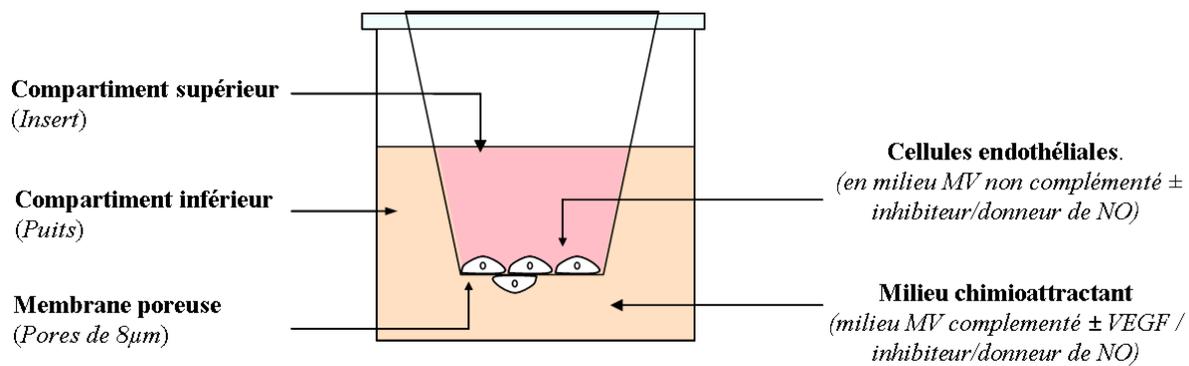
## E. Tubulogenèse en 2-dimensions

*Principe* : La tubulogenèse, ou formation de pseudo-capillaires, est un phénomène observable lorsque les cellules sontensemencées sur du Matrigel® (BD, France). Le Matrigel® est une préparation liquide de membrane basale obtenue à partir d'un sarcome de souris (tumeur riche en matrice extracellulaire). Il est principalement composé de laminine (*glycoprotéine de la lame basale*), de collagène IV, de protéoglycane (à sulfate d'héparane) et d'entactine (*glycoprotéine de structure*) et mime ainsi la matrice extracellulaire. Les cellules y forment des pseudocapillaires en créant des extensions les unes vers les autres.

Trois jours avant le début de l'expérimentation, les puits d'une plaque de culture de 24 puits ont été coâtés avec du Matrigel®. Ce dernier, décongelé dans de la glace pour éviter toute polymérisation, a été dilué au 1/3 dans du milieu de culture MV froid sans SVF. 400 µL de la dilution ont été déposés dans chaque puits. Ensuite, la plaque a été mise à 37°C pendant 3 jours, temps nécessaire à la polymérisation du Matrigel®. Après un enrichissement de 5 jours en DHA 5 µM, les cellules ont étéensemencées à raison de 36 000 cellules par puits coâtés en présence ou non de VEGF (10 ng/mL). La formation des pseudocapillaires a été suivie toutes les 30 minutes pendant 3 heures. Des photos ont été réalisées sur le même champ pour chaque condition sous microscope au grossissement X 100. Le nombre de pseudocapillaires a été déterminé dans chacune des conditions.

## F. Migration des cellules HUVEC en chambre de Boyden

*Principe* : La technique consiste à évaluer la capacité des cellules endothéliales à migrer de façon verticale au travers d'une membrane poreuse en réponse à un stimulus chimioattractant. Le test de migration est réalisé en chambre de Boyden (schématisée dans la figure 37).



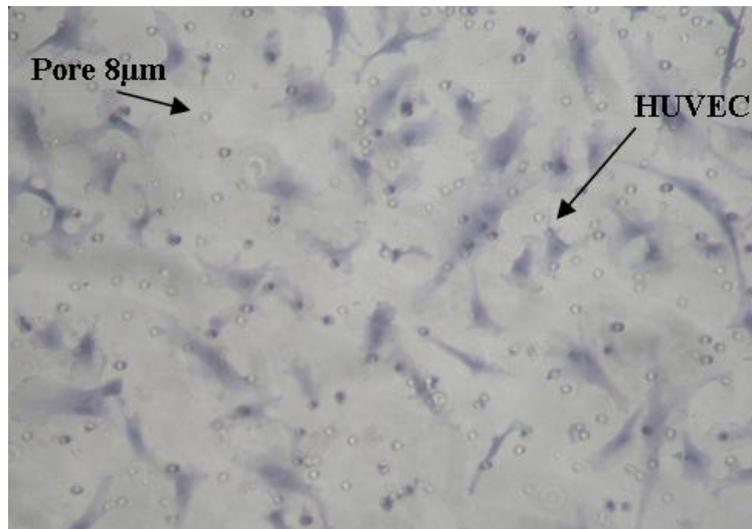
**Figure 37 : Evaluation de la migration en chambre de Boyden.**

La chambre de Boyden permet d'évaluer la capacité des cellules endothéliales à migrer de façon verticale au travers d'une membrane poreuse en réponse à un stimulus chimioattractant.

Après avoir été enrichies en DHA 5 µM pendant 5 jours, 25 000 cellules ont été mises en suspension dans 200 µL de milieu de culture MV non complété (c'est-à-dire, sans SVF ni facteurs de croissance) et déposées dans le compartiment supérieur du dispositif expérimental. 800 µL de milieu chimioattractant (MV complété : SVF et facteurs de croissance) ont été ajoutés dans le compartiment inférieur. Le donneur de NO (DETA-NO, concentration finale : 10µM) ainsi que l'inhibiteur des NO synthases (L-NAME, concentration finale : 1mM) sont ajoutés dans les compartiments inférieur et supérieur. Le VEGF (concentration finale 10ng/mL) est quant à lui ajouté uniquement dans le compartiment inférieur. Les cellules HUVEC ont été stimulées par du VEGF de manière chronique (traitement pendant 5 jours) et/ou de manière aiguë (pendant les 5 heures de migration).

Après 5 heures à l'étuve, les inserts ont été rincés dans du PBS avec Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> puis plongés 10 minutes dans du méthanol afin de fixer les cellules. Ces dernières, ont été rincées dans de l'eau distillée et colorées à l'hématoxyline. Les cellules restées sur la face supérieure de l'insert ont été retirées à l'aide d'un coton-tige ce qui nous a permis de compter uniquement les cellules ayant migré et adhéré à la face inférieure de l'insert (figure 38). Sous un microscope inversé au grossissement X 200, 5 photos de l'insert (environ 35 % de l'insert) ont été prises. Les cellules ont été comptées à l'aide le logiciel MesurimPro (logiciel gratuit

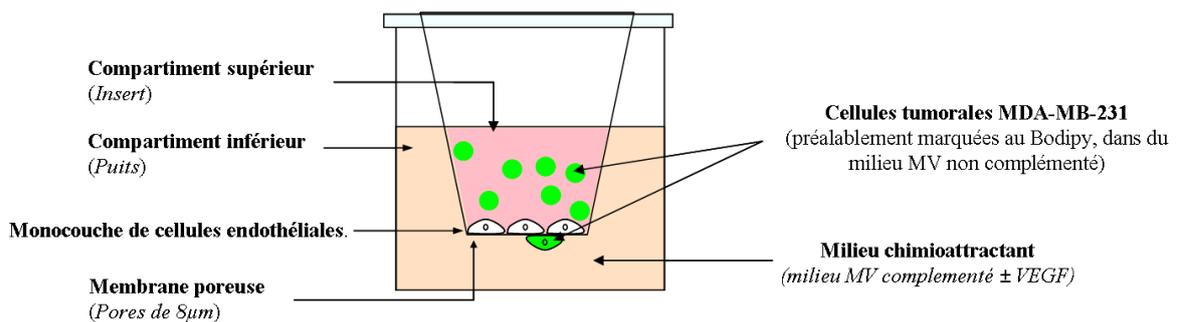
développé par JF Madre, Amiens). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant migré et standardisés par rapport à la condition contrôle.



**Figure 38 :** Cellules HUVEC colorées à l'hématoxyline situées sur la face inférieure de l'insert après leur migration en chambre de Boyden.

## G. Migration transendothéliale des cellules tumorales

*Principe :* La technique consiste à évaluer la capacité des cellules tumorales à adhérer à la monocouche de cellules endothéliales puis à migrer au travers de cette monocouche ainsi qu'au travers de la membrane de l'insert. Le test de migration transendothéliale est réalisé en chambre de Boyden (figure 39) où des cellules endothéliales sont préalablementensemencées afin de former une monocouche.



**Figure 39 :** Evaluation de la migration transendothéliale en chambre de Boyden.

La technique consiste à évaluer la capacité des cellules tumorales à adhérer à la monocouche de cellules endothéliales puis à migrer au travers de cette monocouche ainsi qu'au travers de la membrane de l'insert

Les cellules HUVEC et MDA-MB-231 ont été pré-enrichies par du DHA 10 µM pendant 5 jours. 24 heures avant l'expérimentation, les cellules HUVEC ont étéensemencées à raison de 100 000 cellules par insert (au préalable coâté par du collagène IV) et les cellules

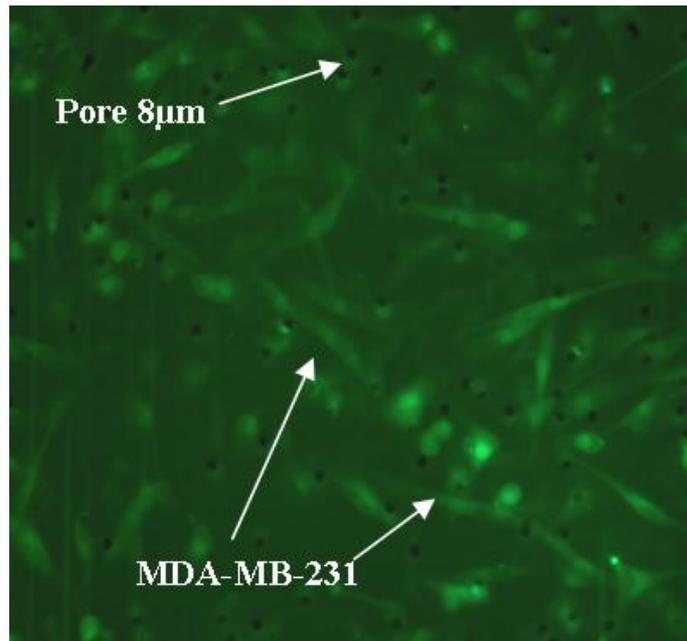
MDA-MB-231 ont été sevrées en SVF. Le jour de l'expérimentation, les cellules MDA-MB-231 ont été marquées avec 15µM d'un traceur fluorescent (Bodipy® : 8-chloromethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, figure 40) pendant 45 minutes. Après centrifugation, 50 000 cellules MDA-MB-231 ont été déposées dans du milieu MV non complété (qsp 200 µL) dans le compartiment supérieur de la chambre de Boyden où se trouve la monocouche de cellules endothéliale. 800 µL de milieu chimioattractant (milieu MV complété ± VEGF 5 ng/mL) ont été ajoutés dans le compartiment inférieur de la chambre (puits).



**Figure 40 : Structure biochimique du Bodipy®.**

D'après <http://probes.invitrogen.com/media/structure/1333.jpg>

Après 14 heures à l'étuve, les inserts ont été rincés dans du PBS avec  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , puis plongés 15 minutes dans du formaldéhyde 3,7 % afin de fixer les cellules. Les cellules restées sur la face supérieure de l'insert ont été retirées à l'aide d'un coton-tige ce qui nous a permis de compter uniquement les cellules qui ont migré et adhéré à la face inférieure de l'insert. A l'aide d'un microscope à Epi-fluorescence inversé et équipé d'un filtre GFP, seules les MDA-MB-231 marquées ayant migré ont été visualisées (figure 41). 5 photos de l'insert (environ 35 % de l'insert) ont été prises. Les cellules ont été comptées à l'aide le logiciel MesurimPro. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant migré et standardisés par rapport à la condition contrôle.



**Figure 41 : Cellules tumorales marquées au Bodipy® après migration au travers d'une monocouche de cellules endothéliales.**

### III. Identification des cibles moléculaires des AGPI n-3

#### A. Etude par western blotting de la voie de signalisation VEGF/AKT/eNOS.

*Principe* : La technique du western blot permet d'étudier de façon ciblée l'expression des protéines présentes dans les échantillons. Elle est basée sur la reconnaissance des protéines d'intérêts par des anticorps spécifiques. En fonction de leur poids moléculaire, les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Elles sont transférées sur une membrane synthétique en PVDF (Polyvinylidène fluoride). La membrane est incubée en présence des anticorps primaires, qui vont reconnaître la protéine d'intérêt, et avec des anticorps secondaires couplés à une enzyme HRP qui, en présence d'un substrat, permet de visualiser la protéine d'intérêt.

##### 1. Extraction et dosage des protéines

Les extractions protéiques ont été réalisées en utilisant un tampon de lyse (composition tableau XIV).

## Tampon de lyse

---

Tris-HCL (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM
EGTA	1 mM
NP40	1 % (v/v)
Déoxycholate	0,5 % (p/v)
Sodium Floride (NaF)	5 mM
$\beta$ -glycérophosphate ( $\beta$ -GP)	20 mM
Sodium orthovanadate (orthoV)	1 mM
Sodium Pyrophosphate décahydrate (NaPP)	1 mM
Cocktail anti-protéase (Sigma, P2714)	5 % (v/v)

### Tableau XIV : Composition du tampon d'extraction des protéines.

Le Nonidet P40 (NP40) et le déoxycholate solubilise les membranes. Les anti-phosphatases : NaF (Sodium Fluoride),  $\beta$ -GP ( $\beta$ -glycérophosphate), orthoV (Sodium Orthovanadate) et NaPP (Sodium pyrophosphate décahydrate) et des anti-protéases (en cocktail, Sigma P2714) conservent l'intégrité des protéines.

#### a. Extraction des protéines de cellules endothéliales

Les cellules HUVEC, ensemencées dans des flacons de 175 cm<sup>2</sup> à la densité de 1 500 cellules/cm<sup>2</sup>, ont été enrichies par du DHA 5  $\mu$ M pendant 5 jours. Pour l'étude de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée (eNOS-P), les cellules ont été stimulées 1 heure par du VEGF 10 ng/mL. Pour l'étude de la protéine AKT et de la forme phosphorylée (AKT-P), elles ont été stimulées 10, 20, 30 et 60 minutes par du VEGF 10 ng/mL. Pour l'étude du VEGFR2 et de la forme phosphorylée (VEGFR2-P, Tyr1175), les cellules ont toutes été cultivées pendant 5 jours en présence de VEGF 5 ng/mL.

Après stimulation par le VEGF, le milieu de culture a immédiatement été retiré et remplacé par du PBS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> froid et les flacons de culture disposés sur de la glace. Les cellules ont été grattées à l'aide d'un râteau dans le PBS froid puis centrifugées 7 minutes à 1 000 g. Le culot cellulaire a été repris dans le tampon de lyse et maintenu 15 minutes à 4°C avant d'être à nouveau centrifugé 10 minutes, à 8 000 g et à 4°C. Le surnageant a été récupéré et conservé à -80°C.

#### *b. Extraction des protéines de cellules tumorales*

Les cellules tumorales ont étéensemencées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> à la densité de 5000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les MDA-MB-231, 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les MCF-7 et 9 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les SKBR3. Les cellules MCF-7 SKBR3 et MDA-MB-231 ont été enrichies par du DHA 10 µM. Les protéines, extraites de façon similaire aux protéines de cellules endothéliales, sont conservées à -80°C

#### *c. Extraction des protéines de tumeurs*

*Les tumeurs utilisées ici proviennent de l'expérimentation animale précédente (dont les principaux résultats ont été présentés dans la partie « objectifs » du manuscrit.*

100 mg de tissu tumoral ont été nécessaires pour réaliser l'extraction protéique. Les échantillons de tumeurs ont été déposés dans le tampon de lyse et broyés à l'ultraturax à petite vitesse (entre 11 000 et 13 000 tours/minutes). Ils ont ensuite été centrifugés pendant 10 minutes à 8 000 g et à 4°C. Le surnageant a été récupéré et stocké à -80°C.

#### *d. Dosage des protéines*

*Principe* : La technique utilisée, dérivée de la méthode du Biuret, est un dosage colorimétrique basé sur la réduction des ions Cu<sup>2+</sup> en ions Cu<sup>+</sup> par les liaisons peptidiques des protéines en milieu alcalin (kit BCA, Interchim, France). L'ajout de l'acide bicinchoninique (BCA) entraîne la chélation des ions Cu<sup>+</sup> et forme un complexe soluble de coloration violette mesurable par spectrophotométrie. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en protéines.

25 µL d'échantillon (5 µL d'échantillon + 20 µL de tampon de lyse) avec 200 µL de réactif BCA ont été déposés dans une plaque 96 puits. L'ensemble a été incubé 30 minutes à 37°C, puis la densité optique a été lue au spectrophotomètre (Spectra Max 190, Molecular devices) à la longueur d'onde de 562 nm. Une gamme étalon, avec des concentrations croissantes de BSA (Bovine Serum Albumin), a également été réalisée. L'équation de la droite de régression obtenue avec cette gamme a été utilisée pour déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon.

## 2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

*Principe* : Les protéines, dénaturées et chargées négativement par le SDS (détergeant ionique qui détruit les structures secondaire et tertiaire des protéines), vont migrer sous l'effet d'un courant électrique dans un gel de polyacrylamide et être séparées en fonction de leur poids moléculaire. Le gel forme un maillage plus ou moins dense (en fonction de son pourcentage d'acrylamide) au travers duquel les protéines vont migrer. Un faible pourcentage d'acrylamide permet de séparer les protéines de haut poids moléculaire, et à l'inverse, les protéines de petit poids sont plus facilement séparées dans un gel de haut pourcentage d'acrylamide.

Le gel de séparation (dans notre cas, à 7,5 % d'acrylamide) a été coulé avant le gel de séparation. La polymérisation des gels est possible grâce à l'ajout de TEMED (N-N'-N'-tétraméthylène diamine) et d'APS (Ammonium persulfate). Le gel de concentration permet de concentrer les échantillons et la formation de puits de dépôt (par l'intermédiaire d'un peigne placé pendant la polymérisation du gel). 20 µg de protéines issues des cellules tumorales et endothéliales et 60 µg des protéines de tumeurs ont été utilisés. 1/5 de tampon d'échantillon 5X contenant l'agent dénaturant (le SDS), un agent réducteur (β-mercaptoéthanol, réduisant les ponts disulfures) et du bleu de bromophénol (permet de visualiser le front de migration) composition tableau XV) a été ajouté aux échantillons. Ces derniers ont ensuite été chauffés 3 minutes à 96°C. En parallèle, un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Standard, Dual Color, Bio-Rad, France) a été déposé dans un des puits du gel.

**Tampon échantillon 5X (pour 10 mL)**

Tris-HCL (1,56 M, pH 6,8)	2 mL
SDS	1 g
β-mercaptoéthanol (14,3 M)	2,5 mL
Glycérol	5 mL
Bleu de bromophénol	une pincée
H2O	Qsp 10 mL

**Tableau XV : Composition du tampon d'échantillon 5X**

La migration des protéines a été réalisée à un voltage constant de 150 volt pendant 1 heure et 30 minutes dans du tampon d'électrophorèse (Tris base : 25 mM, SDS : 0,1 %, Glycine : 192 mM, pH : 8,3)

### 3. Électrotransfert des protéines sur membrane PVDF

Les protéines sont transférées sur une membrane synthétique PVDF (Immobilon P transfert membrane, Millipore, France) dans un module de transfert (Bio-Rad) en présence de tampon de transfert (Tris base : 30,9 mM, Glycine : 239 mM, Méthanol : 20 %, pH : 8,3). De la cathode (-) vers l'anode (+), ont été déposés : une éponge et une feuille de papier Whatmann imbibées de tampon de transfert, le gel contenant les protéines, la membrane PVDF (préalablement activée dans du méthanol puis réhydratée dans du tampon de transfert) et à nouveau une feuille de papier Whatmann et une éponge imbibées de tampon de transfert. Le transfert a été réalisé à ampérage constant (120 mA par gel) pendant 90 minutes.

### 4. Hybridation des anticorps et révélation.

Après le transfert, la membrane a été incubée pendant 1 heure sous agitation à température ambiante dans 10 mL de TTBS (Tris base : 10 mM, NaCl : 150 mM et Tween 0,1 %) contenant 3 % de lait en poudre écrémé. Cette étape permet de saturer en protéines de lait les sites de fixation non spécifique de la membrane. Les anticorps primaires ainsi que les anticorps secondaires (couplés à la peroxydase : HRP) sont dilués dans 5 mL de TTBS (Tween 0,1%) contenant 1 % de lait en poudre écrémé. Le tableau suivant présente les différents anticorps utilisés.

Protéine détectée	Poids moléculaire (kDa)	Anticorps primaire			Anticorps secondaire		
		Références	ESPECE	Dilution	Références	ESPECE	Dilution
<b>VEGFR2</b>	<b>150</b> (forme immature) <b>200</b> (forme intermédiaire glycosylée) <b>230</b> (forme mature glycosylée)	Santa Cruz Sc-6251	Mouse monoclonal	1/200	Southern Biotech 1031-05	Goat anti- mouse	1/2000
<b>VEGFR2-P (Tyr 1175)</b>	<b>150</b> (forme immature) <b>200</b> (forme intermédiaire glycosylée) <b>230</b> (forme mature glycosylée)	Santa Cruz Sc-101819	Rabbit polyclonal	1/50	Santa-cruz sc-2030	Goat anti- rabbit	1/2000
<b>pan Akt</b>	<b>60</b>	Cell signaling 9272	Rabbit polyclonal	1/1000	Santa-cruz sc-2030	Goat anti- rabbit	1/3000
<b>AKT-P (Ser 473)</b>	<b>60</b>	Cell signaling 4051	Mouse monoclonal	1/1000	Southern Biotech 1031-05	Goat anti- mouse	1/2000
<b>eNOS</b>	<b>140</b>	Santa-cruz sc-654	Rabbit polyclonal	1/200	Santa-cruz sc-2030	Goat anti- rabbit	1/3000
<b>eNOS-P (Ser 1177)</b>	<b>140</b>	Santa-cruz sc-12972	Goat polyclonal	1/200	Santa-cruz sc-2354	Mouse anti-goat	1/2000

**Tableau XVI : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les études en western blotting.**

La membrane a été incubée toute la nuit à 4°C sous agitation dans cette solution d'anticorps. La membrane a été lavée 3 fois pendant 12 minutes avec du TTBS (Tween 0,05 %) puis révélée grâce au kit ECL (Pierce® ECL Western blotting Substrate, Thermo-scientific, USA). L'anticorps primaire fixé à la protéine d'intérêt est reconnu par les anticorps secondaires couplé à la peroxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène et crée une chemiluminescence qui est détectée par un film photographique. Le film a été scanné et l'image a été analysée par densitométrie. Les quantifications des bandes obtenues ont été réalisées à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad).

## B. Exploration des gènes impliqués dans l'angiogenèse par PCR quantitative.

Dans un premier temps, l'exploration des gènes impliqués dans l'angiogenèse a été réalisée à l'aide d'un criblage par puces (plaques de 96 puits, Superarray) de 84 gènes (Annexe 1). Six tumeurs par groupe nutritionnels ont été sélectionnées en fonction de leur réponse à la chimiothérapie. Les tumeurs sélectionnées dans le groupe nutritionnel contrôle présentaient une forte densité vasculaire (mesurée par échographie Doppler puissance) ainsi qu'une faible régression de leur taille. A l'inverse, les tumeurs sélectionnées dans le groupe nutritionnel AGPI n-3 présentaient une faible densité vasculaire ainsi qu'une régression importante de leur taille.

Dans un second temps, nous avons élargi l'étude pour quelques gènes sur un plus grand nombre de tumeurs.

### 1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux des tumeurs mammaires de rates a été réalisée dans du TRIZOL (TRIZOL® reagent, Invitrogen) selon le protocole d'extraction fourni par Invitrogen. Chaque extraction a été réalisée à partir de 50 à 100 mg de tissu tumoral congelé. Les échantillons ont été déposés dans un tube contenant 1 mL de TRIZOL puis broyés et homogénéisés à l'ultraturax à petite vitesse (entre 11 000 et 13 000 tours/minute). Après incubation de 5 minutes à température ambiante (dissociation complète des complexes nucléoprotéiques), du chloroforme (0,2 mL par mL de TRIZOL) a été ajouté. L'ensemble a été homogénéisé puis centrifugé 15 minutes à 4°C à 12 000 g (obtention de 3 phases). Les ARN, qui se trouvaient dans la phase aqueuse, ont été récupérés, précipités toute une nuit à -80°C dans de l'isopropanol (0,5 mL), puis culottés par centrifugation à 12 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Après lavage du culot avec de l'éthanol à 75 % (dilué dans de l'eau sans RNase ni DNase) et centrifugation (7 500 g, 4°C, 5 minutes), les ARN ont été dissous dans l'eau sans RNase ni DNase.

Les ARN ont ensuite été purifiés (traitement par de la DNase) à l'aide du kit de purification sur colonne de silice de chez MACHEREY-NAGEL (France, Total RNA Isolation Nucleospin® RNA II) selon le protocole fournit par le fabricant. Les ARN ont été élués avec 50 µL d'eau sans RNase ni DNase puis conservés à -80°C.

## 2. Dosage des ARN

Les ARN ont été dosés en tampon TRIS (5 mM, pH : 8,5) par spectrophotométrie en comparant l'absorbance à 3 longueurs d'onde : 230, 260 et 280 nm. La longueur d'onde 260 nm correspond à l'absorbance maximal des acides nucléiques et permet de déterminer la quantité des ARN présents dans l'échantillon. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg/mL d'ARN totaux simple brin. L'absorbance obtenue à 280 nm reflète la contamination en protéine et celle obtenue à 230 nm reflète la contamination par le solvant utilisé lors de la purification des ARN. Idéalement, le rapport DO (260/280) doit avoisiner 2, signifiant une faible contamination protéique. Le rapport DO (260/230) doit être supérieur à 1,7.

Afin de contrôler l'intégrité des ARN, nous avons réalisé une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % en conditions dénaturantes. Nous avons vérifié sous lumière UV la présence nette de deux bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 18 et 28S et l'absence de smear correspondant à la dégradation des ARN.

## 3. Transcription inverse des ARN en ADN complémentaire

Les ARNm sélectionnés pour l'étude des gènes par puces à oligonucléotides ont été rétrotranscrits à l'aide du kit fourni par le fabricant et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation lors de la PCR quantitative.

Pour l'étude des gènes sur un plus grand nombre de tumeurs, tous les ARNm ont été à nouveau rétrotranscrits à l'aide du kit "Ready-To-Go" (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads, GE Healthcare). Les différents réactifs et enzymes : tampon, nucléotides triphosphates (dNTP), transcriptase inverse (FPLCpure™), RNAGuard™ (pour éviter la dégradation de l'ARN), sont contenus dans des billes sous forme lyophilisée. Les ADNc ainsi obtenus ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation en PCR quantitative.

#### 4. Quantification des ARN : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (Q-PCR)

##### a. Principe de la Q-PCR

Une réaction de PCR comprend 3 étapes (figure 42). Une première étape à 95°C permet la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin. La deuxième étape permet aux amorces spécifiques de la séquence à amplifier de s'hybrider à l'ADN simple brin. La température permettant cette étape est choisie en fonction des amorces utilisées et se situe en général entre 40 et 60°C. Enfin, une troisième étape à 72°C, phase d'élongation, permet à une ADN polymérase (Taq Polymérase) de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice à partir de l'amorce. Ce brin complémentaire est synthétisé grâce aux désoxyribonucléotides (dNTP) libres présents dans le milieu réactionnel. Lors de cette phase, le SYBRGreen (Invitrogen, France) s'intercale dans l'ADN double brin, émet un signal de fluorescence ( $\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 521 \text{ nm}$ ) et nous permet de suivre en temps réel la quantité de matériel nouvellement synthétisé. La mesure de la fluorescence, exprimée en unité relatives de fluorescence : RFU, est réalisée à la fin de la phase d'élongation, quand la totalité de l'ADN synthétisé est sous forme de double brin.

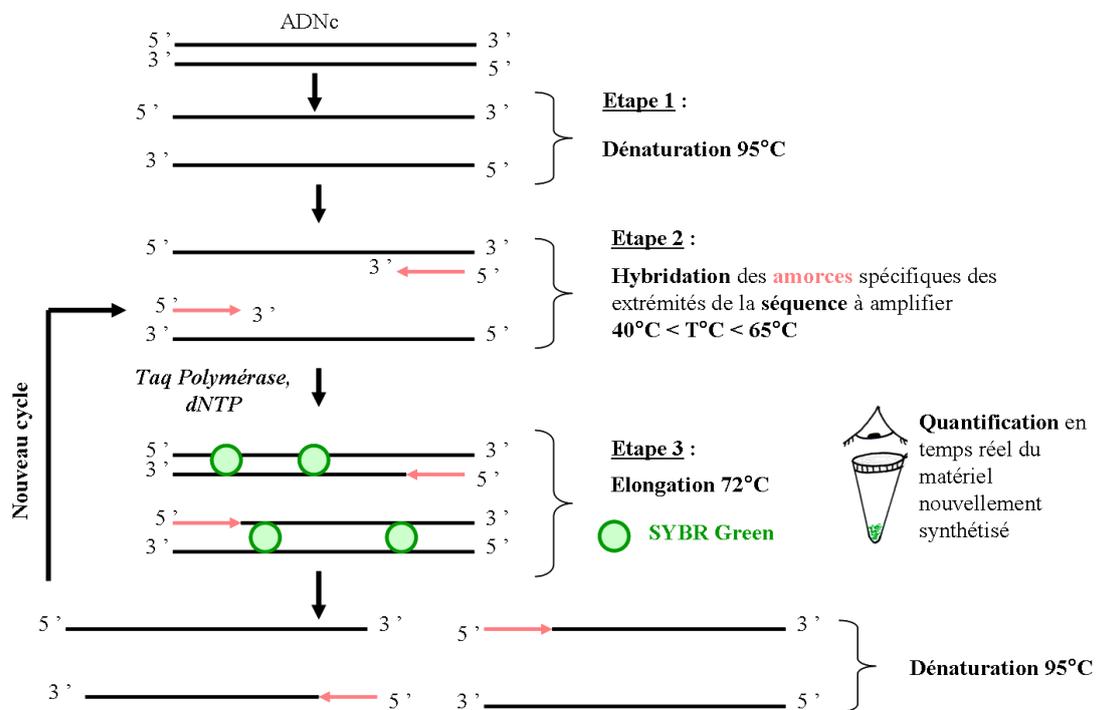
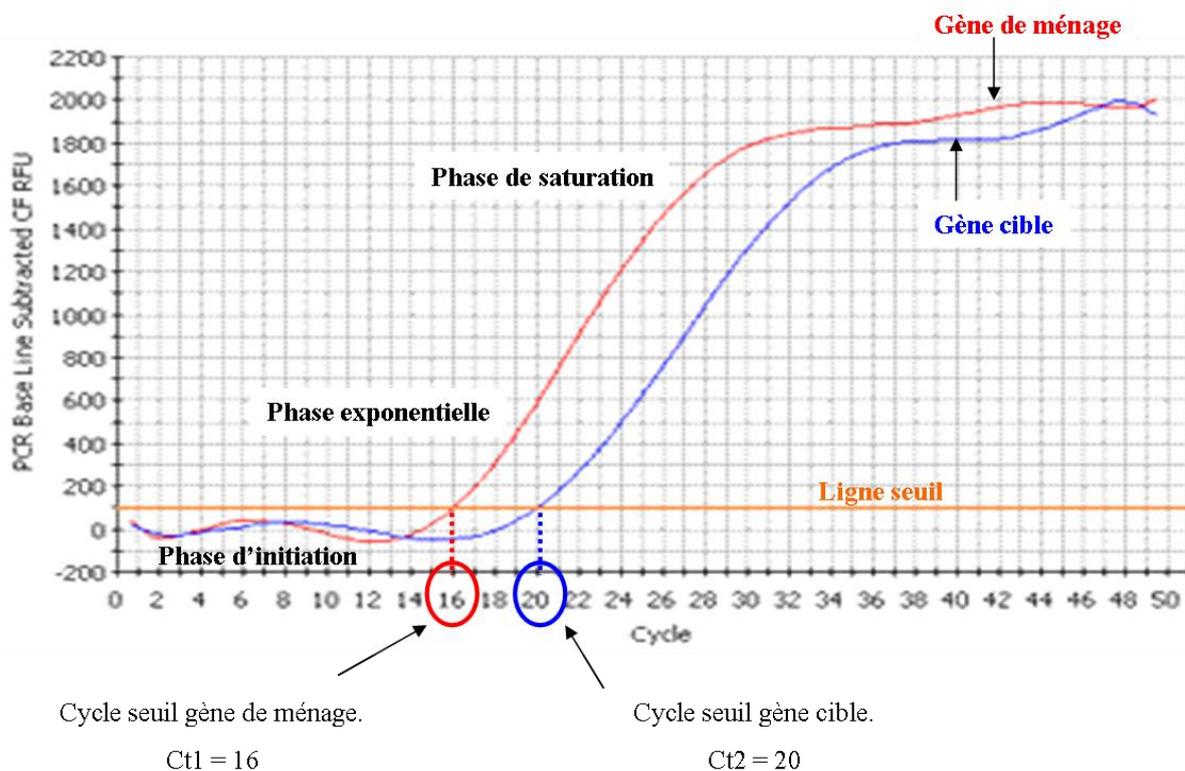


Figure 42 : Les 3 étapes d'une réaction de PCR quantitative.

Au cours de la réaction de PCR, 3 phases sont observées (figure 43). Tout d'abord, *i) une phase d'initiation* au cours de laquelle l'intensité de fluorescence est égale au bruit de fond, signifiant que les amplicons synthétisés ne sont pas en quantité suffisante pour être détecté. Ensuite, nous observons *ii) une phase exponentielle*, où on observe un doublement de la quantité des amplicons à chaque cycle de PCR. L'accumulation des produits de PCR entraîne une variation de la fluorescence suffisante pour que les valeurs de celle-ci dépassent la ligne seuil du bruit de fond. On parle ainsi de cycle seuil ou Ct pour caractériser le nombre de cycles de PCR nécessaires à l'apparition d'un signal de fluorescence. Le Ct est directement lié au nombre de copie d'un gène. Enfin, nous assistons à *iii) une phase de saturation*, où l'accumulation des produits, l'inactivation thermique de l'ADN polymérase ou la diminution des dNTP et des amorces ralentissent puis inhibent la PCR.



**Figure 43 : Suivi en temps réel de l'amplification d'un fragment d'ADNc par PCR.**

L'amplification du fragment d'ADNc est suivie grâce à un agent intercalant fluorescent : le SYBrGreen. La fluorescence est exprimée en RFU en fonction du nombre de cycle de PCR. Trois phases peuvent être identifiées. La phase d'initiation, où la fluorescence est du même ordre que le bruit de fond. Une phase exponentielle, où la fluorescence dépasse la ligne seuil du bruit de fond, permettant de déterminer un cycle seuil ou Ct. Une phase de saturation correspondant à une inhibition de la réaction de PCR.

## b. Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative

Lors de l'analyse des gènes de l'angiogenèse par puces à oligonucléotides, 1 µg d'ADNc a été réparti sur les 96 puits des plaques où chaque puits contient les amorces spécifiques d'un gène. La Q-PCR a été réalisée sur le thermocycler : iCycler (Bio-Rad) selon le protocole fourni par Superarray : 1 cycle de 10 minutes à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C (étape de dénaturation) puis de 1 minutes à 60°C (étape d'hybridation des amorces et d'élongation). Pour déterminer les niveaux d'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse, nous avons utilisé une méthode de quantification relative, la « méthode comparative des Ct » (Livak and Schmittgen 2001). Cette méthode consiste à comparer l'expression d'un gène cible (exprimée en Ct) dans une tumeur du groupe AGPI n-3 à l'expression de ce même gène cible dans une tumeur du groupe contrôle. L'expression de ce gène cible est normalisé par le Ct d'un ou plusieurs gène(s) de ménage. Dans les plaques Superarray, 5 gènes de ménage ont été utilisés : Rplp 1 (protéine ribosomale), Hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase), Rpl13a (protéine ribosomale), Ldha (Lactate déshydrogénase A) et Actb (Actine bêta).

Nous pouvons exprimer un  $\Delta Ct = Ct (\text{gène cible}) - Ct (\text{gène(s) de ménage})$ . La comparaison des  $\Delta Ct$  entre les ARN de tumeurs AGPI n-3 et les ARN de tumeurs contrôle aboutit à :  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{groupe AGPI n-3}) - \Delta Ct (\text{groupe contrôle})$ . Le rapport du taux d'ARNm du gène cible entre les tumeurs AGPI n-3 et les tumeurs contrôle est donné par la formule suivante :  $Q = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ . Cette formule suppose que l'efficacité d'amplification des amorces soit proche de 100 %.

L'analyse des gènes VEGF-B, épiréguline et carbonique anhydrase IX sur un plus grand nombre de tumeurs par PCR quantitative a été réalisée dans des plaques 96 puits avec 2 ng d'ADNc. Le choix des séquences des gènes à amplifier a été effectué à partir de la séquence de nucléotides complète du gène d'intérêt présent dans les bases de données informatiques (GeneBank). Les séquences d'amorces les mieux adaptées pour l'amplification de la séquence d'ADNc ont été sélectionnées. Nous avons utilisé le logiciel Primer 3 qui nous a fourni plusieurs couples d'amorces possibles. La taille du fragment à amplifier, la taille des amorces (qui doit être comprise entre 18 et 30 nucléotides), le pourcentage de GC (compris entre 40 et 60 %) ou encore la température de fusion des amorces (proche de 60°C) nous ont permis de choisir le couple d'amorces adéquat. L'efficacité des amorces a été déterminée au préalable. Chaque puits contient 1 µL des amorces sens et antisens (12,5 pmol/µL), 13 µL de

mix Platinum SYBrGreen® (SYBrGreen®, ADN Taq polymérase, MgCl<sub>2</sub>, dNTP) qsp 25 µL avec de l'eau sans nucléase. Des blancs, obtenus avec le même mélange que ci-dessus mais sans ADNc, sont déposés dans des puits afin de vérifier que la PCR n'amplifie pas de dimère d'amorces. Le programme de température utilisé a été : 1 cycle de 10 minutes à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C (étape de dénaturation) puis de 30 secondes à 52°C (étape d'hybridation des amorces) et de 1 minute à 72°C (étape d'élongation). Deux gènes de ménage ont été utilisés : HRPT et RPL13. Pour l'étude du VEGF-B et de l'épiréguline, nous avons utilisé la méthode du  $\Delta\Delta Ct$ . Concernant l'étude du gène de la CAIX, nous avons déterminé le niveau d'expression du gène en comparant les  $\Delta Ct$  obtenus pour chacun des groupes.

Le tableau suivant présente les séquences d'amorces sens et anti-sens utilisées pour l'étude des gènes du VEGF-B, de l'épiréguline et de la CAIX, ainsi que les séquences d'amorces pour les gènes de ménages, HPRT et RPL13.

<b>Couples d'amorces</b>		
	<b>Sens (5'- 3')</b>	<b>Anti-sens (5'- 3')</b>
<b>VEGFb</b>	AAG TCC GAA TGC AGA TCC TC	CAC ATT GGC TGT GTT CTT CC
<b>CAIX</b>	CTT GGA AGA AAT CGC AGA GG	GCA ACA GTG CAG ATA CAT CCA
<b>Epiréguline</b>	ATA CGT TGC ATT GAC CGT GA	GCG ATT GTA CCA TCT GC
<b>HPRT</b>	CAG GCC AGA CTT TGT TGG AT	TCC ACT TTC GCT GAT GAC AC
<b>RPL13</b>	CTG TGG CAG GGT CTA AAA TG	TCG AAG ACA TTC TGG TAG GG

**Tableau XVII : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'étude des gènes VEGF-B et CAIX. (HPRT et RPL13, sont les gènes de ménages)**

### C. Mesure de la quantité de VEGF-A dans le sérum.

La quantité de VEGF-A présent dans le sérum récolté juste avant le premier traitement par le docétaxel et à la fin des six semaines de chimiothérapie a été déterminée par un test ELISA (kit RayBio® Rat, RayBiotech, Inc).

Le kit RayBio Rat VEGF est un kit de mesure *in vitro* du VEGF dans le sérum de rat. Le kit est composé d'une plaque de 96 puits coatés avec un anticorps spécifique du VEGF-A de rat. Le VEGF présent dans les échantillons (100 µL de sérum par puits) va se fixer à l'anticorps (pendant un temps d'incubation de 2H30). Après lavage, un anticorps biotinylé anti VEGF-A de rat est ajouté dans les puits (incubation 1 heure). Après un nouveau lavage, l'anticorps biotinylé est reconnu par la streptavidine-HRP (incubation de 45 minutes). Une solution contenant le substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) est rajouté pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. La coloration est proportionnelle à la quantité de VEGF présente dans les échantillons. La « solution stop » (dernier réactif), contenant 2M d'acide sulfurique est ajouté. Ce réactif va permettre de passer de la coloration bleue (obtenue par le TMB) à la coloration jaune dont l'intensité est mesurée par spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. Une gamme étalon de VEGF de 0 pg/mL à 200 pg/mL traitée dans les mêmes conditions a permis de déterminer la concentration en VEGF (pg/mL) dans les sérums de tumeurs. La concentration minimale en VEGF détectée par le kit est de l'ordre de 2 pg/mL.

## IV. Analyse statistiques

Les résultats ont été analysés par le test de Mann-Whitney pour les comparaisons deux-à-deux. Lorsque plus de deux conditions sont comparées, une analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test de Newman-Keuls a été utilisée.

Les résultats de la pression interstitielle ont été analysés par une Analyse de Variance (ANOVA) pour mesures répétées suivi d'un test de Fisher (LSD).

Les résultats de l'étude des gènes de l'angiogenèse sur puces à oligonucléotides ont été analysés par un test t (insérés dans un fichier d'analyse sur « Excel » fourni par *Superarray*).

Le test de Spearman a été utilisé pour l'analyse des corrélations.

Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque la valeur de P est  $\leq 0,05$ .

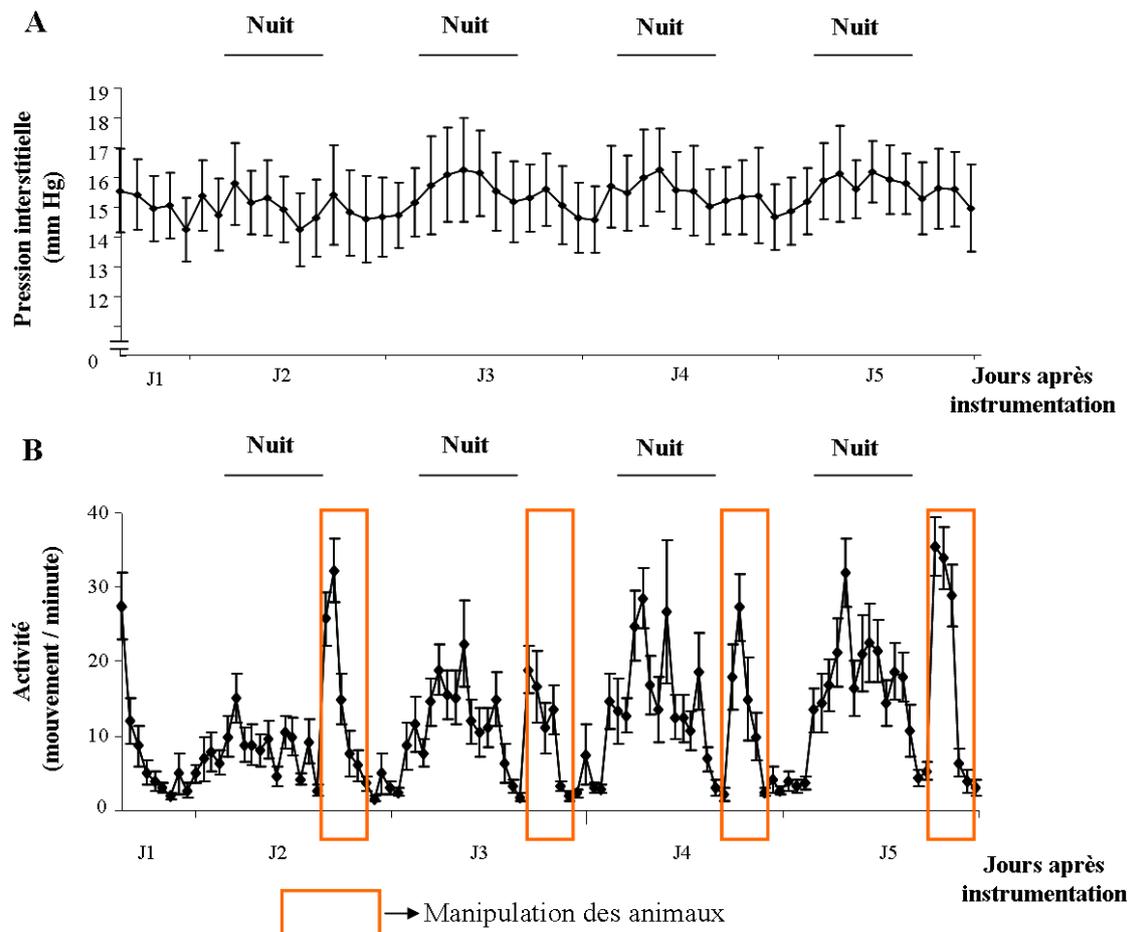
# Résultats

# I. Mise au point de la méthode de mesure de la pression interstitielle dans les tumeurs de rats.

*Préalablement à notre étude principale sur la pression interstitielle, la technique de mesure de la pression interstitielle par télémétrie a été mise au point sur des rates porteuses de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU. Les animaux ont été instrumentés comme expliqué dans la partie « matériels et méthodes ». Dans un premier temps, nous avons observé l'influence du rythme nyctéméral de l'animal sur la pression interstitielle intratumorale. Dans un second temps, nous avons identifié des molécules pouvant moduler cette pression interstitielle afin de valider le fonctionnement de la sonde de pression. Enfin, nous avons vérifié que le docétaxel (agent anticancéreux utilisé au cours de l'étude principale) a un effet sur la pression interstitielle dans notre modèle de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU.*

## A. Evolution de la pression interstitielle tumorale en fonction du rythme nyctéméral de l'animal

La figure ci-dessous montre l'évolution de la pression interstitielle (en mm Hg) pendant 5 jours (figure 44A) ainsi que l'activité locomotrice de l'animal (en mouvement par minutes) enregistrée pendant les mesures de la pression interstitielle (figure 44B). Nous avons observé une récupération de l'activité locomotrice des rats dès le 3<sup>ème</sup> jour après l'implantation du capteur télémétrique. A partir de ce 3<sup>ème</sup> jour, nous avons observé que la pression interstitielle variait en fonction du rythme nyctéméral de l'animal. Les valeurs de pression oscillent entre  $14,9 \pm 1,2$  mm Hg et  $15,9 \pm 1,4$  mm Hg le jour, et entre  $15,2 \pm 1,3$  mm Hg et  $16,5 \pm 1,8$  mm Hg la nuit. La légère augmentation observée la nuit correspond à une augmentation de l'activité de l'animal. Les variations de 1 mm Hg de la pression interstitielle mesurées par le capteur de pression sont considérées comme des variations normales de la pression interstitielle. L'augmentation de l'activité à chaque début de journée (encadré orange de la figure 44B) correspond aux manipulations des cages et des animaux par les animaliers.



**Figure 44 : Variations de la pression interstitielle et de l'activité locomotrice en fonction du rythme nyctéméral de l'animal.**

**A :** Après implantation du capteur de pression dans la tumeur, la pression interstitielle (PI) (mm Hg) est mesurée en continu sur l'animal vigile pendant 5 jours. Chaque point représente la valeur moyenne de la PI  $\pm$  SEM, n = 19.

**B :** L'activité de l'animal, en mouvement par minute, a été mesurée tout le long de l'expérimentation grâce à l'émetteur implanté dans l'abdomen de l'animal. Chaque point représente la moyenne des mouvements par minutes  $\pm$  SEM, n = 19.

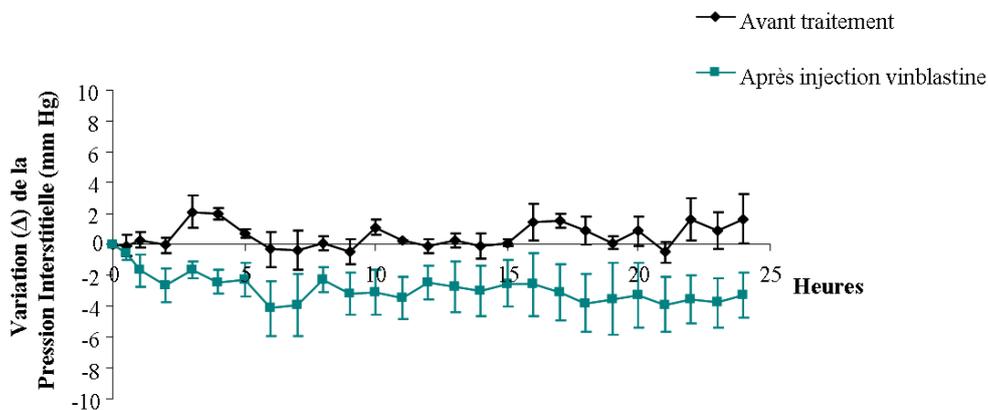
Chaque 24 heures de mesure comprend 12 heures de jour et 12 heures de nuit (la nuit est représentée par des traits sur les schémas).

## B. Effet de la vinblastine et de la prednisolone sur la pression interstitielle

La vinblastine est un agent anticancéreux de la famille des agents tubulo-affins. Cette molécule, connue pour son effet anti-angiogénique (Albertsson et al. 2008), a été décrite pour augmenter la pression interstitielle dans un modèle de gliomes chez le rat (Eikesdal et al. 2002).

Les rates porteuses de tumeurs mammaires instrumentées ont été traitées par une dose unique de Vinblastine (i.p 2mg/kg). Contrairement à l'étude de Eikesdal *et al.* nous avons

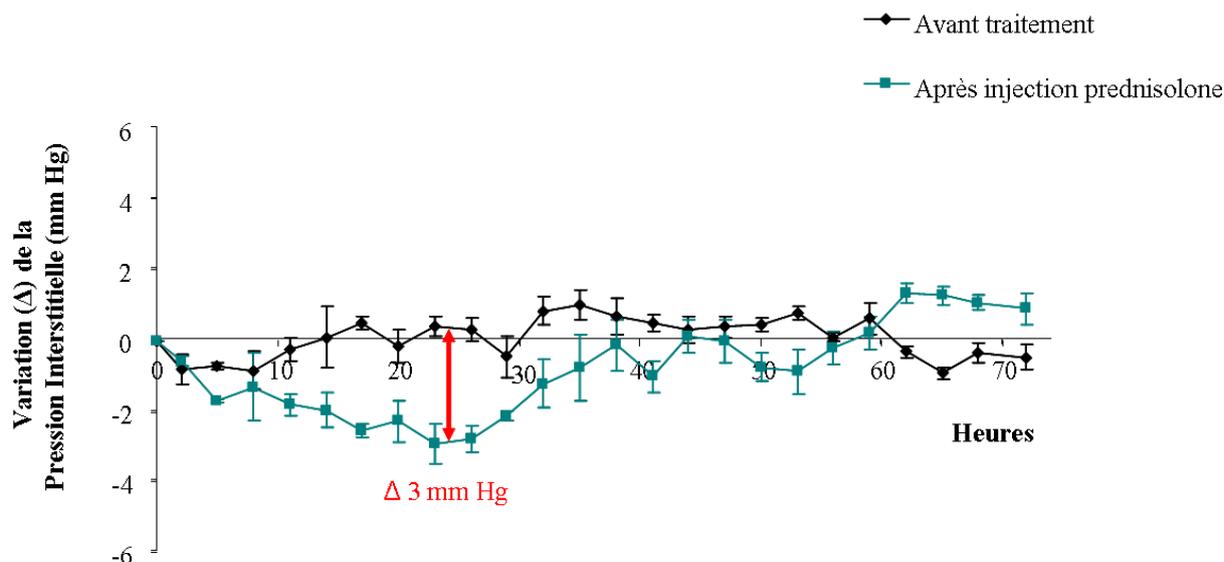
observé une diminution d'environ 4 mm Hg de la pression interstitielle six heures après l'injection. Cette diminution persiste sur 24 heures. Il est à noter qu'une diminution de l'activité des animaux a été observée.



**Figure 45 : Effet de la Vinblastine sur la pression interstitielle des tumeurs.**

Les tumeurs mammaires ont été instrumentées (taille supérieure à 1 cm<sup>2</sup>). La PI a été mesurée 24 heures avant et après l'injection de la Vinblastine (i.p. 2 mg/kg). Les résultats sont exprimés en variation ( $\Delta$ , en mm Hg) de la PI avec comme référence la valeur de la PI 24 heures avant traitement pour la courbe « avant traitement » (courbe noire) et la valeur de le PI juste avant l'injection de la Vinblastine pour la courbe « après injection vinblastine » (courbe verte). Chaque point représente la moyenne des valeurs obtenues pour les 3 rats  $\pm$  SEM.

La seconde molécule testée est un anti-inflammatoire stéroïdien, la prednisolone. Cette molécule diminue l'œdème et la perméabilité vasculaire (Kaal and Vecht 2004). Certains anti-inflammatoires ont été décrits pour diminuer la pression interstitielle tumorale (Kristjansen et al. 1993). Nous avons observé que, sur les 5 rates traitées par de la prednisolone, une dose 40 mg/kg entraîne une diminution de la pression interstitielle de 3 mm Hg en 24 heures sans affecter l'activité locomotrice des animaux (données non montrées). Il faut cependant attendre 48 heures avant que l'effet sur la pression interstitielle s'estompe.



**Figure 46 : Effet de la prednisolone sur la pression interstitielle des tumeurs.**

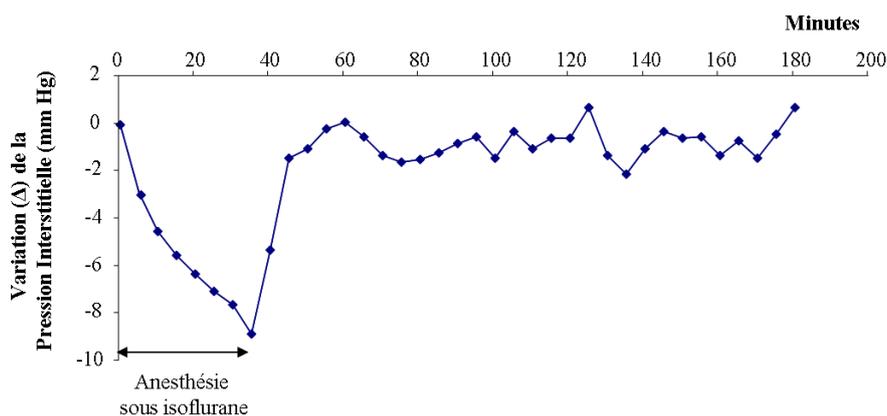
Les tumeurs mammaires ont été instrumentées (taille supérieure à 1 cm<sup>2</sup>). La pression interstitielle a été mesurée 72 heures avant et après l'injection de la Prednisolone (40 mg/kg). Les résultats sont exprimés en variation ( $\Delta$ , en mm Hg) de la PI avec comme référence la valeur de la pression interstitielle 72 heures avant traitement pour la courbe « avant traitement » (courbe noire) et la valeur de la pression interstitielle juste avant l'injection de la Prednisolone pour la courbe « après injection prednisolone » (courbe verte). Chaque point représente la moyenne des valeurs obtenues pour les 5 rats  $\pm$  SEM.

Les deux molécules présentées ci-dessus, du fait de leur effet persistant à 24 ou 48 heures sur la pression interstitielle, ne pouvaient pas être utilisées comme contrôle positif pour valider l'implantation et le bon fonctionnement de la sonde de pression pour chaque rat lors de l'étude principale.

### C. Effet de l'anesthésie sur la pression interstitielle

Nous avons alors évalué les effets de l'anesthésie, déjà décrite pour diminuer la pression interstitielle (O'Reilly et al. 2005).

Il apparaît qu'une anesthésie par isoflurane (2,5 %) entraîne dès 5 minutes une diminution de 3 mm Hg de la pression interstitielle. Cette diminution atteint 9 mm Hg au bout de 30 minutes d'anesthésie. L'effet sur la pression interstitielle est rapidement réversible. Une fois l'apport d'isoflurane stoppé, la pression interstitielle remonte en 5 minutes à sa valeur de base (Figure 47). Cet effet peut être attribué aux effets de l'isoflurane sur le tonus vasculaire. En effet, l'isoflurane a été décrit pour induire une vasodilatation réversible chez le rat (Larach et al. 1990).

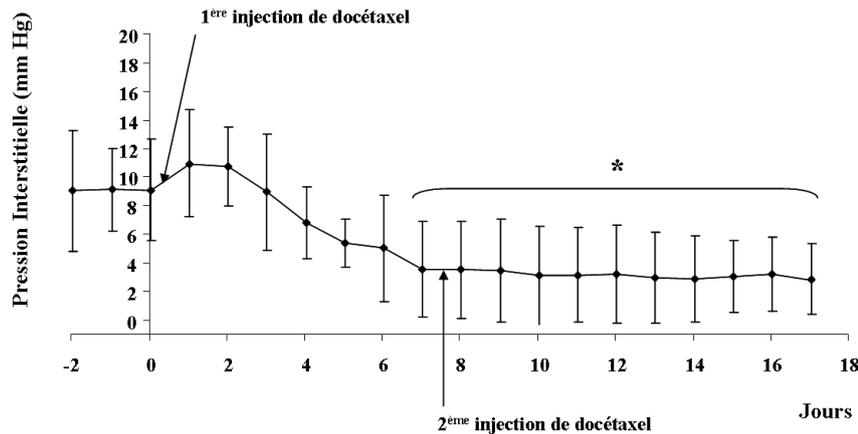


**Figure 47 : Effet de l'anesthésie sur la pression interstitielle des tumeurs mammaires.**

La pression interstitielle a été mesurée avant et pendant une anesthésie de 30 minutes par isoflurane à 2,5 %. Les résultats sont exprimés en variation ( $\Delta$ , en mm Hg) de la PI par rapport à la valeur de la PI juste avant l'anesthésie. Chaque point représente la moyenne des valeurs obtenues pour les 5 animaux.

#### D. Effet du docétaxel sur la pression interstitielle dans notre modèle de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU.

Dans la littérature, il a déjà été décrit que les taxanes diminuent la pression interstitielle tumorale (Taghian et al. 2005). Dans des modèles de tumeurs xéno greffées chez la souris, cette diminution (de l'ordre de 5 mm Hg) a été attribuée à un effet vasodilatateur des taxanes (dose : 40 mg/kg) (Griffon-Etienne et al. 1999). Ici, nous avons montré que le docétaxel, à la dose de 6 mg/kg, a un effet similaire dans le modèle de tumeurs mammaires chimioinduites par le NMU (figure 48). Il diminue progressivement la pression interstitielle. Sept jours après la première injection de docétaxel, la pression interstitielle diminue de 6 mm Hg et se stabilise autour de 4 mm Hg, ce qui fait une diminution de 50% ( $p < 0,05$ ). Une seconde injection de docétaxel n'accroît pas cette diminution. Il est à noter que cette expérimentation n'a été effectuée que sur 3 tumeurs dont deux d'entre elles présentaient des valeurs de pression interstitielle faibles (environ 6 mm Hg contre 16 mm Hg pour la 3<sup>ème</sup> tumeur).



**Figure 48 : Effet du docétaxel sur la PI dans les tumeurs mammaires.**

La pression interstitielle a été mesurée de façon continue avant et après l'injection de docétaxel (6 mg/kg). Deux injections à une semaine d'intervalle (aux jours 1 et 8) ont été réalisées. Les résultats sont exprimés en mm Hg. \*  $p < 0,05$ , en comparaison au temps J0, t-test paired. Les points représentent la valeur moyenne de la PI  $\pm$  SEM,  $n=3$ .

Il est possible que la diminution de la pression interstitielle observée après l'injection du docétaxel soit due à un effet de l'agent anticancéreux sur la pression systémique. Nous avons mené une étude sur 3 rates non porteuses de tumeurs. A l'aide de la télémétrie, nous avons suivi l'évolution de la pression artérielle avant et après une injection de docétaxel. Aucune modification de la pression artérielle n'a été observée durant les sept jours qui ont suivi l'injection du docétaxel.

## E. Conclusion de l'étude de mise au point de la technique de mesure de la pression interstitielle par télémétrie

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de valider l'utilisation de la télémétrie comme technique de mesure de la pression interstitielle. Nous avons montré que la vinblastine et la prednisolone diminuaient la pression interstitielle (de l'ordre de -3 à -4 mm Hg). L'effet induit par la prednisolone est réversible mais deux jours sont nécessaires pour rétablir une pression interstitielle basale. L'anesthésie diminue quant-à elle la pression interstitielle dès les premières minutes, et son effet est rapidement réversible avec un retour à des valeurs initiales en 5 minutes. Ce test de validation de l'implantation a donc été utilisé au cours de l'étude principale pour chaque rat instrumenté. Pour cela, les rates de l'étude principale ont été anesthésiées jusqu'à l'obtention d'une diminution de la pression interstitielle de 2 ou 3 mm Hg. La durée de l'anesthésie pour chaque animal était d'environ 5 minutes.

Enfin, le docétaxel diminue la pression interstitielle dans notre modèle de tumeurs mammaires après une première injection. Une seule injection semble suffisante puisque la diminution de la pression interstitielle n'est pas accentuée par une seconde injection.

## II. Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la vascularisation tumorale.

*Au cours de l'étude principale, nous avons évalué les conséquences d'un apport alimentaire en AGPI n-3 sur la qualité de la vascularisation tumorale. Dans ce but, les aspects qualitatifs et fonctionnels de la vascularisation ont été appréhendés par l'empreinte vasculaire des tumeurs, par la mesure de l'hypoxie et par les mesures de la pression interstitielle.*

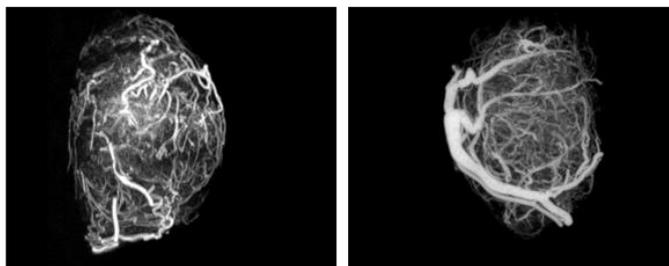
### A. Modulation de la vascularisation tumorale par les AGPI n-3

L'analyse échographique menée au cours de l'expérimentation précédente (figure 31, page 136) a montré que les tumeurs du groupe nutritionnel AGPI n-3 présentaient une densité vasculaire diminuée avant, au cours et en fin de chimiothérapie.

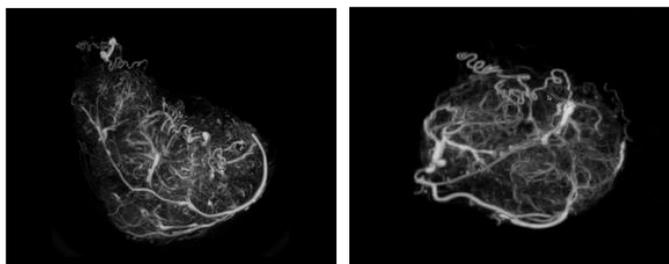
Dans notre étude, des empreintes vasculaires de tumeurs mammaires non traitées par le docétaxel ont été réalisées par injection d'une résine (Pu4ii couplée à un agent de contraste, le Lipiodol) dans la circulation sanguine. Les empreintes vasculaires obtenues pour les tumeurs des deux groupes nutritionnels sont présentées dans la figure 49. En comparaison avec les tumeurs du groupe nutritionnel contrôle, nous avons observé que les AGPI n-3 peuvent remodeler la vascularisation en induisant une diminution de la densité vasculaire mais aussi une diminution du diamètre des vaisseaux. Ces résultats sont accords avec ceux obtenus par échographie avec agent de contraste au cours l'expérimentation précédente (figure 31).

### Empreinte vasculaire (sans chimiothérapie)

Groupe nutritionnel  
contrôle



Groupe nutritionnel  
AGPI n-3

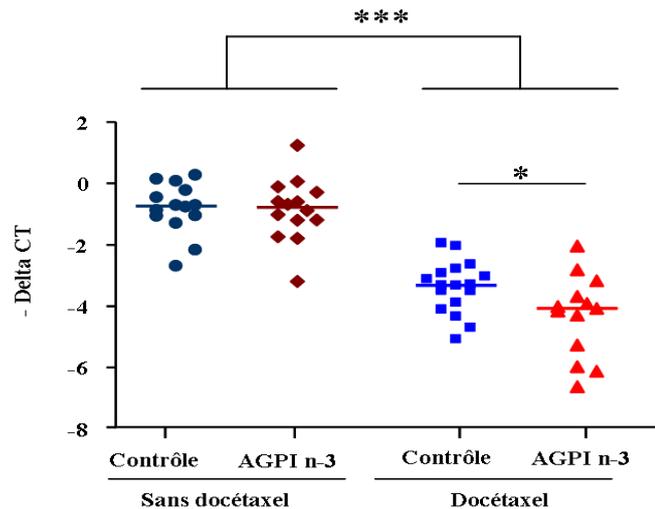


**Figure 49 : Empreinte vasculaire de tumeurs mammaires des deux groupes nutritionnels.**

Représentation en 3 dimensions de la vascularisation obtenues après réalisation des empreintes vasculaire de tumeurs mammaires de rates non traitées par le docétaxel (n=2 par groupe nutritionnel contrôle et AGPI n-3).

## B. Effet du docétaxel et des AGPI n-3 sur l'hypoxie des tumeurs.

Afin de compléter les mesures de pression partielle en oxygène obtenus lors de l'expérimentation animale précédente (Cf. « résultats précédents » partie objectifs), l'impact du docétaxel et des AGPI n-3 sur l'hypoxie des tumeurs a pu être complété en analysant le niveau d'expression de l'ARNm du gène de la carbonique anhydrase IX (CAIX). Ce gène, dont la transcription est induite par HIF-1 $\alpha$ , est un marqueur indirect de l'hypoxie (Brahimi-Horn et al. 2007; Swietach et al. 2007). L'analyse de son ARNm a été effectuée par PCR quantitative en temps réel dans les tumeurs du groupe contrôle et du groupe AGPI n-3 soumises ou non au protocole de chimiothérapie. Les résultats, exprimés en  $-\Delta\text{CT}$ , sont présentés dans la figure ci-dessous. Nous avons observé que le niveau d'expression des ARNm de la CAIX est diminué par le docétaxel dans les deux groupes nutritionnels ( $p < 0,001$ ) et que cette diminution est légèrement plus marquée dans le groupe AGPI n-3 : les médianes sont de - 3,32 pour le groupe contrôle et de -4,02 pour le groupe AGPI n-3 ( $p < 0,05$ ). Cette différence entre les deux groupes nutritionnels n'a pas été observée avant la chimiothérapie malgré le fait que les AGPI n-3 modulent la vascularisation avant le début de la chimiothérapie (mesuré par échographie, cf. figure 31).



**Figure 50 : Effet des AGPI n-3 sur l'expression des ARNm de la carbonique anhydrase IX dans les tumeurs.**

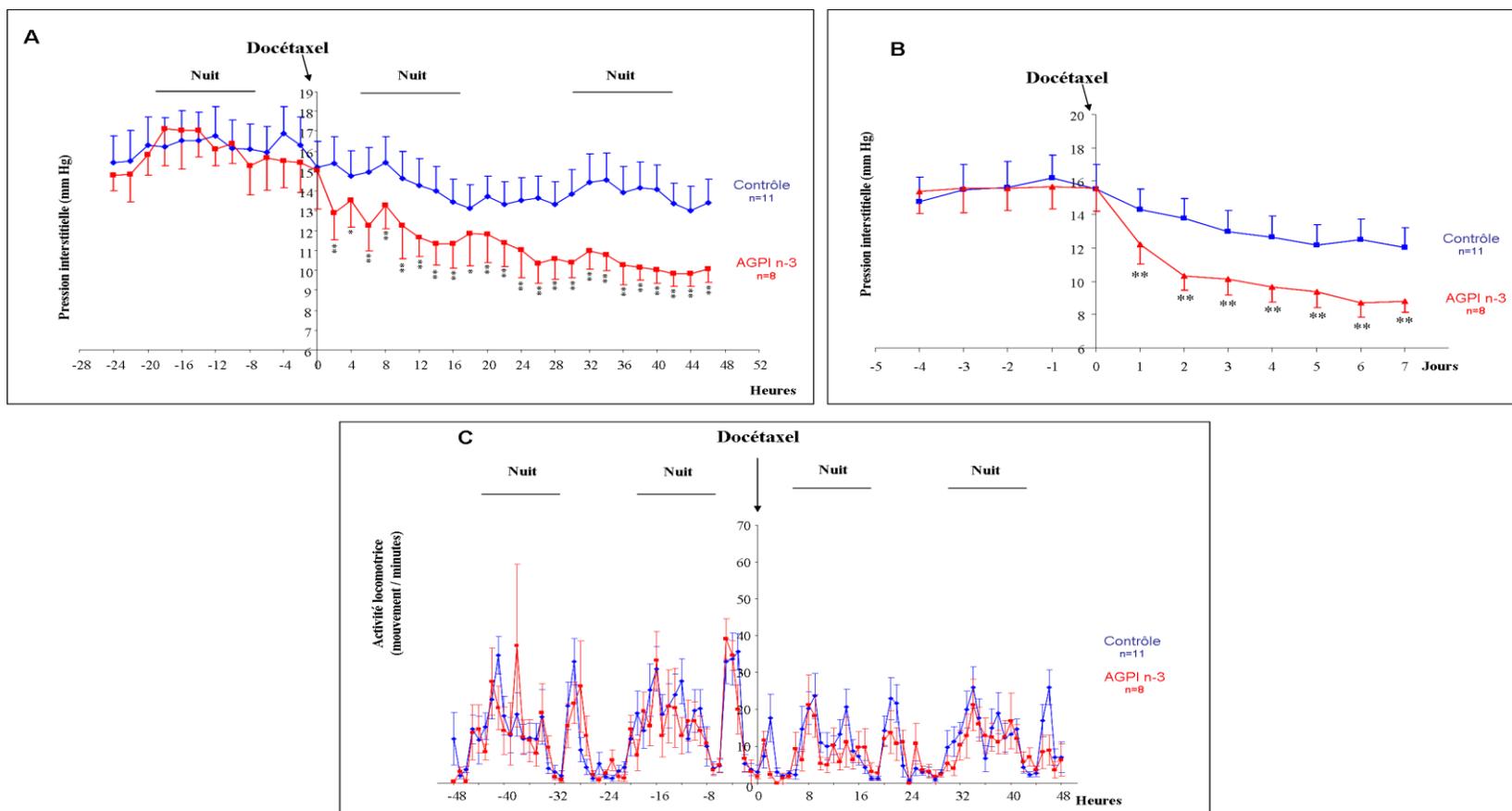
Après extraction, les ARNm de la carbonique anhydrase IX (CAIX) des tumeurs des deux groupes nutritionnels (traitées ou non par le docétaxel) ont été quantifiés par PCR quantitative. Le niveau d'expression des ARNm de la CAIX est exprimé en  $-\Delta CT = -(CT\ CAIX - \text{moyenne } CT\ (HPRT-RPL13))$ . Chaque point correspondant au  $-\Delta CT$  obtenus pour un rat. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , ANOVA suivi du test Newman-Keuls.  $14 < n < 17$  par groupe nutritionnel.

### C. Effet des AGPI n-3 sur la pression interstitielle des tumeurs.

La figure 51A montre l'évolution de la pression interstitielle des tumeurs des deux groupes nutritionnels 24 heures avant et 48 heures après une injection de docétaxel. Les valeurs moyennes de la pression interstitielle mesurée pendant 24 heures avant l'injection ne sont pas significativement différentes entre les 2 groupes nutritionnels. Nous pouvons noter les légères variations liées au rythme nyctéméral des animaux le jour précédent l'injection du docétaxel. Au moment de l'injection, les valeurs de pression interstitielle sont de  $15,2 \pm 1,3$  mm Hg dans le groupe contrôle et de  $15,0 \pm 1,9$  mm Hg dans le groupe AGPI n-3.

48 heures après l'injection de docétaxel, dans le groupe nutritionnel contrôle, la pression interstitielle est diminuée de 15% et se stabilise autour de 13 mm Hg. Dans le groupe nutritionnel AGPI n-3, dès 2 heures après injection de l'anticancéreux, la pression interstitielle est diminuée de 16 % par rapport au groupe contrôle ( $p < 0,01$ ). A 48 heures, les valeurs de pression interstitielle sont de  $13,4 \pm 1,2$  mm Hg dans le groupe contrôle et de  $10,0 \pm 0,6$  mm Hg dans le groupe AGPI n-3, ce qui fait une diminution de -25 % de la pression interstitielle dans le groupe AGPI n-3 ( $p < 0,01$ ). La figure 51B montre l'évolution de la pression interstitielle dans les deux groupes nutritionnels 4 jours avant et 7 jours après

l'injection de docétaxel. La différence significative de 25% ( $p < 0,01$ ) entre les 2 groupes nutritionnels est maintenue jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour après l'injection de docétaxel ( $p < 0,01$ ). Au septième jour, les valeurs moyennes de pression interstitielle sont respectivement de  $12,05 \pm 1,2$  mm Hg et  $8,8 \pm 0,7$  mm Hg dans les groupes contrôle et AGPI n-3.

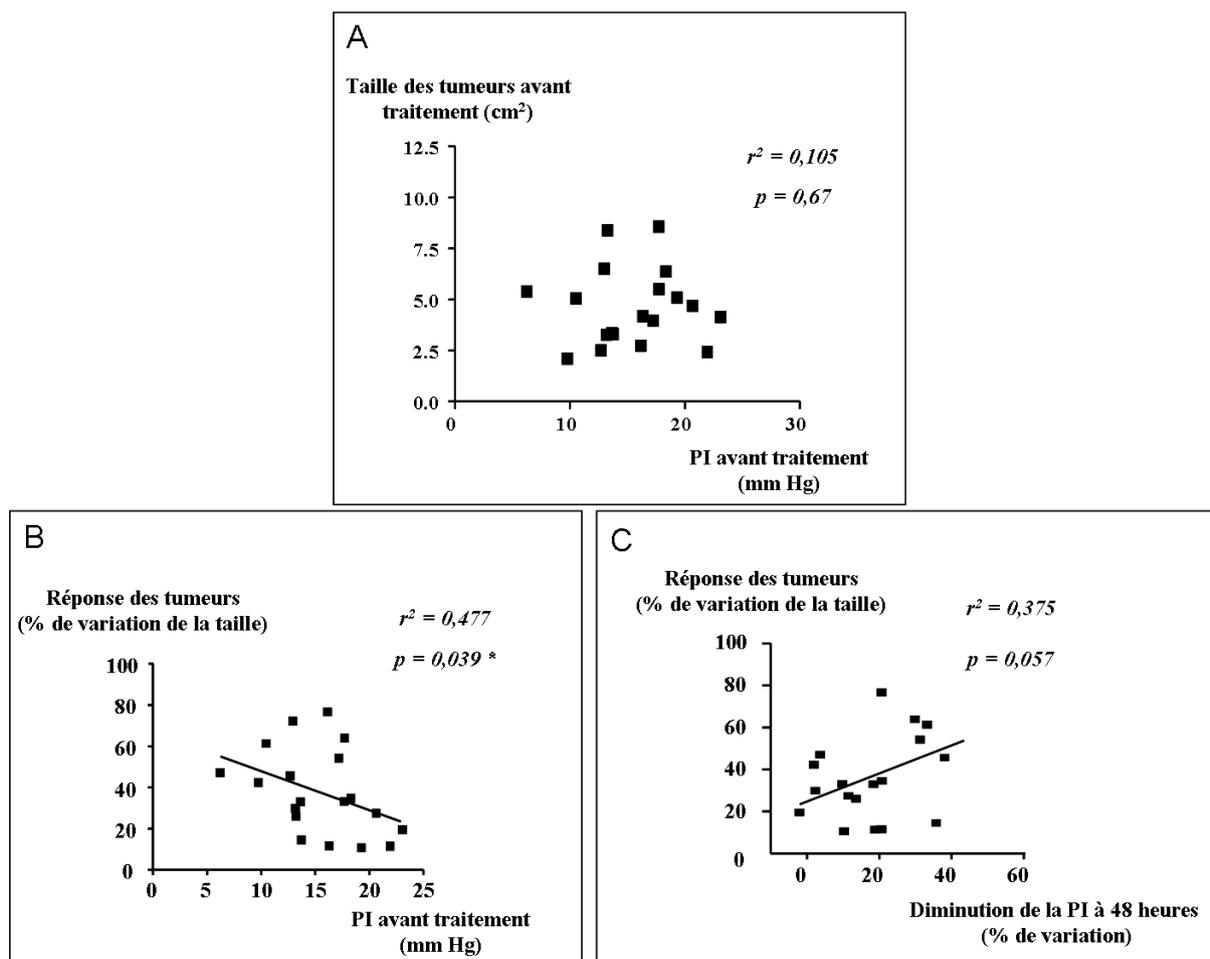


**Figure 51 : Effet des AGPI n-3 sur la pression interstitielle des tumeurs mammaires.**

**A** : Après instrumentation, la PI (en mm Hg) des tumeurs a été mesurée 24 heures avant et 48 heures après une injection de docétaxel. Chaque point représente les valeurs moyennes de PI  $\pm$  SEM (n = 11 rats pour le groupe contrôle et n = 8 pour le groupe AGPI n-3). Les traits horizontaux noirs représentent les cycles de la nuit. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, ANOVA pour mesures répétées suivi d'un post test de FISHER (LSD). **B** : L'évolution de la pression interstitielle (mm Hg) a également été suivie 4 jours avant et 7 jours après l'injection de docétaxel dans les deux groupes nutritionnels. Chaque point représente les valeurs moyennes de PI  $\pm$  SEM (n = 11 rats pour le groupe contrôle et n = 8 pour le groupe AGPI n-3). \*\* p < 0,01, ANOVA pour mesures répétées suivi d'un post test de FISHER (LSD). **C** : L'activité locomotrice des rats a été déterminée grâce à l'émetteur télémétrique. Les résultats sont exprimés en mouvement par minutes. Chaque point représente la moyenne des valeurs d'activité  $\pm$  SEM (n = 11 rats pour le groupe contrôle et n = 8 pour le groupe AGPI n-3). Les traits horizontaux noirs représentent les cycles de la nuit.

La figure 51C montre l'activité locomotrice des animaux dans les 2 groupes nutritionnels. La première nuit après injection du docétaxel l'activité locomotrice des animaux est diminuée mais aucune différence significative entre les 2 groupes nutritionnels n'a été observée. Ces résultats indiquent que la diminution de l'activité locomotrice induite par la chimiothérapie n'est pas accentuée par les AGPI n-3.

Il a été montré qu'une pression interstitielle élevée peut être associée à un mauvais pronostic (Milosevic et al. 2004; Milosevic et al. 2001) ainsi qu'à la mauvaise réponse des tumeurs aux traitements (Ferretti et al. 2009). Avant l'injection de docétaxel, nous n'avons pas vu de corrélation entre les valeurs de pression interstitielle et la taille des tumeurs ( $r^2 = 0,105$ ,  $p = 0,67$  figure 52A). En revanche, nous avons mis en évidence une corrélation entre les valeurs de la pression interstitielle avant traitement (comprises entre 5 et 25 mm Hg) et la réponse des tumeurs au docétaxel ( $r^2 = 0,477$ ,  $p < 0,05$ , Figure 52B). Plus les valeurs de la pression interstitielle avant traitement sont élevées et moins les tumeurs répondent au docétaxel. Nous avons également déterminé qu'il existait une corrélation modérée proche de la significativité entre le pourcentage de diminution de la pression interstitielle à 48 heures et le pourcentage de régression tumorale en fin de chimiothérapie (7 jours après injection) ( $r^2 = 0,38$ ,  $p = 0,057$  Figure 52C). Ainsi, plus la pression interstitielle diminue de manière précoce (48 heures après traitement) et plus la régression des tumeurs sous chimiothérapie est importante.



**Figure 52 : Corrélations entre la pression interstitielle et la réponse des tumeurs au docétaxel.**

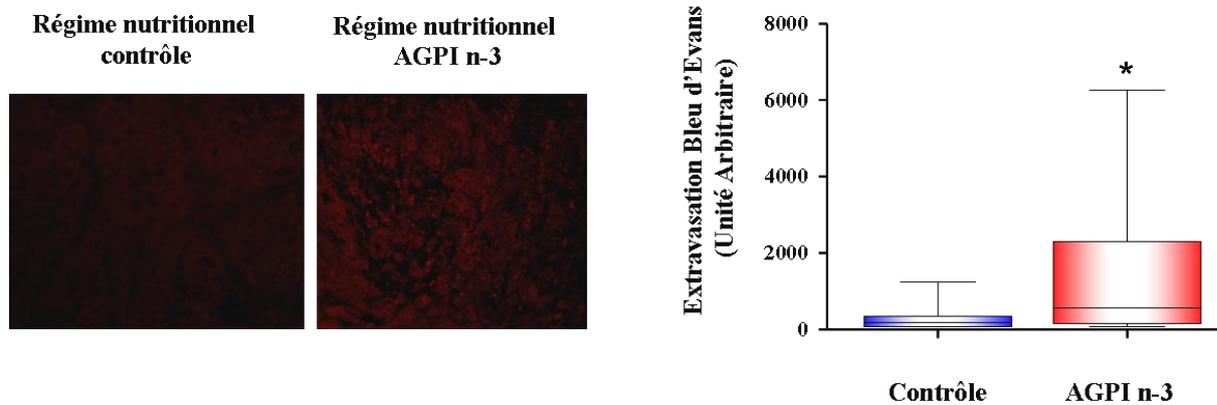
**A :** Absence de corrélation entre la PI (en mm Hg) de chaque tumeur et leur taille (cm<sup>2</sup>) avant l'injection du docétaxel. **B :** Corrélation entre la PI (en mm Hg) de chaque tumeur avant le traitement et la réponse des tumeurs au traitement, évaluée par le % de variation de leur taille. **C :** Corrélation entre l'évolution de la PI en 48 heures après l'injection de docétaxel (% de variation) et la réponse des tumeurs au traitement (% de variation).

Chaque point représente les valeurs individuelles de 19 rates (régimes confondus). \*  $p < 0,05$ , test de Spearman.

## D. Extravasation tissulaire du bleu d'Evans.

L'extravasation du bleu d'Evans dans les tissus tumoraux des rates ayant reçu une injection du colorant a été évaluée par l'analyse de coupes de tumeurs. Cette analyse permet de déterminer la quantité de bleu d'Evans qui passe du compartiment vasculaire vers la tumeur. Deux photos représentatives ainsi que les résultats sont présentés dans la figure 53. L'extravasation du bleu d'Evans est augmentée d'environ 3 fois lorsque les tumeurs sont enrichies en AGPI n-3 ( $p < 0.05$ ). Les pressions interstitielles moyennes des cinq tumeurs sélectionnées dans les groupes contrôle et AGPI n-3 sont de  $15,3 \pm 0,8$  mm Hg et  $11,6 \pm 1,4$  mm Hg respectivement, soit une différence de 25 % en accord avec la différence entre les deux groupes nutritionnels 7 jours après l'injection de docétaxel (figure 51B). Ainsi, cette

étude a montré que la diminution de la pression interstitielle par les AGPI n-3 est associée à une augmentation de l'extravasation du bleu d'Evans.



**Figure 53 : Effet des AGPI n-3 sur l'extravasation du bleu d'Evans dans les tumeurs.**

Une semaine après injection du docétaxel, 5 rates par groupe ont reçu une injection de bleu d'Evans 30 minutes avant l'autopsie. L'extravasation du bleu d'Evans dans les tissus tumoraux a été évaluée par l'analyse sur coupes de tumeurs. Des photos (à gauche) de ces coupes ont été prises sous microscope à fluorescence (3 photos par tumeur). La quantité de bleu d'Evans a été déterminée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images. \*  $p < 0,05$ , test Mann-Whitney.

### III. Effet du DHA sur les propriétés des cellules endothéliales : modélisation *in vitro* des différentes étapes de l'angiogenèse.

*Afin de modéliser les différentes étapes de l'angiogenèse, nous avons mis en place quatre tests in vitro : tests de prolifération, de tubulogenèse (formation de pseudocapillaires), migration et perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales. L'effet du DHA sur ces différentes étapes a été étudié.*

#### A. Effet du DHA sur la prolifération des cellules HUVEC

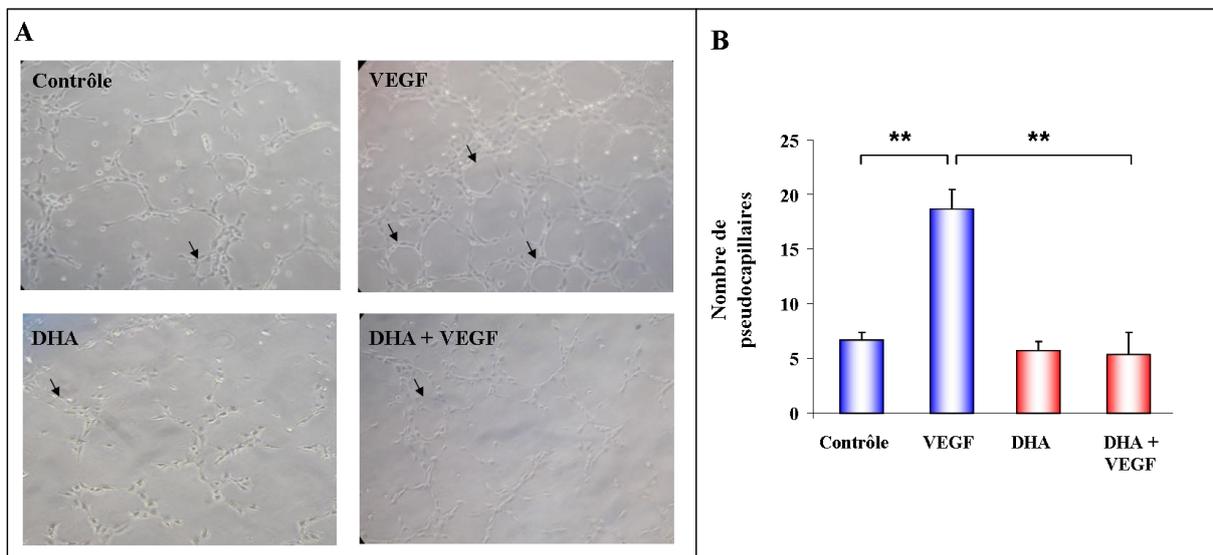
L'effet d'un enrichissement en DHA sur la capacité de prolifération des cellules HUVEC a été déterminé par un test MTT. Les cellules ont été enrichies par des doses croissantes (5, 10, 30  $\mu\text{M}$ ) d'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) ou d'acide oléique à 30  $\mu\text{M}$  (18:1 n-9) pendant 5 jours. Les résultats du test MTT sont présentés dans le Tableau XVIII. Il apparaît que les concentrations de 5 et 10  $\mu\text{M}$  de DHA n'ont pas d'effet inhibiteur sur la prolifération des HUVEC. En revanche, la concentration à 30  $\mu\text{M}$  entraîne une inhibition de la prolifération de 40% ( $p < 0,001$ ) par rapport à la condition contrôle (solvant seul). A 30  $\mu\text{M}$ , l'acide oléique n'affecte pas la prolifération des HUVEC.

	Cellules viables (% par rapport au contrôle)			
DHA 5 $\mu\text{M}$	104,3	$\pm$	2,0	NS
DHA 10 $\mu\text{M}$	101,6	$\pm$	2,4	NS
DHA 30 $\mu\text{M}$	61,4	$\pm$	4,4	***
AO 30 $\mu\text{M}$	100,9	$\pm$	2,2	NS

**Tableau XVIII : Effet du DHA (22:6 n-3) et de l'acide oléique (18:1 n-9) sur la prolifération des HUVEC.** Les HUVEC ont étéensemencées et enrichies pendant 5 jours avec du DHA (5, 10 et 30  $\mu\text{M}$ ), ou avec de l'acide Oléique (30  $\mu\text{M}$ ). La prolifération cellulaire a été évaluée par un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables et normalisé par rapport à la condition contrôle (solvant seul). \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA suivi du test de Newman-Keuls. n=5, moyenne  $\pm$  SEM

## B. Tubulogenèse

La capacité des HUVEC à former des pseudocapillaires a été évaluée sur une couche de Matrigel® et suivie toutes les 30 minutes pendant 3 heures. Comme le montre la figure 54A, le VEGF induit la formation de pseudocapillaires. Cet effet inducteur est maximal entre 1 et 2 heures après l'ensemencement. Au cours de 3 expériences indépendantes, nous avons montré que le nombre de pseudocapillaires est augmenté d'environ 3 fois dans la condition VEGF ( $19 \pm 2$  pseudocapillaires) en comparaison avec la condition contrôle ( $7 \pm 1$  pseudocapillaires) (\*\*  $p < 0,01$ , figure 54B). En revanche, cette induction n'est pas retrouvée lorsque les cellules sont enrichies en DHA ( $5 \pm 2$  pseudocapillaires) (\*\*  $p < 0,01$ , figure 54B).

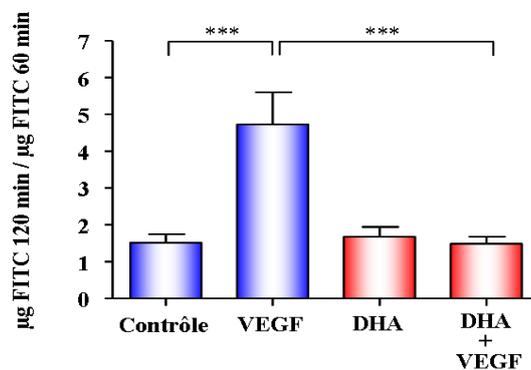


**Figure 54 : Effet du DHA et du VEGF sur la formation de pseudocapillaires par les cellules HUVEC.** Les cellules ont été enrichies ou non par du DHA  $5 \mu\text{M}$  pendant 5 jours puis sont ensemencées sur du Matrigel® en présence ou non de VEGF ( $10 \text{ ng/mL}$ ). **A.** Les photos ont été prises sous microscope au grossissement X 100, 1 à 2 heures après ensemencement. Photos représentatives de 3 expériences indépendantes. **B.** Le nombre de pseudocapillaires a été déterminé dans chaque condition.  $n=3$ , moyenne  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ , ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls.

## C. Perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales

Les effets du DHA et du VEGF ont été testés sur la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales. Pour cela, nous avons quantifié le passage de la molécule FITC-dextran au travers d'une monocouche de cellules HUVEC. Les résultats sont présentés dans la figure 55. Dans la condition contrôle, le rapport entre la quantité de FITC mesurée au temps 2 heures et la quantité de FITC mesurée au temps 1 heure est de  $1,5 \pm 0,2$  (calcul du rapport : voir matériels et méthodes). Un rapport supérieur à 1 signifie une augmentation de la

*perméabilité*). Cette légère augmentation de la perméabilité correspond à la perméabilité basale de la monocouche de cellules HUVEC. Dans la condition DHA seul, ce rapport n'est pas significativement différent de la condition contrôle et est de  $1,7 \pm 0,3$ . Dans la condition VEGF, il est de  $4,7 \pm 0,8$ . Le VEGF augmente donc la perméabilité d'environ **3 fois** ( $p < 0,001$ ) par rapport à la condition contrôle. Cet effet n'est pas retrouvé lorsque les cellules sont enrichies en DHA puisque le rapport obtenu ( $1,48 \pm 0,2$ ) est similaire à la condition contrôle. Ainsi, **le DHA bloque la perméabilité induite par le VEGF** ( $p < 0,001$ ) sans affecter la perméabilité basale de la monocouche de cellules HUVEC.



**Figure 55 : Effet du DHA et du VEGF sur la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales.**

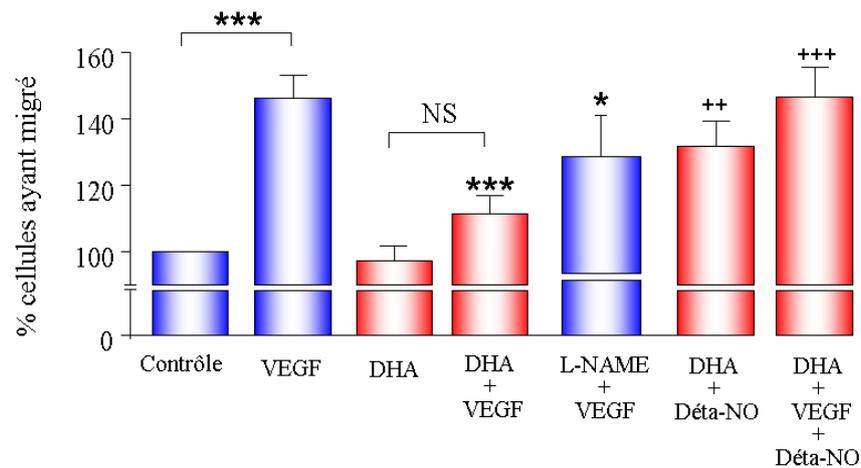
Les cellules HUVEC, ensemencées sur des inserts coâtés par de la fibronectine bovine, sont enrichies ou non par du DHA 1  $\mu$ M pendant 6 jours. Lorsque les cellules forment une monocouche, elles sont stimulées ou non par du VEGF (10 ng/mL) pendant 1 heure. La perméabilité de la monocouche est déterminée par la quantité de FITC-dextran passée dans le compartiment inférieur de la chambre de Boyden et exprimée par le rapport :  $\mu$ g FITC 120minutes /  $\mu$ g FITC 60minutes ( $\mu$ g FITC 120minutes = quantité de FITC 1 heure après l'ajout de VEGF,  $\mu$ g FITC 60minutes = quantité de FITC basale précédant l'ajout de VEGF). Une augmentation de la perméabilité se traduit par un rapport supérieur à 1. Quatre expériences ont été réalisées (moyenne  $\pm$  SEM). \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls.

## D. Migration des cellules endothéliales

L'effet d'un enrichissement en DHA a été évalué sur la migration des cellules endothéliales. Les résultats sont présentés dans la figure 56. La migration des HUVEC (*traitées de manière chronique par le VEGF avant la migration*) est stimulée de 45 % par le VEGF en comparaison à la condition contrôle ( $p < 0,001$ ). La migration des HUVEC est augmentée de façon similaire lorsque les cellules sont stimulées de manière aigüe par le VEGF (*pendant les 5 heures de migration, données non présentées*). En comparaison avec la

condition contrôle, l'induction de la migration par le VEGF est bloquée lorsque les cellules sont enrichies en DHA (5  $\mu$ M) ( $p < 0,001$ ).

Un des principaux médiateurs du VEGF est le NO. L'application d'un inhibiteur de la synthèse du NO, le L-NAME (1mM) diminue la migration induite par le VEGF de 20 % ( $p < 0,05$ ). Inversement, en comparaison avec la condition DHA seul, un donneur de NO (DETA-NO, 10 $\mu$ M) stimule la migration des HUVEC de 30 % ( $p < 0,01$ ). Enfin, alors que le DHA bloque la migration induite par le VEGF, cet effet est annulé par le donneur de NO ( $p < 0,001$ ).



**Figure 56 : Effet du DHA sur la migration induite par le VEGF et implication du NO.**

La migration des HUVEC, pré-enrichies ou non en DHA 5  $\mu$ M, a été réalisée en chambre de Boyden. La migration s'effectue pendant 5 heures. Les résultats (au moins 4 expériences par condition, moyenne  $\pm$  SEM) sont exprimés en pourcentage de cellules ayant migré. ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls :

\*  $P < 0,05$  \*\*\*  $P < 0,001$  en comparaison avec la condition VEGF.

\*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  en comparaison avec la condition DHA.

## IV. Mécanismes d'action du DHA

### A. Régulation de la synthèse du VEGF

Dans les tumeurs mammaires de rats, une analyse par puces à oligonucléotides du niveau d'expression des ARNm de gènes impliqués dans l'angiogenèse (tels que des gènes codant pour des facteurs de croissances, des molécules d'adhésion, ou des protéases) (Annexe 1) a été effectuée. Cette analyse a été effectuée dans les tumeurs mammaires de rates ayant subi 6 semaines de chimiothérapie (n=6 par groupe nutritionnels). Les tumeurs sélectionnées dans le groupe nutritionnel contrôle présentaient une forte densité vasculaire ainsi qu'une faible régression de leur taille. A l'inverse, les tumeurs sélectionnées dans le groupe nutritionnel AGPI n-3 présentaient une faible densité vasculaire ainsi qu'une régression importante de leur taille.

Le tableau XIXA montre les 10 gènes dont la transcription est significativement régulée par les AGPI n-3 sous chimiothérapie. Nous avons observé une diminution de l'expression des gènes de l'épiréguline (de 8 fois,  $p < 0,01$ ) et de la métalloprotéase-3 (de 4 fois,  $p < 0,05$ ). Nous avons également observé une augmentation de l'expression des gènes du VEGF-B (de 4 fois,  $p < 0,01$ ), de l'éphrine A2 (2,4 fois,  $p < 0,05$ ), de l'intégrine bêta-3 (de 2,3 fois,  $p < 0,05$ ), du PDGF-A (de 2,4 fois,  $p < 0,05$ ), du TNF $\alpha$  (de 4,7 fois,  $p < 0,05$ ) et de la métalloprotéase-9 (de 4 fois,  $p < 0,05$ ). En revanche, l'expression de 2 autres isoformes du VEGF, VEGF-A et C n'est pas modifiée par les AGPI n-3 (Tableau XIXB).

Effet des AGPI n-3 sur l'expression des gènes (Tumeurs sous chimiothérapie, n=6 par groupe nutritionnel)				
Nom		Fonction		
A	Epiréguline	Facteur de croissance	-7,81	**
	VEGF-B	Facteur de croissance	2,30	**
	Ephrine A2	Rôle dans l'adhésion cellulaire	2,36	*
	Intégrine bêta 3 (Itgb3)	Molécule d'adhésion cellulaire	2,32	*
	TNF $\alpha$	Cytokine	4,74	*
	PDGF-A	Facteur de croissance	2,38	*
	MMP-3	Enzyme dégradant la matrice extracellulaire	-4,03	*
	MMP-9	Enzyme dégradant la matrice extracellulaire	4,05	*
B	VEGF-A	Facteur de croissance	1,68	NS
	VEGF-C	Facteur de croissance	1,03	NS

**Tableau XIX : Régulation par les AGPI n-3 de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse dans les tumeurs de rats traitées par le docétaxel.**

A l'aide de puces à oligonucléotides, les gènes impliqués dans l'angiogenèse ont été analysés par Q-PCR. Les ARNm des tumeurs de 6 rates par groupe nutritionnel (contrôle et AGPI n-3) et traitées par le docétaxel ont été analysés. Leur quantification relative a été effectuée à l'aide de la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , conduisant à un rapport entre la quantification du gène cible dans les tumeurs du groupe AGPI n-3 et dans les tumeurs du groupe contrôle. Un rapport négatif signifie une diminution de la quantité des ARNm des tumeurs du groupe AGPI n-3. **A** : Sont présentés ici les dix gènes dont l'expression est régulée significativement par les AGPI n-3 en comparaison du régime contrôle. **B** ; Résultats obtenus pour les gènes du VEGF-A et du VEGF-C. NS : non significatif, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  Test t (inséré dans le fichier Excel fourni par Superarray), n=6 par groupe nutritionnel.

Notre étude a été élargie à un plus grand nombre de tumeurs (n=12 tumeurs par groupe nutritionnel) pour les gènes de l'épiréguline et du VEGF-B. Dans cette étude plus exhaustive, l'expression de l'**épiréguline** reste significativement diminuée de **3,8 fois** dans le groupe AGPI n-3 ( $p < 0,001$ ). Cette diminution a été corrélée au pourcentage de régression des tumeurs du groupe AGPI n-3 observé après 6 semaines de chimiothérapie ( $r^2 = 0,89$ ,  $p < 0,001$ , test de Spearman).

L'augmentation de l'expression du gène du VEGF-B (de 2,3 fois) observée précédemment à l'aide des puces à oligonucléotides n'a pas été retrouvée (augmentation non significative de 1,3 fois) sur un nombre plus conséquent de tumeurs.

Cette étude a été complétée par une analyse de la quantité de VEGF-A dans le sérum des rats des 2 groupes nutritionnels avant et après chimiothérapie. En fin de chimiothérapie, le docétaxel diminue le taux de VEGF-A sérique de 63 % dans le groupe contrôle et de 70 % dans le groupe AGPI n-3 (Tableau XX,  $p < 0,01$ ). La différence observée entre les deux groupes nutritionnels n'est significative.

Ainsi, nous n'avons pas observé d'effet des AGPI n-3 ni sur le taux plasmatique de VEGF-A ni sur la transcription des VEGF-A, VEGF-B et VEGF-C.

**Quantité de VEGF-A dans le sérum (pg / mL)**

<b>Chimiothérapie (semaines)</b>	<b>0</b>		<b>6</b>		
Groupe Contrôle	18,9	± 3,2	7,0	± 2,8	**
Groupe AGPI n-3	23,7	± 4,1	6,7	± 2,0	**

**Tableau XX : Effet des AGPI n-3 et du docétaxel sur les taux de VEGF-A sérique.**

La quantité de VEGF-A (pg/mL) présent dans les sérums de rats avant et après chimiothérapie, a été déterminée à l'aide d'un test ELISA (n=16 par groupe, moyenne ± SEM). \*\*  $p < 0,01$ , test Mann-Whitney.

## B. Analyse de la voie de signalisation VEGF / Akt / eNOS.

*In vitro*, les AGPI n-3 bloquent la migration et la formation de pseudocapillaires des cellules endothéliales induites par le VEGF.

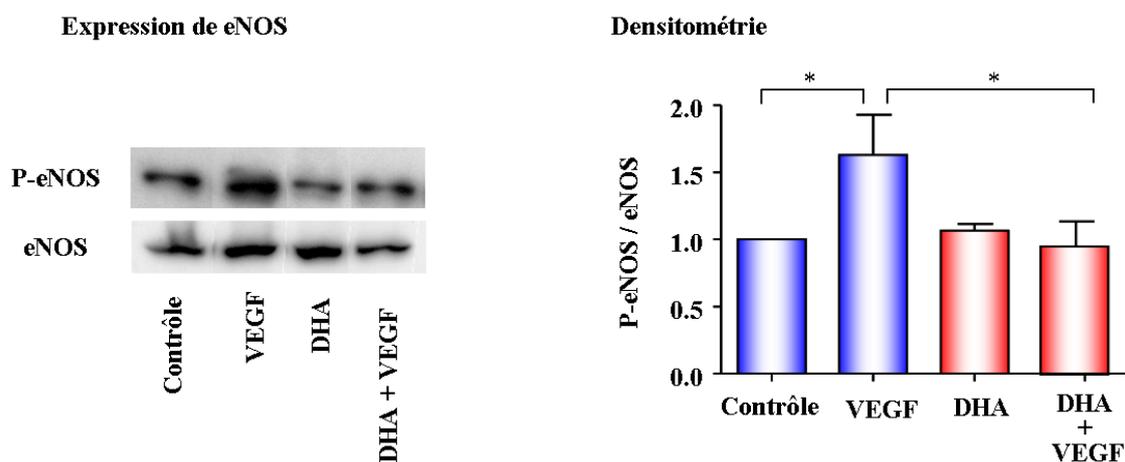
Le NO étant un médiateur majeur du VEGF, l'effet des AGPI n-3 sur l'activation de la protéine eNOS (impliquant sa phosphorylation) a été étudié au niveau des cellules endothéliales et des tumeurs mammaires. Nous avons ensuite élargi cette étude aux cellules tumorales mammaires en culture.

La protéine eNOS est phosphorylée par la protéine AKT active (phosphorylée) après la fixation du VEGF à ses récepteurs (Cf. figure 12). Nous avons également étudié l'expression d'AKT et du VEGFR2 ainsi que leurs formes phosphorylées.

## 1. Effet des AGPI n-3 sur la voie de signalisation VEGF / AKT / eNOS dans les cellules endothéliales.

### a. Expression de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée.

Le niveau d'expression de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée (forme active) a été étudié par western blotting dans les cellules HUVEC. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 57. Suite à une analyse densitométrique (P-eNOS / eNOS), nous avons observé que la quantité de protéine eNOS phosphorylée au niveau du résidu sérine 1177 était augmentée de 50 % lorsque les HUVEC sont stimulées par du VEGF ( $p < 0,05$ ). En revanche, cette activation est bloquée lorsque les cellules sont enrichies en DHA ( $p < 0,05$ ).



**Figure 57 : Expression de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée dans les cellules endothéliales.** Les cellules HUVEC ont été enrichies en DHA 5  $\mu$ M pendant 5 jours et stimulées pendant 1 heure par du VEGF (10ng/mL). L'expression de la eNOS et de sa forme phosphorylée au niveau de la Sérine 1177 ont été déterminées par western blotting (*gauche*). Après analyse par densitométrie (*droite*), le rapport entre P-eNOS et eNOS a été effectué. Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition contrôle. \*  $p < 0,05$ , ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls.  $n=5$ , moyenne  $\pm$  SEM.

### b. Expression de la protéine AKT et de sa forme phosphorylée

Afin de suivre la phosphorylation de la protéine AKT dans le temps, une cinétique de stimulation des cellules HUVEC par du VEGF (10, 20, 30 et 60 minutes) a été réalisée. La phosphorylation de la protéine AKT est donnée par le rapport entre AKT-P et pan AKT après analyse par densitométrie des westerns blot ( $n=2$ , tableau XXI). Dès 10 minutes, le VEGF induit la phosphorylation de la protéine AKT d'environ 2 fois et cette induction persiste

jusqu'à 60 minutes. A 10 minutes, un enrichissement des cellules HUVEC en DHA ne modifie pas cette induction. En revanche, aux temps 20, 30 et 60 minutes, l'induction la phosphorylation de la protéine AKT par le VEGF dans les cellules enrichies en DHA est diminuée de 15%, 56% et 30% respectivement. Il est à noter que le DHA seul diminue la phosphorylation d'AKT aux temps 10 et 30 minutes. Cette diminution est due à un problème de dépôt des protéines dans l'une des deux expérimentations.

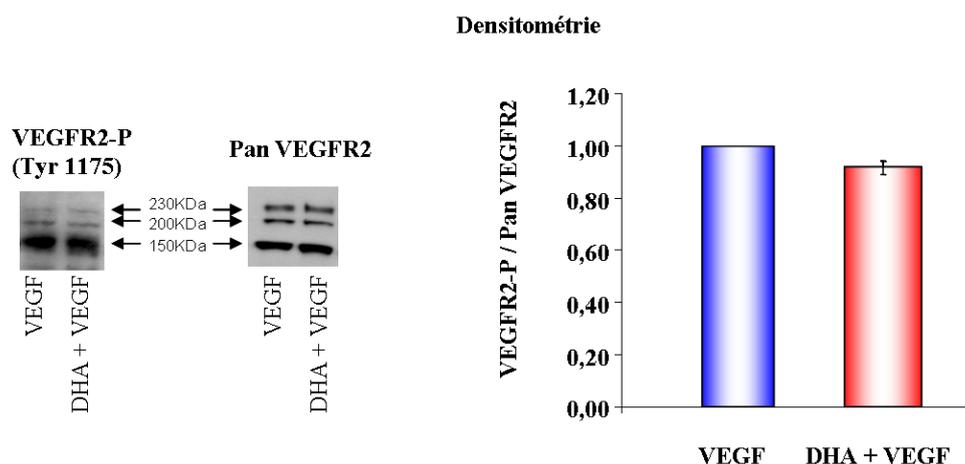
	AKT-P / pan AKT (VEGF 10 min)			AKT-P / pan AKT (VEGF 20 min)			AKT-P / pan AKT (VEGF 30 min)			AKT-P / pan AKT (VEGF 60 min)		
<b>Contrôle</b>	1,00	±	0,00	1,00	±	0,00	1,00	±	0,00	1,00	±	0,00
<b>VEGF</b>	1,90	±	0,70	1,76	±	0,96	1,86	±	0,12	2,26	±	1,16
<b>DHA</b>	0,64	±	0,31	1,02	±	0,35	0,61	±	0,06	1,16	±	0,43
<b>DHA + VEGF</b>	2,07	±	1,10	1,47	±	0,23	0,81	±	0,46	1,62	±	0,26

**Tableau XXI : Cinétique de la phosphorylation de la protéine AKT dans les cellules endothéliales HUVEC.**

Les cellules HUVEC ont été enrichies en DHA 5  $\mu$ M pendant 5 jours. L'expression d'AKT et d'AKT phosphorylée au niveau de la Serine 473 a été déterminée par western blotting. Après analyse par densitométrie, le rapport entre AKT-P et AKT a été effectué, les résultats (n=2, moyenne  $\pm$  SD) ont été normalisés par rapport à la condition contrôle pour chaque temps.

*c. Expression du VEGFR2 et de sa forme phosphorylée.*

Les cellules HUVEC ont été stimulées par du VEGF et enrichies ou non par du DHA. L'analyse du VEGFR2 et du VEGFR2-P Tyr1175 a été réalisée par western blotting (Figure 58). Le VEGFR-2 présente 3 formes. La forme immature (150 KDa) est glycosylée pour former une forme intermédiaire à 200 KDa, puis après une autre glycosylation, la forme 230KDa est exprimée à la surface des cellules (Holmes et al. 2007). Il est apparu qu'un enrichissement en DHA ne semble pas modifier la quantité totale des 3 formes de VEGFR-2 ni la phosphorylation de ce récepteur au niveau du résidu tyrosine 1175.



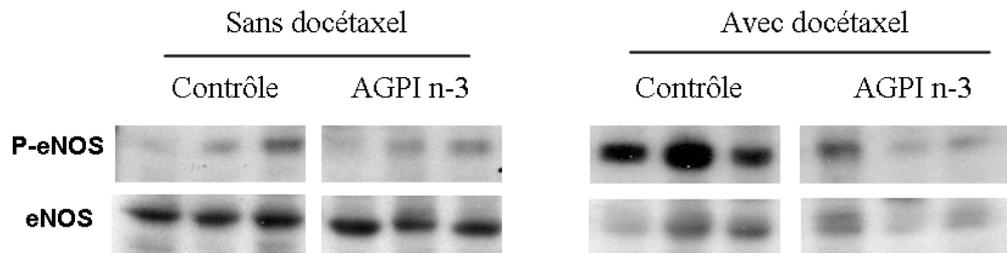
**Figure 58 : Expression du VEGFR2 et de sa forme phosphorylée dans les cellules endothéliales.**  
 En présence de VEGF, les cellules HUVEC ont été enrichies ou non en DHA 5  $\mu$ M pendant 5 jours. L'expression de VEGFR2 et de VEGFR2-P au niveau de la tyrosine 1175 a été déterminée par western blotting (gauche : western représentatif). Après analyse globale par densitométrie des 3 formes du récepteur, le rapport entre VEGFR2-P et pan VEGFR2 a été effectué, les résultats (n=3, moyenne  $\pm$  SEM) ont été normalisés par rapport à la condition contrôle (droite).

## 2. Effet des AGPI n-3 et du docétaxel sur l'expression de la eNOS dans les tumeurs mammaires.

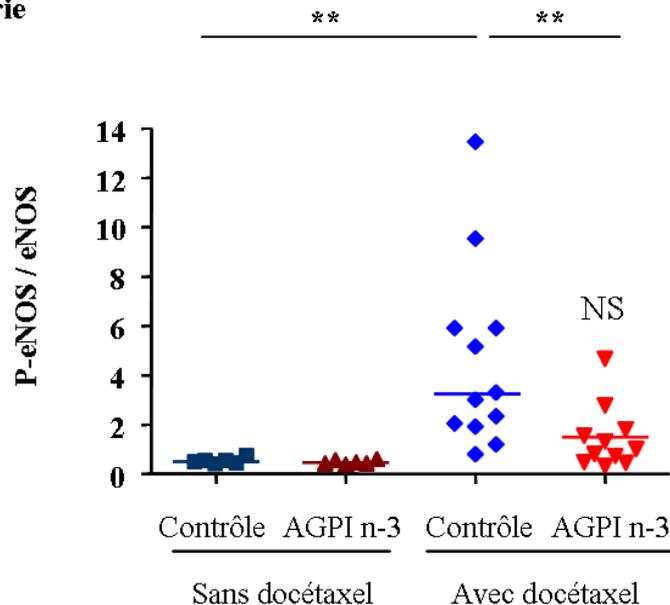
L'étude de la protéine eNOS et de son activation a été étudiée au niveau des protéines des tumeurs mammaires de rats. Les résultats obtenus par western blotting sont représentés dans la figure 59. Par le même type d'analyses densitométriques que pour les cellules HUVEC, nous avons montré que la quantité de eNOS phosphorylée dans les tumeurs non traitées par le docétaxel est faible et qu'elle ne semble pas modifiée par les AGPI n-3 (Figure 59, en haut à gauche). L'application du docétaxel induit la phosphorylation de l'enzyme eNOS dans la condition contrôle ( $p < 0,01$ ) et cette activation de l'enzyme est réprimée dans le groupe AGPI n-3 ( $p < 0,01$ ). Dans les tumeurs du groupe AGPI n-3 avec docétaxel, l'augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de la eNOS n'est pas significative en comparaison tumeurs du groupe AGPI n-3 sans docétaxel.

Nous avons également observé que la quantité totale de la protéine eNOS est diminuée par la chimiothérapie tous régimes confondus ( $p < 0,01$ , test Mann-Whitney).

## Expression de eNOS



## Densitométrie



**Figure 59 : Expression de la protéine eNOS et de sa forme phosphorylée dans les extraits protéiques de tumeurs mammaires de rats.**

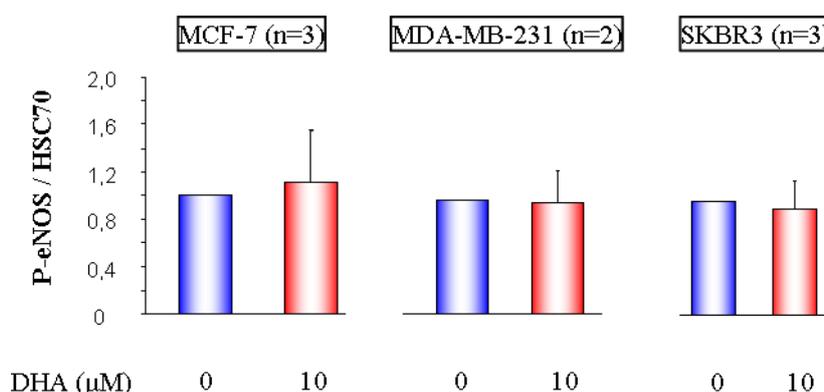
L'expression de la eNOS et de la eNOS phosphorylée au niveau de la Serine 1177 a été déterminée par western blotting. Après analyse par densitométrie, le rapport entre P-eNOS et eNOS a été effectuée. *Haut* : Western blot représentatif. *Bas* : Densitométrie, les rapports P-eNOS / eNOS ont été comparé entre les différents groupes. \*\*  $p < 0,01$ , ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls. Sans docétaxel :  $6 < n < 8$  par groupe ; Avec docétaxel :  $11 < n < 12$  par groupe. Chaque point représente l'analyse obtenue pour une tumeur.

### 3. Effet des AGPI n-3 sur la voie de signalisation VEGF / AKT / eNOS dans les cellules tumorales mammaires.

#### a. Expression de la protéine eNOS phosphorylée.

L'effet d'un enrichissement en DHA sur la phosphorylation de la protéine eNOS dans 3 types de cellules tumorales (MCF-7, MDA-MB-231 et SKBR3) a également été étudié (60). Nous avons observé que ces 3 lignées exprimaient la protéine eNOS phosphorylée. Par

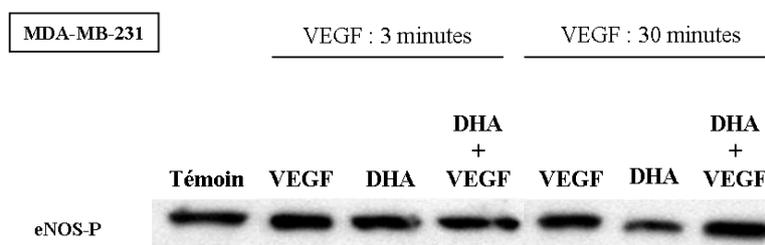
densitométrie, nous avons analysé l'expression de la eNOS phosphorylée en fonction de l'expression de la protéine HSC70 (protéine utilisée comme contrôle de dépôt). En adéquation avec les résultats obtenus dans les cellules HUVEC non stimulées par le VEGF, nous n'avons pas vu de modification de l'expression de la protéine eNOS-P dans les cellules tumorales (MDA-MB-231, SKBR3 et MCF-7) enrichies en DHA.



**Figure 60 : Expression de la protéine eNOS phosphorylée dans les cellules tumorales.**

Les cellules tumorales ont été enrichies en DHA 10 μM pendant 6 jours. L'expression de la protéine eNOS phosphorylée au niveau de la Serine 1177 a été déterminée par western blotting. Après analyse densitométrique, le niveau d'expression de P-eNOS a été rapporté à l'expression de la protéine HSC 70 (protéine utilisée comme contrôle de dépôt). Le rapport obtenu a été normalisé par rapport à la condition contrôle.  $2 < n < 3$ , moyenne  $\pm$  SD.

Dans une expérience préliminaire, nous avons regardé l'effet du VEGF (appliqué pendant 3 et 30 minutes) sur la phosphorylation de la protéine eNOS dans des cellules tumorales MDA-MB-231 enrichies ou non DHA. Le western blotting obtenu est présenté dans la figure suivante. Nous n'avons pas pu conclure d'un effet du VEGF ni du DHA sur la phosphorylation de la protéine eNOS (figure 61). Il est à noter un problème dans le dépôt pour la condition DHA seul au temps 30 minutes.

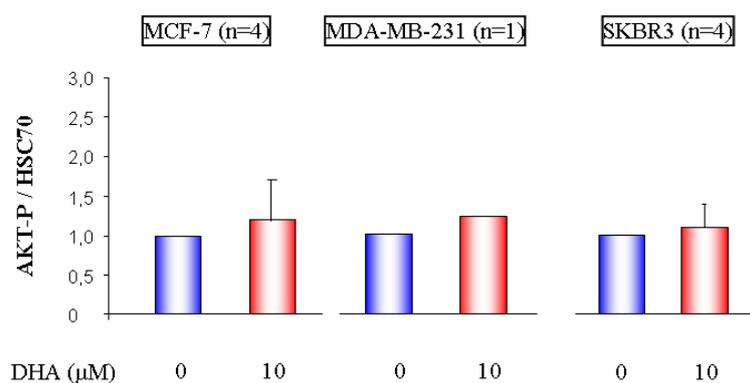


**Figure 61 : Effet du VEGF et du DHA sur la phosphorylation de la protéine eNOS dans les cellules MDA-MB-231.**

Les cellules tumorales ont été enrichies en DHA 10μM pendant 6 jours puis stimulées par du VEGF pendant 3 ou 30 minutes. L'expression de la protéine eNOS phosphorylée au niveau de la Serine 1177 a été déterminée par western blotting (n=1).

### b. Expression de la protéine AKT phosphorylée

L'effet d'un enrichissement en DHA sur la phosphorylation de la protéine AKT dans les cellules tumorales a été étudié. Par densitométrie, nous avons analysé l'expression d'AKT phosphorylée en fonction de l'expression de la protéine HSC70 (protéine utilisée comme contrôle de dépôt). Comme pour la protéine eNOS, nous n'avons pas vu de modification de l'expression de la protéine AKT-P dans les cellules tumorales (MDA-MB-231, SKBR3 et MCF-7) lorsque celles-ci sont enrichies en DHA (figure 62).

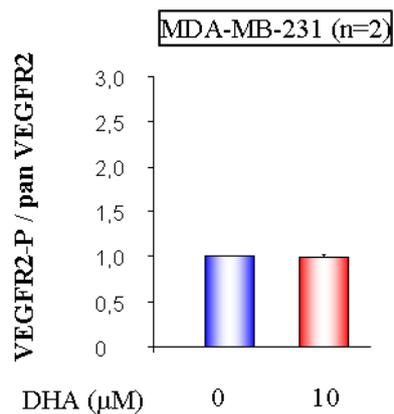


**Figure 62 : Expression d'AKT phosphorylée dans 3 lignées tumorales mammaires.**

Les cellules tumorales ont été enrichies en DHA 10 μM pendant 6 jours. L'expression d'AKT phosphorylée au niveau de la Serine 473 a été déterminée par western blotting. Après analyse densitométrique, le niveau d'expression d'AKT-P a été rapporté à l'expression de la protéine HSC 70 (protéine utilisée comme contrôle de dépôt). Le rapport obtenu a été normalisé par rapport à la condition contrôle. n=1 pour les cellules MDA-MB-231. n = 4 pour les MCF-7 et SKBR3 : moyenne ± SEM.

### c. Expression du VEGFR2 et de sa forme phosphorylée dans les cellules tumorales MDA-MB-231.

Les cellules MDA-MB-231 ont été enrichies ou non par du DHA. L'analyse du VEGFR2 et du VEGFR2-P Tyr1175 a été réalisée par western blotting. Les résultats sont présentés dans la figure 63. Il est apparu qu'un enrichissement en DHA ne modifie pas la quantité totale de VEGFR-2 et ne modifie pas non plus la phosphorylation de ce récepteur au niveau du résidu tyrosine 1175.



**Figure 63 Expression du VEGFR2-P par rapport au VEGFR2 dans les cellules tumorales MDA-MB-231.** Les cellules MDA-MB-231 ont été enrichies en DHA 10 μM pendant 6 jours. L'expression de VEGFR2 et de VEGFR2-P au niveau de la tyrosine 1175 a été déterminée par western blotting (n=2). Après analyse densitométrique, le rapport entre VEGFR2-P et VEGFR2 a été effectué, les résultats (n=2, moyenne ± SD) ont été normalisés par rapport à la condition contrôlée.

## V. Article

S. Kornfeld, C. Goupille, S. Vibet, S. Chevalier, A. Pinet, J. Lebeau, F. Tranquart, P. Bougnoux, E. Martel, A. Maurin, S. Richard, P. Champeroux, K. Mahéo. **Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance.**

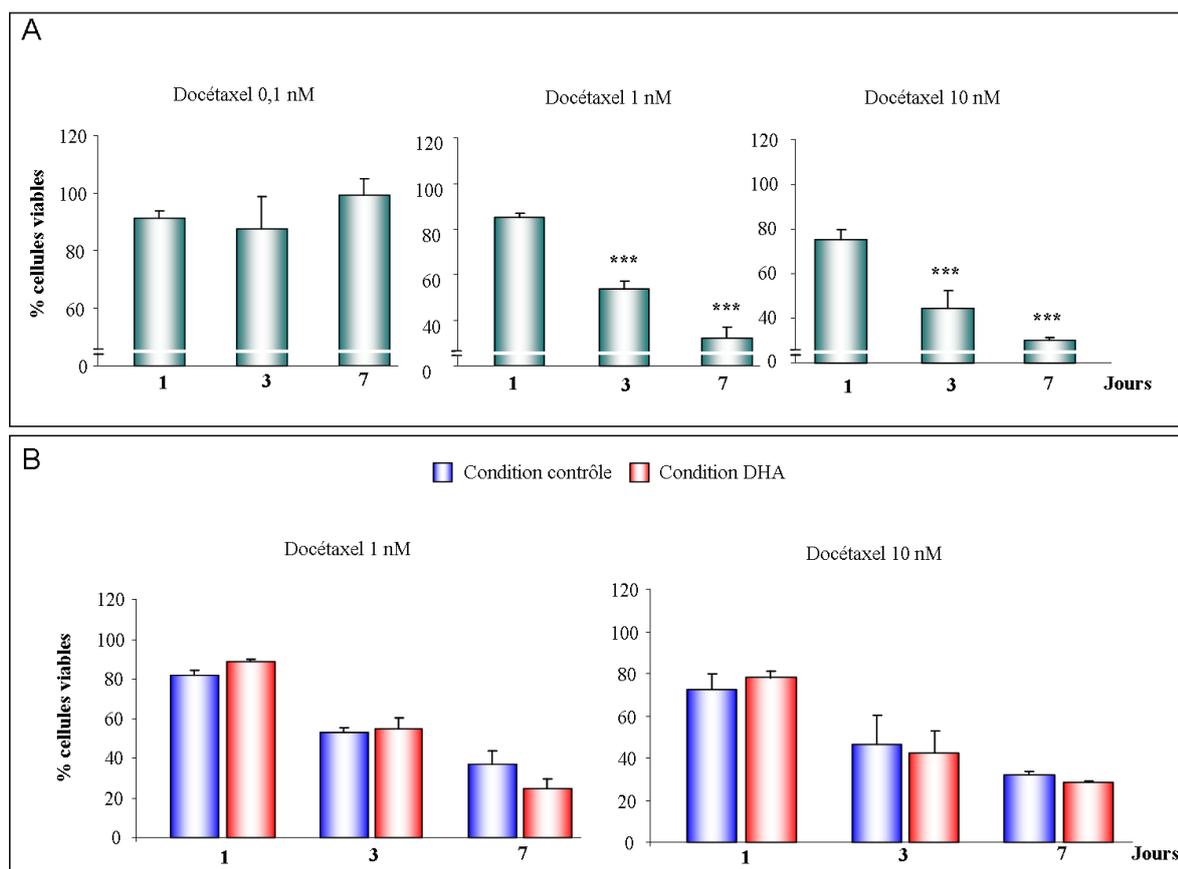
## VI. Résultats complémentaires

### A. Effet du DHA sur la sensibilité des cellules HUVEC au docétaxel.

*Au laboratoire, il a été montré que les AGPI n-3 sensibilisaient les tumeurs mammaires de rats au docétaxel. Il a été observé que cette chimiosensibilisation était associée à une diminution de la quantité vasculaire. In vitro, un enrichissement en DHA des cellules tumorales sensibilisent ces dernières au docétaxel. Au même titre que pour les cellules tumorales, nous nous sommes demandé si un enrichissement en DHA sensibilisait les cellules endothéliales au docétaxel.*

Pour déterminer si le DHA est capable de sensibiliser les cellules endothéliales au docétaxel, les cellules ont été enrichies ou non en DHA 10  $\mu$ M (dose non antiproliférative) pendant 4 jours, puis co-traitées avec du docétaxel aux doses de 0,1, 1 et 10 nM pendant 1 à 7 jours. La prolifération des cellules a été mesurée par un test MTT. La figure 64 présente l'effet antiprolifératif du docétaxel en fonction du temps d'application sur les cellules enrichies ou non en DHA.

Quelque soit le temps d'application, la concentration de 0,1 nM de docétaxel n'affecte pas significativement la prolifération des HUVEC (Figure 64A). Pour la concentration de 1 nM de docétaxel, la prolifération des HUVEC est inhibée de 46 % après 3 jours de traitement et de 68 % après 7 jours ( $p < 0,001$ ). A 10 nM, le docétaxel inhibe la prolifération des cellules 56 % après 3 jours de traitement et de 70 % après 7 jours ( $p < 0,001$ ). Cependant, nous n'avons pas vu d'augmentation de la sensibilité des cellules au docétaxel par le DHA (figure 64B)



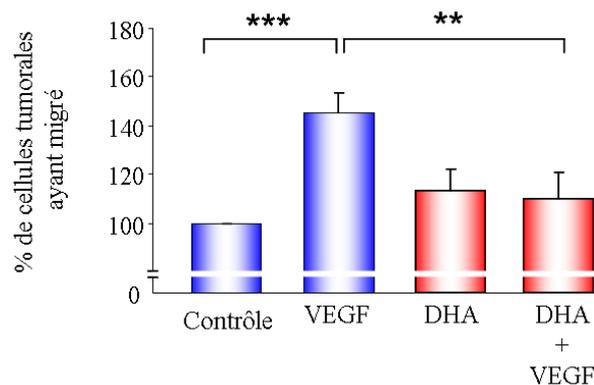
**Figure 64 : Effet du docétaxel sur la prolifération des HUVEC enrichies ou non en DHA.**

Les HUVEC ont été enrichies en DHA 10  $\mu$ M pendant 4 jours avant d'être co-traitées par du docétaxel à 0,1, 1 et 10 nM pendant une durée de 1 à 7 jours. La prolifération / viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT. Les résultats ( $2 < n < 4$  expériences indépendantes, moyenne  $\pm$  SEM) sont exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport à la condition contrôle. \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA suivi d'un post-test de Newman-Keuls

## B. Effet du DHA dans la migration transendothéliale des cellules tumorales.

*Les cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 sont connues pour être invasives. Lors de la formation de métastases, les cellules tumorales entrent dans la circulation sanguine par intravasation. Elles envahissent ensuite les tissus sains par un phénomène d'extravasation : elles vont adhérer aux cellules endothéliales et migrer au travers de l'endothélium. Il a été montré au laboratoire que l'invasion des cellules tumorales MDA-MB-231 était diminuée par un enrichissement en DHA. In vivo, nous avons montrés que les AGPI n-3 régulaient l'expression de certains gènes pouvant être impliqués dans les processus métastatiques (Epiréguline et métalloprotéases, voir tableau XIX). Nous nous sommes intéressés à l'effet du VEGF et du DHA sur la migration transendothéliale des MDA-MB-231, test modélisant l'extravasation des cellules tumorales.*

Dans ces expérimentations de migration transendothéliale, nous avons étudié l'effet du VEGF et du DHA sur la migration des cellules tumorales MDA-MB-231 au travers d'une monocouche de cellules endothéliales. Ces résultats nous montrent que la migration transendothéliale des MDA-MB-231 est augmentée de 45 % lorsque du VEGF (5 ng/mL) est rajouté dans le milieu chimioattractant (figure 65,  $p < 0,001$ ). Lorsque les cellules tumorales et les HUVEC sont enrichies en DHA (10  $\mu$ M), la stimulation de la migration transendothéliale des MDA-MB-231 induite par le VEGF est annulée ( $p < 0,01$ ).



**Figure 65 : Migration transendothéliale des cellules tumorales MDA-MB-231.**

Les cellules endothéliales et tumorales ont été enrichies en DHA 10  $\mu$ M pendant 4 et 5 jours (respectivement). L'expérience est réalisée en chambre de Boyden. Les cellules endothéliales sontensemencées sur des inserts coatés par du collagène IV et les MDA-MB-231 marquées par du Bodipy (traceur fluorescent), sont déposées sur la monocouche formée par les HUVEC. Le VEGF est ajouté à 10 ng/mL. La migration s'effectue sur 14 heures. Les résultats ( $n=3$ , moyenne  $\pm$  SEM) sont exprimés en pourcentage de cellules tumorales ayant migré au travers de la monocouche par rapport à la condition contrôle (HUVEC et MDA-MB-231 non enrichies en DHA et sans VEGF). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls.

## Discussion et perspectives

Cette thèse a eu pour objectifs principaux de déterminer les effets des AGPI n-3 sur la qualité de la vascularisation tumorale et sur les différentes étapes de l'angiogenèse. Nous avons également déterminé quelles étaient les cibles moléculaires impliquées dans l'effet anti-angiogéniques des AGPI n-3.

L'effet anti-angiogénique des AGPI n-3 a été observé *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, à l'aide des empreintes vasculaires des tumeurs mammaires nous avons confirmé la diminution de la densité vasculaire par les AGPI n-3 observée lors de l'étude précédente. Nous avons également montré que les AGPI n-3 amélioraient la qualité de la vascularisation tumorale sous chimiothérapie puisqu'une diminution de la pression interstitielle et une augmentation de l'extravasation du bleu d'Evans ont été observées. Enfin, nous avons mis en évidence que le DHA inhibait *in vitro* les principales étapes de l'angiogenèse induites par le VEGF, qui sont la formation de pseudocapillaires et la migration des cellules endothéliales. Cette étude *in vitro* nous a permis d'identifier la voie de signalisation VEGF/AKT/eNOS comme une des cibles du DHA. En effet, nous avons mis en évidence une diminution de l'activation de la eNOS, suggérant une diminution de la synthèse du NO.

Lors de l'expérimentation animale menée au cours de cette thèse, nous avons observé que les valeurs de pression interstitielle basales (mesurées avant traitement) des tumeurs mammaires variaient entre 5 et 25 mm Hg. Ces variations, conformes aux valeurs obtenues chez l'Homme (Jain et al. 2007) et dans un modèle de tumeurs mammaires chez le rat (Ferretti et al. 2009; Jain et al. 2007), ne sont pas dépendantes de la taille des tumeurs. En effet, nous n'avons pas vu de corrélation entre ces deux paramètres avant la chimiothérapie. Par ailleurs, nous avons montré que la pression interstitielle tumorale basale est corrélée à la réponse des tumeurs mammaires à la chimiothérapie. Ces résultats sont concordants avec la littérature (Ferretti et al. 2009; Milosevic et al. 2004) et suggèrent que la pression interstitielle basale élevée est un facteur prédictif de la résistance des tumeurs aux traitements. Nous avons observé une diminution de la pression interstitielle des tumeurs du groupe AGPI n-3 dans les premières heures qui suivent l'injection de docétaxel. Cette diminution précoce est modérément corrélée à la régression des tumeurs mammaires sous chimiothérapie (7 jours). Ce résultat se rapproche de celui obtenu dans l'étude de Ferretti *et al.* où une corrélation significative a été observée entre la diminution de la pression interstitielle deux jours après l'injection de patupilone (agent anticancéreux tubulo-affin) et la régression tumorale à 6 jours

(Ferretti et al. 2009). Ainsi, nos résultats supportent l'idée que la pression interstitielle joue un rôle majeur dans l'efficacité des traitements anticancéreux et que sa diminution précoce est prédictive de la réponse des tumeurs aux traitements. La diminution de la pression interstitielle par les AGPI n-3 peut présenter un avantage certain dans l'amélioration des traitements anticancéreux en clinique.

Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, la pression interstitielle élevée agit comme une barrière à la pénétration des agents anticancéreux au sein de la tumeur. Dans différents modèles de tumeurs chez le rongeur, plusieurs études ont montré qu'une diminution de la pression interstitielle est associée à une augmentation de la distribution des agents anticancéreux tels que le 5-fluorouracil (Gade et al. 2009), le taxol (Pietras et al. 2002), le CPT-11 (Wildiers et al. 2003) et le topotecan (Dickson et al. 2007). Dans notre étude, nous avons montré que l'extravasation du bleu d'Evans est augmentée dans les tumeurs du groupe AGPI n-3, tumeurs présentant une pression interstitielle plus faible que les tumeurs du groupe contrôle. Nos résultats sont appuyés par ceux de Tong *et al.* où une diminution de la pression interstitielle par le DC101 (molécule anti-angiogénique dirigé contre le VEGFR2) augmente la pénétration de l'albumine au sein de la tumeur (Tong et al. 2004). Ceci suggère que, dans les tumeurs mammaires du groupe AGPI n-3, la pénétration du docétaxel est augmentée suite à une diminution de la pression interstitielle, expliquant ainsi l'amélioration de l'efficacité de la chimiothérapie par les AGPI n-3.

Au laboratoire, il a été observé une augmentation du volume vasculaire sous chimiothérapie par le docétaxel dans le groupe nutritionnel contrôle (Cf. figure 31). Cette augmentation peut-être due à une augmentation du diamètre des vaisseaux ou à une induction de l'angiogenèse. L'hypothèse d'une augmentation du diamètre des vaisseaux semble plus pertinente puisqu'un effet vasodilatateur du docétaxel a déjà été décrit (Griffon-Etienne et al. 1999). De plus, nous avons montré que dans les tumeurs mammaires de rats, le docétaxel induit la phosphorylation de la eNOS (Ser1177). Cette phosphorylation est un mécanisme d'activation majeur de la eNOS aboutissant à la synthèse du NO, molécule connue pour son action vasodilatatrice. Le docétaxel est un agent tubulo-affin qui stabilise les microtubules, empêchant ainsi leur dépolymérisation. Or, il a été décrit que la stabilisation des microtubules augmente l'association de la eNOS au Golgi ainsi que le recrutement de la protéine chaperonne HSP90 et de ce fait augmente la phosphorylation de la eNOS (Ser1177) (Su et al. 2002) (Giustiniani et al. 2009). Dans les tumeurs du groupe nutritionnel AGPI n-3, l'effet vasodilatateur du docétaxel n'a pas été observé, et nous avons mis en évidence une diminution

de l'activation de la eNOS dans les tumeurs mammaires, suggérant une diminution de la synthèse de NO. Ces résultats *in vivo* ont été confortés par l'étude que nous avons menée *in vitro* sur les cellules endothéliales HUVEC. La phosphorylation de la eNOS induite par le VEGF est bloquée lorsque les cellules endothéliales sont enrichies en DHA. De plus, l'induction de la migration des cellules HUVEC est restaurée lorsqu'un donneur exogène de NO est ajouté au milieu de culture des cellules enrichies en DHA. Ces résultats suggèrent que les AGPI n-3 bloquent la voie de synthèse de NO.

Le NO induit également l'hyperperméabilité vasculaire (Maeda et al. 1994; Thibeault et al. 2010), caractéristique de la vascularisation tumorale impliquée dans l'élévation de la pression interstitielle. L'inhibition de la synthèse de NO est d'ailleurs connue pour diminuer l'hyperperméabilité et bloquer l'angiogenèse (Fukumura et al. 2001) (Murohara et al. 1998). Nous avons montré que le DHA bloquait la perméabilité d'une monocouche de cellules HUVEC induite par le VEGF. Ces résultats, en adéquation avec les études ayant utilisés des inhibiteurs de la synthèse de NO (Dimmeler et al. 2000) (Gratton et al. 2003), suggèrent que l'inhibition de la voie de synthèse du NO sous chimiothérapie est un mécanisme expliquant l'effet anti-angiogénique des AGPI n-3 et la diminution de la pression interstitielle.

Nous avons montré que l'inhibition de la eNOS diminue la perméabilité vasculaire et augmente l'extravasation de molécules. L'équipe de Tong *et al.* a mis en évidence que l'inhibition du récepteur au VEGF par le DC101 diminuait la perméabilité et restaurait les gradients de pression, améliorant ainsi le passage des molécules du compartiment vasculaire vers la tumeur (Tong et al. 2004). Les gradients de pression sont instaurés par la pression hydrostatique des capillaires (ou pression microvasculaire) qui s'oppose à la pression interstitielle et la pression oncotique. La résultante de ces trois pressions correspond à la pression nette de filtration, qui dans un tissu normal va dans le sens de la diffusion de molécules de la circulation sanguine vers le tissu. Dans une tumeur, l'hyperperméabilité vasculaire entraîne l'élévation de la pression interstitielle, de ce fait celle-ci égale ou excède la pression microvasculaire. De plus, la fuite de protéines plasmatiques (due à la perméabilité des vaisseaux) fait que la pression oncotique devient négligeable. Ainsi, la pression nette de filtration devient nulle voire négative et s'oppose au passage de molécules vers la tumeur. Nous avons proposé un modèle hypothétique concernant l'effet des AGPI n-3 sur l'extravasation de molécules dans notre modèle de tumeurs mammaires.

Dans le groupe contrôle, avant chimiothérapie, la pression interstitielle tumorale est élevée et égale ou excède la pression microvasculaire, de ce fait la pression nette de filtration est nulle voire négative. Après l'injection du docétaxel, l'activation de la eNOS

pourrait expliquer la vasodilatation des vaisseaux observées dans les tumeurs du groupe contrôle. Une telle vasodilatation a été associée à une diminution de la pression microvasculaire (Griffon-Etienne et al. 1999). Nous avons également observé une légère diminution de la pression interstitielle dans le groupe contrôle après injection du docétaxel. Ainsi, la pression nette de filtration, toujours proche de zéro, entraînerait une stagnation des molécules anticancéreuses autour des vaisseaux (d'où la stabilisation du volume tumoral observée dans le groupe nutritionnel contrôle). Dans le groupe nutritionnel AGPI n-3 soumis au protocole de chimiothérapie, la diminution de la pression interstitielle observée est probablement due à une diminution de la perméabilité vasculaire puisque nous avons observé une diminution de l'activation de la eNOS, suggérant une diminution de la synthèse de NO. De cette façon, les AGPI n-3 induiraient la restauration d'une pression nette de filtration positive dirigée dans le sens de la diffusion des molécules du compartiment vasculaire vers la tumeur. Cette restauration expliquerait l'augmentation de l'extravasation du bleu d'Evans que nous avons observé et pourrait augmenter l'extravasation et l'efficacité des agents anticancéreux. Les résultats concernant l'extravasation du bleu d'Evans suite à une diminution de la pression interstitielle sont cependant controversés. En effet, dans l'étude de Schnell *et al.*, il a été montré qu'une diminution de la pression interstitielle était associée à une diminution de l'extravasation du bleu d'Evans (Schnell et al. 2008). En revanche, les études précliniques ayant étudié le captage des molécules anticancéreuses sont unanimes : la diminution de la pression interstitielle augmente la distribution de l'agent anticancéreux (Dickson et al. 2007; Pietras et al. 2001; Tong et al. 2004; Wildiers et al. 2003). Ainsi, dans notre modèle, doser la quantité de docétaxel présent dans les tumeurs suite à son injection permettrait de vérifier notre hypothèse selon laquelle les AGPI n-3 améliorent la distribution du docétaxel dans les tumeurs mammaires.

Dans la littérature, le docétaxel a été décrit pour avoir des propriétés anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* (Grant et al. 2003) (Sweeney et al. 2001). Nous avons montré que la prolifération des cellules endothéliales HUVEC est diminuée par le docétaxel. Une diminution de la densité vasculaire des tumeurs mammaires de rats a également été observée et a été associée à une meilleure oxygénation de la tumeur puisque nous avons observé une diminution du pourcentage de tumeurs hypoxiques ainsi qu'une diminution importante de l'expression de la carbonique anhydrase IX (marqueur induit par l'hypoxie tumorale). Nos résultats renforcent l'idée que le docétaxel présente une activité anti-angiogénique. Cependant cet effet anti-angiogénique est tardif et n'intervient qu'en fin de chimiothérapie (6 semaines).

Selon le concept proposé par Jain *et al.*, les molécules anti-angiogéniques diminuent la quantité vasculaire mais normalisent également les vaisseaux tumoraux. En effet, après une thérapie anti-angiogénique, ces derniers sont moins perméables, moins dilatés et plus matures car ils présentent un meilleur recouvrement par les péricytes et une normalisation de la membrane basale (Winkler *et al.* 2004). Suite à cette normalisation, une diminution de la pression interstitielle et une augmentation de l'oxygénation tumorales sont observées, suggérant une restauration de la fonctionnalité des vaisseaux tumoraux. La conséquence majeure de la normalisation vasculaire est l'amélioration de l'efficacité des traitements anticancéreux (Jain 2001; Jain 2005). En nous appuyant sur ce concept, nous avons supposé que les AGPI n-3 pourraient normaliser la vascularisation tumorale puisque nous avons observé une diminution de la densité vasculaire, de la pression interstitielle et une amélioration de l'efficacité du docétaxel. Lors de l'étude par puces à oligonucléotides des gènes impliqués dans l'angiogenèse, nous avons mis en évidence que les AGPI n-3, sous chimiothérapie augmentaient l'expression de l'ARNm de la métalloprotéase de type 9 (MMP-9) Ce résultat est un nouvel argument en faveur de la normalisation par les AGPI n-3. En effet, ce résultat est en accord avec l'étude de Winkler *et al.* où il a été montré que la normalisation de la vascularisation induite par le DC101, était associée à une augmentation de l'ARNm de cette enzyme. Les auteurs ont suggéré que l'activité collagénase IV de la MMP-9 induisait la normalisation de la membrane basale des vaisseaux tumoraux et pouvait jouer un rôle dans l'amélioration de la réponse des tumeurs à la radiothérapie (Winkler *et al.* 2004). Ainsi, la modulation de la membrane basale par les AGPI n-3 apparaît comme un mécanisme d'action potentiel supplémentaire et supportent notre hypothèse selon laquelle ces acides gras normalisent la vascularisation tumorale. L'étude de l'expression de la MMP-9, réalisée sur un petit nombre de rats, doit être élargie à un plus grand nombre d'animaux et complétée par une analyse de l'activité de la MMP-9. Il est également nécessaire d'enrichir ces résultats avec une étude plus approfondie de l'architecture des vaisseaux notamment en étudiant, par histologie, l'effet des AGPI n-3 sur le recouvrement des vaisseaux par les péricytes et de la lame basale.

Nous avons observé que le DHA bloquait l'induction des différentes étapes de l'angiogenèse (migration, formation de pseudocapillaires, perméabilité) induites par le VEGF. Nous avons supposé que cet effet anti-angiogénique est dû à un blocage de la voie de signalisation VEGF/AKT/eNOS puisque nous avons mis en évidence que le DHA diminuait la phosphorylation de la eNOS induite par le VEGF. Il reste actuellement à déterminer quels

sont les mécanismes pouvant expliquer cette diminution de l'activation de la eNOS. La protéine kinase AKT est nécessaire à la phosphorylation de la eNOS au niveau du résidu Ser1177 (Dimmeler et al. 2000; Dimmeler et al. 1999; Kawasaki et al. 2003). Dans les cellules endothéliales HUVEC, le DHA a été décrit pour diminuer la phosphorylation de la protéine AKT induite par le VEGF (Schaefer et al. 2008). Dans ce même modèle cellulaire, suite à une stimulation des cellules par du VEGF, nous avons montré que le DHA entraîne une déphosphorylation d'AKT progressive qui coïncide avec l'inhibition de l'activation de la eNOS. La déphosphorylation d'AKT suggère que le DHA régule l'expression de certaines phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de cette protéine. Nous n'avons pas étudié la régulation de phosphatases au cours de cette thèse. Cependant, l'équipe de Ghosh-Choudhury a montré que les AGPI n-3 diminuaient l'expression de PTEN (Ghosh-Choudhury et al. 2009). Cette phosphatase est un antagoniste de PI3K puisqu'elle déphosphoryle PIP3 en PIP2, bloquant ainsi la phosphorylation d'AKT. Ces données suggèrent que le blocage de la voie de signalisation PI3K/AKT semble être un mécanisme potentiel par lequel le DHA diminue l'activation de la eNOS. Cette piste mécanistique mérite d'être plus amplement explorée.

Outre son activation par la protéine AKT, la eNOS est également activée par une augmentation du calcium intracellulaire. Ce dernier est libéré par le réticulum endoplasmique après activation de la phospholipase C- $\gamma$  par le résidu tyr1175 phosphorylé du VEGFR2 (Koch et al. 2011). Dans la littérature il a été suggéré que les AGPI n-3 agissaient au niveau de ce récepteur au VEGF (Rose and Connolly 1999b) en diminuant son expression (Tsuji et al. 2003). A l'heure actuelle, nous n'avons pas pu montrer que le DHA régulaient l'expression et la phosphorylation du VEGFR-2 au niveau du résidu tyr1175 lorsque les cellules endothéliales sont stimulées par le VEGF. Ces résultats sont des données préliminaires et nécessitent d'être reproduits. De plus, il existe plusieurs sites de phosphorylation du VEGFR-2, et quelques études ont mis en évidence que l'activation de la eNOS par le VEGF requiert l'autophosphorylation du résidu Tyr801 (Blanes et al. 2007). Il semblerait que la phosphorylation de ce résidu précède également la phosphorylation des résidus Tyr1054 et Tyr1059 requise pour l'activité maximale du VEGFR-2 (Koch et al. 2011).

*In vitro*, nous avons montré que l'effet anti-angiogénique de DHA n'était pas dû à l'augmentation de la sensibilité des cellules endothéliales au docétaxel. En effet, dans notre modèle de cellules HUVEC l'action anti-proliférative du docétaxel n'est pas augmentée lorsque les cellules sont enrichies en DHA. Cependant, les cellules endothéliales dérivées des

vaisseaux tumoraux sont connues pour avoir des propriétés différentes des cellules endothéliales normales (telles que les HUVEC), pour surexprimer certains récepteurs tels que le VEGFR2 et pour être résistantes à la chimiothérapie (Furuya et al. 2005) (Grange et al. 2006). De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'effet d'un enrichissement en DHA sur les propriétés des cellules endothéliales issues d'un contexte tumoral ainsi que sur leur sensibilité aux agents anticancéreux.

*In vivo*, l'amélioration de l'efficacité du docétaxel n'est pas associée à une augmentation de la toxicité de l'agent anticancéreux sur les animaux. En effet, nous avons observé que la diminution de l'activité locomotrice des rats n'était pas accentuée dans le groupe AGPI n-3 (figure 51). Lors de l'expérimentation animale précédente, ni la formule sanguine et ni le poids des animaux ne diffèrent significativement entre les deux groupes nutritionnels sous chimiothérapie (données non montrées). En accord avec la littérature où il a été montré les AGPI n-3 n'augmentent pas la toxicité de la chimiothérapie (Baumgartner et al. 2004) (Germain et al. 2003; Germain et al. 1999) (Hardman et al. 1999) (Bougnoux et al. 2009), nous avons mis en évidence que les AGPI n-3 n'augmentent pas la toxicité du docétaxel.

Le docétaxel exerce un effet anti-angiogénique à 6 semaines. Ceci peut être dû à une diminution de la synthèse de facteurs pro-angiogéniques puisque nous avons observé une diminution de la quantité de VEGF-A dans le sérum des rates traitées par le docétaxel. Etant donné que les AGPI n-3 diminuent la pression interstitielle des tumeurs mammaires et contrôlent le développement de la vascularisation, nous avons supposé qu'ils modulaient également la synthèse de VEGF. Or, contrairement à l'équipe de Tevar (Tevar et al. 2002), nous n'avons pas vu de modification de la synthèse de VEGF par les AGPI n-3 ni avant ni à la fin de la chimiothérapie. En revanche, une importante diminution de l'épiréguline, ligand de la famille EGF, a été observée dans les tumeurs du groupe AGPI n-3. Cette famille, comprenant sept ligands et quatre récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR ou HER), est impliquée dans la prolifération cellulaire (Normanno et al. 2006). Une sur-activation de cette voie de signalisation est observée dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (Dannenberget al. 2005; Komurasaki et al. 1997). Par ailleurs, dans un modèle de tumeurs mammaires chez la souris, l'inhibition de l'expression de l'épiréguline limite fortement le développement de la tumeur mammaire et de sa vascularisation (Gupta et al. 2007). La diminution de la synthèse de l'épiréguline par les AGPI n-3 peut participer à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales et endothéliales. L'expression des récepteurs à

l'épiréguline n'a pas été quantifiée au cours de cette thèse. Cependant, une diminution de l'expression de HER-2 par les AGPI n-3 a été rapportée dans les lignées tumorales mammaires (Menendez et al. 2005). Ainsi, les AGPI n-3, en inhibant la synthèse de l'épiréguline peuvent limiter le développement de la vascularisation dans notre modèle de tumeurs.

Enfin, nous avons également montré que l'expression de l'ARNm d'une autre métalloprotéase, la MMP-3, était diminuée par les AGPI n-3. L'expression de cette enzyme a été détectée au niveau de tumeurs mammaires et au niveau de métastases ganglionnaires alors qu'elle est peu ou pas exprimée dans les tissus et ganglions lymphatiques normaux (Basset et al. 1990). De plus, l'expression de cette enzyme a été associée au caractère invasif des cellules tumorales MDA-MB-231 *in vitro* (Hegedüs et al. 2008). Ainsi, il est possible que les AGPI n-3, en diminuant l'expression de MMP-3 jouent un rôle dans l'inhibition de la formation de métastases.

### **Perspectives.**

La vascularisation tumorale joue un rôle important dans la formation de métastases puisqu'elle permet aux cellules tumorales d'échapper à la tumeur primaire pour aller coloniser les tissus sains. La pression interstitielle tumorale a été associée à l'envahissement ganglionnaire (Jain and Stylianopoulos 2010). L'hypoxie a quant-à elle été associée à une augmentation de l'invasivité des cellules tumorales (Sullivan and Graham 2007) (Vaupel 2004b). Chacune des cibles des AGPI n-3 que nous avons mis en évidence est impliquée dans la formation de métastases. Le NO induit l'hyperperméabilité vasculaire et peut ainsi faciliter le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine (Ying and Hofseth 2007). De plus, ce facteur est décrit pour induire l'invasion des cellules tumorales (Gauthier et al. 2004) (Orucevic et al. 1999). L'inhibition de la eNOS chez la souris (souris eNOS<sup>-/-</sup>) diminue la perméabilité vasculaire (Fukumura et al. 2001; Gratton et al. 2003) et diminue l'envahissement ganglionnaire par les cellules tumorales (Lahdenranta et al. 2009). Enfin, l'expression de la eNOS a été associée au potentiel métastatique des cellules tumorales (Fukumura et al. 2006). L'épiréguline, quant-à elle, favorise l'extravasation des cellules tumorales au travers de l'endothélium vasculaire (Gupta et al. 2007).

Ainsi, il est possible que le DHA, puisse jouer un rôle dans la formation de métastases. L'extravasation des cellules tumorales correspond à leur passage du compartiment vasculaire vers le tissu sain. Cette propriété peut être modélisée *in vitro* par la technique de la migration

transendothéliale. Au cours de cette thèse, nous avons montré que le DHA inhibe la migration transendothéliale des cellules tumorales mammaires induite par le VEGF. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par l'équipe de Gupta, où l'inhibition de l'épiréguline par des ARN interférants diminue la migration transendothéliale des cellules tumorales (Gupta et al. 2007).

Nous avons émis l'hypothèse que le DHA, en diminuant la perméabilité et la migration des cellules tumorales, pouvait inhiber la formation et la dissémination de métastases. Au cours de cette thèse nous avons initié l'étude de la voie de synthèse du NO dans les cellules tumorales. Nous avons montré que les cellules tumorales mammaires exprimaient les formes phosphorylées d'AKT et de la eNOS. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de régulation par le DHA. Il est donc possible que le DHA inhibe la migration transendothéliale en réduisant la migration/invasion des cellules tumorales par le blocage de l'épiréguline. D'autre part, le DHA, en diminuant l'hyperperméabilité via le blocage de la eNOS au niveau des cellules endothéliales, peut réduire le passage des cellules tumorales au travers de l'endothélium. Un enrichissement en DHA des cellules tumorales ou des cellules endothéliales permettra de déterminer quels types cellulaires sont ciblés par cet AGPI n-3. Les rôles du NO et de l'épiréguline dans l'inhibition de la migration transendothéliale des cellules tumorales pourront être déterminés notamment en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la eNOS et / ou de l'épiréguline. Il serait également intéressant de remplacer le modèle de cellules endothéliales vasculaires (les HUVEC) par un modèle de cellules endothéliales lymphatiques, permettant ainsi de modéliser la formation de métastases lymphatiques.

Outre la eNOS, la NOS inductible, également exprimée dans les tumeurs (Thomsen et al. 1995; Tschugguel et al. 1999) est également impliquée dans la formation de métastases (Fukumura et al. 2006). Nous n'avons pas étudié l'expression de la iNOS dans les cellules tumorales et endothéliales. En revanche, il a été montré que le DHA diminuait l'expression de la iNOS dans les cellules cancéreuses de colon *in vitro* et *in vivo* (Narayanan et al. 2003). Cette piste mériterait également d'être exploitée afin de déterminer si les AGPI n-3 peuvent diminuer la formation de métastases en inhibant la iNOS.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont montré que les AGPI n-3 présentent des propriétés anti-angiogéniques impliquées dans la sensibilisation des tumeurs mammaires aux

taxanes. Ces acides gras diminuent l'activation de la eNOS et diminuent la pression interstitielle tumorale, obstacle majeur à la distribution de l'agent anticancéreux au sein de la tumeur. Cette étude a permis de comprendre comment les AGPI n-3 amélioraient l'efficacité des taxanes par un mécanisme anti-angiogénique. Ainsi, l'apport d'AGPI n-3 au cours de la chimiothérapie pourrait être une stratégie thérapeutique pour normaliser la vascularisation tumorale et de fait augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux.

# Annexes

**Annexe 1** : Liste des gènes impliqués dans l'angiogenèse dont l'expression a été mesurée dans les tumeurs mammaires de rats.

Angiopoietin 2	Leukocyte cell derived chemotaxin 1
Thymoma viral proto-oncogene 1	Leptin
Angiopoietin 1	Mitogen activated protein kinase 14
Alanyl (membrane) aminopeptidase	Midkine
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (predicted)	Matrix metalloproteinase 19 (predicted)
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Matrix metalloproteinase 2
Cadherin 5 (predicted)	Matrix metalloproteinase 3
Procollagen, type XVIII, alpha 1	Matrix metalloproteinase 9
Procollagen, type IV, alpha 3	Natriuretic peptide receptor 1
Connective tissue growth factor	Neuropilin 1
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Neuropilin 2
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Platelet derived growth factor, alpha
Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Platelet derived growth factor, B polypeptide
Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	Placental growth factor
Ephrin A1	Plasminogen activator, urokinase
Ephrin A2	Plasminogen
Ephrin A5	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
Epidermal growth factor	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5
Endoglin	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1
Endothelial PAS domain protein 1	Sphingosine kinase 1
Epiregulin	T-box 4 (predicted)
Coagulation factor II	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase
Fibroblast growth factor 1	Transforming growth factor alpha
Fibroblast growth factor 16	Transforming growth factor, beta 1
Fibroblast growth factor 2	Transforming growth factor, beta 2
Fibroblast growth factor 6	Transforming growth factor, beta 3
Fibroblast growth factor receptor 3	Transforming growth factor, beta receptor 1
C-fos induced growth factor	Thrombospondin 4
FMS-like tyrosine kinase 1 (VegfR1)	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Fibronectin 1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Frizzled homolog 5 (Drosophila)	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
Hepatocyte growth factor	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Vascular endothelial growth factor A
Inhibitor of DNA binding 1	Vascular endothelial growth factor B
Inhibitor of DNA binding 3	Vascular endothelial growth factor C
Interferon-alpha 1	Ribosomal protein, large, P1
Interferon beta 1, fibroblast	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
Interferon gamma	Ribosomal protein L13A
Insulin-like growth factor 1	Lactate dehydrogenase A
Interleukin 1 beta	Actin, beta
Interleukin 6	Rat Genomic DNA Contamination
Integrin alpha 5 (mapped)	Reverse Transcription Control
Integrin alpha V (predicted)	Reverse Transcription Control
Integrin beta 3	Reverse Transcription Control
Jagged 1	Positive PCR Control
Kinase insert domain protein receptor	Positive PCR Control
Laminin, alpha 5	Positive PCR Control

# Bibliographie

- Abulrob, A. N., Mason, M., Bryce, R., et al. The effect of fatty acids and analogues upon intracellular levels of doxorubicin in cells displaying P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *J Drug Target* (2000) 8(4):247-56.
- Albertsson, P., Lennernas, B., and Norrby, K. Lose effects of continuous vinblastine chemotherapy on mammalian angiogenesis mediated by VEGF-A. *Acta Oncologica* (2008) 47(2):293-300.
- Alitalo, K., and Carmeliet, P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* (2002) 1(3):219-27.
- Alvarez, R. H., Kantarjian, H. M., and Cortes, J. E. Biology of Platelet-Derived Growth Factor and Its Involvement in Disease. *Mayo Clinic Proceedings* (2006) 81(9):1241-1257.
- Anthony, D. A., McIlwraith, A. J., Gallagher, W. M., et al. Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res* (1996) 56(6):1374-81.
- Ariel, A., and Serhan, C. N. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* (2007) 28(4):176-83.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* (2005) 97(6):512-23.
- Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., et al. Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem* (2005) 280(36):31508-15.
- Bardon, S., Benelli, C., Bernard-Gallon, D., et al. [Dietary fatty acids and cancer: potential cellular and molecular mechanisms]. *Bull Cancer* (2005) 92(7):697-707.
- Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. (1990) 348(6303):699-704.
- Bates, D. O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res* (2010) 87(2):262-71.
- Baumgartner, M., Sturlan, S., Roth, E., et al. Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using docosahexaenoic acid in arsenic trioxide-resistant solid tumor cells. *Int J Cancer* (2004) 112(4):707-12.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., et al. Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains *Mol. Cell. Biol.* (2009) 29(10):2570-2581.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* (2003) 22(1):90-7.
- Berger, J., and Moller, D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* (2002) 53:409-35.
- Bergers, G., and Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* (2003) 3(6):401-10.
- Bergers, G., and Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. (2008) 8(8):592-603.
- Berkey, C. S., Frazier, A. L., Gardner, J. D., et al. Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer* (1999) 85(11):2400-2409.
- Bharti, A. C., and Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* (2002) 64(5-6):883-8.
- Bikfalvi, A. [Tumor angiogenesis]. *Bull Cancer* (2003) 90(5):449-58.

- Biondo, P. D., Brindley, D. N., Sawyer, M. B., et al. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem* (2008) 19(12):787-96.
- Blanes, M. G., Oubaha, M., Rautureau, Y., et al. Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem* (2007) 282(14):10660-9.
- Boucher, Y., and Jain, R. K. Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res* (1992) 52(18):5110-4.
- Bougnoux, P., Germain, E., Chajes, V., et al. Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Br J Cancer* (1999) 79(11-12):1765-9.
- Bougnoux, P., Giraudeau, B., and Couet, C. Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006) 15(3):416-21.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., and Couet, C. The lipidome as a composite biomarker of the modifiable part of the risk of breast cancer. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* (2008) 79(3):93-96.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M. N., et al. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* (2009) 101(12):1978-1985.
- Bougnoux, P., Koscielny, S., Chajes, V., et al. alpha-Linolenic acid content of adipose breast tissue: a host determinant of the risk of early metastasis in breast cancer. *Br J Cancer* (1994) 70(2):330-4.
- Bouloumie, A., Schini-Kerth, V. B., and Busse, R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* (1999) 41(3):773-80.
- Bouzin, C., and Feron, O. Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resist Updat* (2007) 10(3):109-20.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* (2007) 85(12):1301-7.
- Browder, T., Butterfield, C. E., Kroling, B. M., et al. Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy against Experimental Drug-resistant Cancer. *Cancer Research* (2000) 60(7):1878-1886.
- Brown, C., Pan, X., and Hassid, A. Nitric oxide and C-type atrial natriuretic peptide stimulate primary aortic smooth muscle cell migration via a cGMP-dependent mechanism: relationship to microfilament dissociation and altered cell morphology. *Circ Res* (1999) 84(6):655-67.
- Brown, J. M., and Wilson, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* (2004) 4(6):437-47.
- Burns, C. P., Luttenegger, D. G., Dudley, D. T., et al. Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and methotrexate transport in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res* (1979) 39(5):1726-32.
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* (1974) 53(3):661-74.
- Calder, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* (2006) 83(6 Suppl):1505S-1519S.
- Calviello, G., Di Nicuolo, F., Gagnoli, S., et al. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* (2004) 25(12):2303-10.

- Calviello, G., Serini, S., Piccioni, E., et al. Antineoplastic Effects of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Combination With Drugs and Radiotherapy: Preventive and Therapeutic Strategies. *Nutrition and Cancer* (2009) 61(3):287-301.
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* (2005) 438(7070):932-936.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* (2000) 407(6801):249-57.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* (2011) 473(7347):298-307.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. (2011b) 10(6):417-427.
- Caygill, C. P. J., Charlett, A., and Hill, M. J. Fat, fish, fish oil and cancer. *British Journal of Cancer* (1996) 74(1):159-164.
- Cerniglia, G. J., Pore, N., Tsai, J. H., et al. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Modulates the Microenvironment by Vascular Normalization to Improve Chemotherapy and Radiotherapy Efficacy. *PLoS ONE* (2009) 4(8):e6539 EP -.
- Chajes, V., Thiebaut, A. C. M., Rotival, M., et al. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC study. *American Journal of Epidemiology* (2008) 167(11):1312-1320.
- Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., et al. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* (1997) 15(4):437-442.
- Chung, B. H., Lee, J. J., Kim, J. D., et al. Angiogenic activity of sesamin through the activation of multiple signal pathways. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 391(1):254-60.
- Clark, A. S., West, K., Streicher, S., et al. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2002) 1(9):707-17.
- Cleaver, O., and Melton, D. A. Endothelial signaling during development. *Nat Med* (2003) 9(6):661-8.
- Clottes, E. [Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy]. *Bull Cancer* (2005) 92(2):119-27.
- Colas, S., Maheo, K., Denis, F., et al. Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin Cancer Res* (2006) 12(19):5879-86.
- Colas, S., Paon, L., Denis, F., et al. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer* (2004) 109(3):449-54.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* (1996) 347(9017):1713-27.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet* (1997) 350(9084):1047-1059.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer - collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. (2002) 87(11):1234-1245.

- Conway, E. M., Collen, D., and Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research* (2001) 49(3):507-521.
- Coulet, F., Nadaud, S., Agrapart, M., et al. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem* (2003) 278(47):46230-40.
- Couloubaly, S., Deloménie, C., Rousseau, D., et al. Fatty acid incorporation in endothelial cells and effects on endothelial nitric oxide synthase. *European Journal of Clinical Investigation* (2007) 37(9):692-699.
- Crawford, Y., and Ferrara, N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell and Tissue Research* (2009) 335(1):261-269.
- Crosby, A. J., Wahle, K. W. J., and Duthie, G. G. Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* (1996) 1303(3):187-192.
- Cross, M. J., and Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* (2001) 22(4):201-207.
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T., et al. VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences* (2003) 28(9):488-494.
- Curti, B. D., Urba, W. J., Alvord, W. G., et al. Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment. *Cancer Res* (1993) 53(10 Suppl):2204-7.
- Dachs, G. U., and Tozer, G. M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* (2000) 36(13 Spec No):1649-60.
- Dadiani, M., Kalchenko, V., Yosepovich, A., et al. Real-time Imaging of Lymphogenic Metastasis in Orthotopic Human Breast Cancer. *Cancer Research* (2006) 66(16):8037-8041.
- Daff, S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* (2010) 23(1):1-11.
- Dannenber, A. J., Lippman, S. M., Mann, J. R., et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol* (2005) 23(2):254-66.
- de Groot, D. J., de Vries, E. G., Groen, H. J., et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol* (2007) 61(1):52-69.
- de Jong, M. M., Nolte, I. M., te Meerman, G. J., et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* (2002) 39(4):225-42.
- DeFilippis, A. P., and Sperling, L. S. Understanding omega-3's. *American Heart Journal* (2006) 151(3):564-570.
- DeGraffenried, L. A., Friedrichs, W. E., Fulcher, L., et al. Eicosapentaenoic acid restores tamoxifen sensitivity in breast cancer cells with high Akt activity. *Ann Oncol* (2003) 14(7):1051-6.
- Denninger, J. W., and Marletta, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1411(2-3):334-50.
- Dickson, P. V., Hamner, J. B., Sims, T. L., et al. Bevacizumab-Induced Transient Remodeling of the Vasculature in Neuroblastoma Xenografts Results in Improved Delivery and Efficacy of Systemically Administered Chemotherapy. *Clinical Cancer Research* (2007) 13(13):3942-3950.
- Dimmeler, S., Dernbach, E., and Zeiher, A. M. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* (2000) 477(3):258-62.

- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* (1999) 399(6736):601-5.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., et al. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* (1997) 185(4):601-7.
- Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* (1999b) 6(10):964-8.
- Ding, W., and Lind, S. E. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid induced cytotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics* (2007) 6(4):1467-1474.
- Ding, W., Vaught, J. L., Yamauchi, H., et al. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Molecular Cancer Therapeutics* (2004) 3(9):1109-1117.
- Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., et al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* (2003) 47(3):149-61.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* (1998) 12(12):1063-1073.
- Dudzinski, D. M., and Michel, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* (2007) 75(2):247-60.
- Dumitrescu, R. G., and Cotarla, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* (2005) 9(1):208-21.
- Eikenes, L., Bruland, A., Brekken, C., et al. Collagenase Increases the Transcapillary Pressure Gradient and Improves the Uptake and Distribution of Monoclonal Antibodies in Human Osteosarcoma Xenografts. *Cancer Research* (2004) 64(14):4768-4773.
- Eikesdal, H. P., Landuyt, W., and Dahl, O. The influence of combretastatin A-4 and vinblastine on interstitial fluid pressure in BT4An rat gliomas. *Cancer Letters* (2002) 178(2):209-217.
- Elstner, E., Müller, C., Koshizuka, K., et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor $\beta$  and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1998) 95(15):8806-8811.
- Elston, C. W., Ellis, I. O., and Pinder, S. E. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology Hematology* (1999) 31(3):209-223.
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* (2006) 440(7088):1222-6.
- Erler, J. T., Cawthorne, C. J., Williams, K. J., et al. Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. *Mol. Cell. Biol.* (2004) 24(7):2875-2889.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., et al. Classification of anticancer drugs - a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews* (2003) 29(6):515-523.
- Favot, L., Keravis, T., Holl, V., et al. VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost* (2003) 90(2):334-43.
- Feron, O. Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* (2004) 25(10):536-42.
- Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B., et al. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* (1998) 273(6):3125-8.
- Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* (1997) 18(1):4-25.

- Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* (2003) 9(6):669-76.
- Ferrara, N., and Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* (2005) 438(7070):967-74.
- Ferrero, J. M. Cancer du sein. [Http://www.medespace.com/cancero/doc/sein.html](http://www.medespace.com/cancero/doc/sein.html), 1999.
- Ferretti, S., Allegrini, P. R., Becquet, M. M., et al. Tumor interstitial fluid pressure as an early-response marker for anticancer therapeutics. *Neoplasia* (2009) 11(9):874-81.
- Fitzpatrick, B., Mehibel, M., Cowen, R. L., et al. iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide. Nitric Oxide and Cancer: Clinical and Therapeutic Implications* (2008) 19(2):217-224.
- Flamant, L., Notte, A., Ninane, N., et al. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Molecular Cancer* (2010) 9(1):191.
- Fleming, I., and Busse, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* (1999) 43(3):532-41.
- Fleming, I., and Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2003) 284(1):R1-12.
- Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* (1971) 285(21):1182-1186.
- Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* (1990) 82(1):4-6.
- Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* (2007) 6(4):273-86.
- Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S. E., et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53 *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1996 ) 93 ( 6 ):2442-2447
- Forstermann, U., and Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* (2011).
- Franke, T. F. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* (2008) 27(50):6473-88.
- Friedenreich, C. M., Courneya, K. S., and Bryant, H. E. Influence of Physical Activity in Different Age and Life Periods on the Risk of Breast Cancer. Presented at conference, "Epidemiology.", 2001.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(5):2604-9.
- Fukumura, D., and Jain, R. K. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res* (2007) 74(2-3):72-84.
- Fukumura, D., and Jain, R. K. Imaging angiogenesis and the microenvironment. *Apmis* (2008) 116(7-8):695-715.
- Fukumura, D., Kashiwagi, S., and Jain, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* (2006) 6(7):521-34.
- Fukumura, D., Yuan, F., Endo, M., et al. Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol* (1997) 150(2):713-25.
- Fulton, D., Gratton, J. P., and Sessa, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* (2001) 299(3):818-24.
- Furuya, M., Nishiyama, M., Kasuya, Y., et al. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag* (2005) 1(4):277-90.

- Gade, T. P. F., Buchanan, I. M., Motley, M. W., et al. Imaging Intratumoral Convection: Pressure-Dependent Enhancement in Chemotherapeutic Delivery to Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* (2009) 15(1):247-255.
- Garg, A. K., Hortobagyi, G. N., Aggarwal, B. B., et al. Nuclear factor-kappa B as a predictor of treatment response in breast cancer. *Curr Opin Oncol* (2003) 15(6):405-11.
- Gatti, G., Simsek, S., Zurrada, S., et al. Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature. *Breast* (2004) 13(1):1-6.
- Gauthier, N., Arnould, L., Chantome, A., et al. [To stimulate or to inhibit nitric oxide production in mammary tumors?]. *Bull Cancer* (2004) 91(9):705-12.
- Generali, D., Berruti, A., Brizzi, M. P., et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res* (2006) 12(15):4562-8.
- Germain, E., Bonnet, P., Aubourg, L., et al. Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacol Res* (2003) 47(2):111-7.
- Germain, E., Chajes, V., Cognault, S., et al. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer* (1998) 75(4):578-83.
- Germain, E., Lavandier, F., Chajes, V., et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and oxidants increase rat mammary tumor sensitivity to epirubicin without change in cardiac toxicity. *Lipids* (1999) 34 Suppl:S203.
- Ghosh, J., and Myers, C. E. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 235(2):418-23.
- Ghosh, J., and Myers, C. E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95(22):13182-7.
- Ghosh-Choudhury, T., Mandal, C., Woodruff, K., et al. Fish oil targets PTEN to regulate NF $\kappa$ B for downregulation of anti-apoptotic genes in breast tumor growth. *Breast Cancer Research and Treatment* (2009) 118(1):213-228.
- Giustiniani, J., Couloubaly, S., Baillet, A., et al. Basal endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation on Ser(1177) occurs in a stable microtubule- and tubulin acetylation-dependent manner. *Exp Cell Res* (2009) 315(20):3509-20.
- Globocan. <http://globocan.iarc.fr/>. (2008).
- Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., et al. Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. *Physiological Reviews* (2011) 91(3):1071-1121.
- Gogos, C. A., Ginopoulos, P., Salsa, B., et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy. *Cancer* (1998) 82(2):395-402.
- Goldberg, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research* (1996) 37(4):693-707.
- Gomez de Segura, I. A., Valderrabano, S., Vazquez, I., et al. Protective effects of dietary enrichment with docosahexaenoic acid plus protein in 5-fluorouracil-induced intestinal injury in the rat. Presented at conference, "European Journal of Gastroenterology & Hepatology.", 2004.
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1990) 87(17):6624-6628.
- Goodstine, S. L., Zheng, T., Holford, T. R., et al. Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. *J Nutr* (2003) 133(5):1409-14.

- Gousset-Dupont, A., Robert, V., Grynberg, A., et al. The effect of n-3 PUFA on eNOS activity and expression in Ea hy 926 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2007) 76(3):131-9.
- Govers, R., and Rabelink, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* (2001) 280(2):F193-206.
- Grange, C., Bussolati, B., Bruno, S., et al. Isolation and characterization of human breast tumor-derived endothelial cells. *Oncol Rep* (2006) 15(2):381-6.
- Grant, D. S., Williams, T. L., Zahaczewsky, M., et al. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer* (2003) 104(1):121-9.
- Gratton, J. P., Lin, M. I., Yu, J., et al. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell* (2003) 4(1):31-39.
- Green, P. H., and Glickman, R. M. Intestinal lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research* (1981) 22(8):1153-73.
- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. N., et al. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2011).
- Griffon-Etienne, G., Boucher, Y., Brekken, C., et al. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res* (1999) 59(15):3776-82.
- Grimaldi, P. A. Fatty acid regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2001) 4(5):433-7.
- Grimm, H., Mayer, K., Mayser, P., et al. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr* (2002) 87 Suppl 1:S59-67.
- Guesnet, P. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux Corps gras lipides* (2005) 12(5):333-343.
- Gullino, P. M., Clark, S. H., and Grantham, F. H. The Interstitial Fluid of Solid Tumors. *Cancer Res* (1964) 24:780-94.
- Guo, N. H., Kruttsch, H. C., Inman, J. K., et al. Antiproliferative and antitumor activities of D-reverse peptides derived from the second type-1 repeat of thrombospondin-1. *Journal of Peptide Research* (1997) 50(3):210-221.
- Gupta, G. P., Nguyen, D. X., Chiang, A. C., et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. (2007) 446(7137):765-770.
- Hardman, W. E., Avula, C. P., Fernandes, G., et al. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* (2001) 7(7):2041-9.
- Hardman, W. E., Moyer, M. P., and Cameron, I. L. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *Br J Cancer* (1999) 81(3):440-8.
- Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* (2002) 2(1):38-47.
- Harrison, L., and Blackwell, K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* (2004) 9 Suppl 5:31-40.
- Hegedüs, L., Cho, H., Xie, X., et al. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *Journal of Cellular Physiology* (2008) 216(2):480-485.
- Heinzman, J. M., Brower, S. L., and Bush, J. E. Comparison of angiogenesis-related factor expression in primary tumor cultures under normal and hypoxic growth conditions. *Cancer Cell Int* (2008) 8:11.
- Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., et al. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* (2004) 4(10):806-13.

- Hennig, R., Ding, X. Z., Tong, W. G., et al. Effect of LY293111 in combination with gemcitabine in colonic cancer. *Cancer Lett* (2004) 210(1):41-6.
- Hess, V. Principes de Chimiothérapie. *Forum Med Suisse* (2001) 40.
- Hess, V. Principes de la chimiothérapie. Effets secondaires de la chimiothérapie et leur traitement. *Forum Med Suisse* (2001b) 43.
- Hockel, M., and Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* (2001) 93(4):266-76.
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling* (2007) 19(10):2003-2012.
- Holopainen, T., Bry, M., Alitalo, K., et al. Perspectives on lymphangiogenesis and angiogenesis in cancer. *Journal of Surgical Oncology* (2011) 103(6):484-488.
- Horie, T., Nakamaru, M., and Masubuchi, Y. Docosahexaenoic acid exhibits a potent protection of small intestine from methotrexate-induced damage in mice. *Life Sciences* (1998) 62(15):1333-1338.
- Hoshida, T., Isaka, N., Hagendoorn, J., et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res* (2006) 66(16):8065-75.
- Hotchkiss, K. A., Ashton, A. W., Mahmood, R., et al. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Mol Cancer Ther* (2002) 1(13):1191-200.
- Houseknecht, K. L., Cole, B. M., and Steele, P. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol* (2002) 22(1):1-23.
- Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M. D. MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science* (2004) 117(20):4619-4628.
- Hudis, C. A., and Gianni, L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist* (2011) 16(suppl 1):1-11.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* (2004) 350(23):2335-2342.
- Hussein, D., Estlin, E. J., Dive, C., et al. Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1a dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* (2006) 5(9):2241-2250.
- Igarashi, J., Thatte, H. S., Prabhakar, P., et al. Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(22):12583-8.
- Ikushima, S., Fujiwara, F., Todo, S., et al. Effects of Polyunsaturated Fatty-Acids on Vincristine-Resistance in Human Neuroblastoma-Cells. *Anticancer Research* (1991) 11(3):1215-1220.
- INCa. LA SITUATION DU CANCER EN FRANCE EN 2010. <http://www.e-cancer.fr/>. (2010).
- Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., et al. Tumour biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. (2002) 416(6878):279-280.
- Jadeski, L. C., Chakraborty, C., and Lala, P. K. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer* (2003) 106(4):496-504.

- Jadeski, L. C., Hum, K. O., Chakraborty, C., et al. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* (2000) 86(1):30-9.
- Jadeski, L. C., and Lala, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol* (1999) 155(4):1381-90.
- Jain, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine* (2001) 7(9):987-989.
- Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* (2003) 9(6):685-93.
- Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* (2005) 307(5706):58-62.
- Jain, R. K., and Baxter, L. T. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res* (1988) 48(24 Pt 1):7022-32.
- Jain, R. K., and Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* (2010) 7(11):653-64.
- Jain, R. K., Tong, R. T., and Munn, L. L. Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model. *Cancer Res* (2007) 67(6):2729-35.
- Jenkins, D. C., Charles, I. G., Thomsen, L. L., et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1995) 92(10):4392-4396.
- Jeyarajah, D. R., Kielar, M., Penfield, J., et al. Docosahexaenoic acid, a component of fish oil, inhibits nitric oxide production in vitro. *J Surg Res* (1999) 83(2):147-50.
- Jordan, M. A., and Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* (2004) 4(4):253-65.
- Jozkowicz, A., Cooke, J. P., Guevara, I., et al. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res* (2001) 51(4):773-83.
- Judah, F. Antiangiogenesis in cancer therapy - endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research. Special Issue on Angiogenesis* (2006) 312(5):594-607.
- Jump, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* (2002) 13(2):155-64.
- Kaal, E. C. A., and Vecht, C. J. The management of brain edema in brain tumors. Presented at conference, "Current Opinion in Oncology.", 2004.
- Kashiwagi, S., Izumi, Y., Gohongi, T., et al. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *J Clin Invest* (2005) 115(7):1816-27.
- Kawasaki, K., Smith, R. S., Jr., Hsieh, C. M., et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* (2003) 23(16):5726-37.
- Key, T. J., Allen, N. E., Spencer, E. A., et al. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* (2002) 360(9336):861-8.
- Key, T. J., Verkasalo, P. K., and Banks, E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* (2001) 2(3):133-40.
- Kim, H. J., Vosseler, C. A., Weber, P. C., et al. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. *J Cell Physiol* (2005) 204(3):881-8.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. (1993) 362(6423):841-844.
- Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide:

- control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* (2000) 95(1):189-97.
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of Clinical Investigation* (2000) 105(8):0.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., et al. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* (2011) 437(2):169-83.
- Koeffler, H. P. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  and Cancers. *Clinical Cancer Research* (2003) 9(1):1-9.
- Kolluru, G. K., Siamwala, J. H., and Chatterjee, S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie* (2010) 92(9):1186-98.
- Komatsu, W., Ishihara, K., Murata, M., et al. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (2003) 34(8):1006-16.
- Komurasaki, T., Toyoda, H., Uchida, D., et al. Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene* (1997) 15(23):2841-8.
- König, J., Hartel, M., Nies, A. T., et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *International Journal of Cancer* (2005) 115(3):359-367.
- Kozin, S. V., Boucher, Y., Hicklin, D. J., et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-blocking Antibody Potentiates Radiation-induced Long-Term Control of Human Tumor Xenografts. *Cancer Research* (2001) 61(1):39-44.
- Kristjansen, P. E. G., Boucher, Y., and Jain, R. K. Dexamethasone Reduces the Interstitial Fluid Pressure in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft. *Cancer Research* (1993) 53(20):4764-4766.
- Krystal, G. W., Sulanke, G., and Litz, J. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signaling Blocks Growth, Promotes Apoptosis, and Enhances Sensitivity of Small Cell Lung Cancer Cells to Chemotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics* (2002) 1(11):913-922.
- Lahdenranta, J., Hagendoorn, J., Padera, T. P., et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* (2009) 69(7):2801-8.
- Lammerts, E., Roswall, P., Sundberg, E., et al. Interference with TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 3 in tumor stroma lowers tumor interstitial fluid pressure independently of growth in experimental carcinoma. *International Journal of Cancer* (2002) 102(5):453-462.
- Lands, W. E., Hamazaki, T., Yamazaki, K., et al. Changing dietary patterns. *The American Journal of Clinical Nutrition* (1990) 51(6):991-993.
- Lanore, D., and Delprat, C. *Chimiothérapie anticancéreuse*. Masson, 2002, ISBN 2-294-01065-5.
- Larach, D. R., Schuler, H. G., Skeehan, T. M., et al. Direct effects of myocardial depressant drugs on coronary vascular tone: anesthetic vasodilation by halothane and isoflurane. . *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1990) 254 (1 ):58-64
- Larre, S., Tran, N., Fan, C., et al. PGE2 and LTB4 tissue levels in benign and cancerous prostates. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2008) 87(1-4):14-9.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., et al. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* (2004) 79(6):935-45.

- Lauzier, M. C., Michaud, M. D., Dery, M. A., et al. [HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]. *Bull Cancer* (2006) 93(4):349-56.
- Lee, C. G., Heijn, M., di Tomaso, E., et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment Augments Tumor Radiation Response under Normoxic or Hypoxic Conditions. *Cancer Research* (2000) 60(19):5565-5570.
- Lee, C. H., Jeon, Y. T., Kim, S. H., et al. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* (2007) 29(1):19-35.
- Legrand, P. LES ACIDES GRAS STRUCTURES, FONCTIONS, APPORTS NUTRITIONNELS CONSEILLÉS. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* (2007) 42(Numéro Hors-série 1):7-12.
- Lemaitre, D., Véricel, E., Polette, A., et al. Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* (1997) 53(4):479-486.
- Less, J. R., Posner, M. C., Boucher, Y., et al. Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res* (1992) 52(22):6371-4.
- Levy, B. D. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2010) 82(4-6):327-32.
- Li, Y., Zheng, J., Bird, I. M., et al. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod* (2004) 70(3):785-96.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001) 25(4):402-8.
- Lotz, C., Kelleher, D. K., Gassner, B., et al. Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. *Oncology Reports* (2007) 17(1):239-244.
- Lunt, S. J., Chaudary, N., and Hill, R. The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clinical and Experimental Metastasis* (2009) 26(1):19-34.
- Lunt, S. J., Kalliomaki, T. M., Brown, A., et al. Interstitial fluid pressure, vascularity and metastasis in ectopic, orthotopic and spontaneous tumours. *BMC Cancer* (2008) 8:2.
- Ma, D. W. L., Seo, J., Switzer, K. C., et al. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *The Journal of Nutritional Biochemistry* (2004) 15(11):700-706.
- MacLennan, M., and Ma, D. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Research* (2010) 12(5):211.
- Madelaine, I. Breast cancer: diagnostic and therapeutic updates. *Journal de Pharmacie Clinique* (2003) 22(3):117-22.
- Maeda, H., Noguchi, Y., Sato, K., et al. Enhanced Vascular Permeability in Solid Tumor Is Mediated by Nitric Oxide and Inhibited by Both New Nitric Oxide Scavenger and Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *Cancer Science* (1994) 85(4):331-334.
- Maheo, K., Vibet, S., Steghens, J. P., et al. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radic Biol Med* (2005) 39(6):742-51.
- Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., et al. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *Int J Cancer* (2002) 98(1):78-83.
- Maillot, F., Garrigue, M. A., Pinault, M., et al. Changes in plasma triacylglycerol concentrations after sequential lunch and dinner in healthy subjects. *Diabetes & Metabolism* (2005) 31(1):69-77.
- Malhotra, V., and Perry, M. C. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biol Ther* (2003) 2(4 Suppl 1):S2-4.

- Manning, B. D., and Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* (2007) 129(7):1261-74.
- Martin, D., and Meckling-Gill, K. A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase purine but not pyrimidine transport in L1210 leukaemia cells. *Biochem J* (1996) 315 ( Pt 1):329-33.
- McDonald, D. M., and Choyke, P. L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* (2003) 9(6):713-25.
- McGee, M. C., Hamner, J., Regan, F., et al. Improved Intratumoral Oxygenation Through Vascular Normalization Increases Glioma Sensitivity to Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* (2010) 76(5):1537-1545.
- McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N., et al. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* (2008) 1785(2):96-132.
- McNeil, E., Capaldo, C. T., and Macara, I. G. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* (2006) 17(4):1922-32.
- McPherson, K., Steel, C. M., and Dixon, J. M. ABC of breast disease: Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal* (2000) 321(7261):624-628.
- Médart, J. *Manuel pratique de nutrition*, 2009, ISBN 978-2-8041-0230-2.
- Melillo, G., Musso, T., Sica, A., et al. A Hypoxia-Responsive Element Mediates a Novel Pathway of Activation of the Inducible Nitric-Oxide Synthase Promoter. *Journal of Experimental Medicine* (1995) 182(6):1683-1693.
- Menendez, J. A., del Mar Barbacid, M., Montero, S., et al. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur J Cancer* (2001) 37(3):402-13.
- Menendez, J. A., Lupu, R., and Colomer, R. Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev* (2005) 14(3):263-70.
- Merviel, P., Jouvance, O., Naepels, P., et al. Existe-t-il encore des facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* (2011) 39(9):486-490.
- Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., et al. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* (2003) 14(8):3470-81.
- Michels, K. B., Mohllajee, A. P., Roset-Bahmanyar, E., et al. Diet and breast cancer. *Cancer* (2007) 109(S12):2712-2749.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., et al. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* (2007) 357(26):2666-2676.
- Milosevic, M., Fyles, A., Hedley, D., et al. The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure. *Semin Radiat Oncol* (2004) 14(3):249-58.
- Milosevic, M., Fyles, A., Hedley, D., et al. Interstitial fluid pressure predicts survival in patients with cervix cancer independent of clinical prognostic factors and tumor oxygen measurements. *Cancer Res* (2001) 61(17):6400-5.
- Montagnani, M., Chen, H., Barr, V. A., et al. Insulin-stimulated Activation of eNOS Is Independent of Ca<sup>2+</sup> but Requires Phosphorylation by Akt at Ser1179. *Journal of Biological Chemistry* (2001) 276(32):30392-30398.

- Montagut, C., Tusquets, I., Ferrer, B., et al. Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer* (2006) 13(2):607-16.
- Morbidelli, L., Pyriochou, A., Filippi, S., et al. The soluble guanylyl cyclase inhibitor NS-2028 reduces vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and permeability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2010) 298(3):R824-32.
- Morse, D. L., Gray, H., Payne, C. M., et al. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2005) 4(10):1495-504.
- Mount, P. F., Kemp, B. E., and Power, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* (2007) 42(2):271-9.
- Mukutmoni-Norris, M., Hubbard, N. E., and Erickson, K. L. Modulation of murine mammary tumor vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer Lett* (2000) 150(1):101-9.
- Muntané, J., and De la Mata, M. Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol* (2010) 2(9):337-344.
- Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., et al. Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Enhances Vascular Permeability Via Nitric Oxide and Prostacyclin. *Circulation* (1998) 97(1):99-107.
- Murohara, T., Witzenbichler, B., Spyridopoulos, I., et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999) 19(5):1156-61.
- Murphy, R. A., Mourtzakis, M., Chu, Q. S. C., et al. Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* (2011) 117(16):3774-3780.
- Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Simi, B., et al. Modulation of Inducible Nitric Oxide Synthase and Related Proinflammatory Genes by the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research* (2003) 63(5):972-979.
- Netti, P. A., Baxter, L. T., Boucher, Y., et al. Time-dependent behavior of interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. *Cancer Res* (1995) 55(22):5451-8.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal* (1999) 13(1):9-22.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M. F., et al. Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Current Drug Metabolism* (2010) 11(7):603-617.
- Nicholson, K. M., and Anderson, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* (2002) 14(5):381-95.
- Nicholson, R. I., Gee, J. M., and Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* (2001) 37 Suppl 4:S9-15.
- Nishida, C. R., and Ortiz de Montellano, P. R. Autoinhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274(21):14692-14698.
- Nkondjock, A., and Ghadirian, P. [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *Med Sci (Paris)* (2005) 21(2):175-80.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* (2006) 366(1):2-16.
- Oberley, T. D. Oxidative Damage and Cancer. *The American Journal of Pathology* (2002) 160(2):403-408.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., et al. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* (1997) 88(2):277-285.

- O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., et al. Regulation of Angiostatin Production by Matrix Metalloproteinase-2 in a Model of Concomitant Resistance. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274(41):29568-29571.
- O'Reilly, T. M., Schnell, C. R., Ferretti, S., et al. Interstitial fluid pressure measurements in solid tumors via radio-telemetry in conscious freely moving orthotopic BN472 tumor bearing rats. Presented at conference, "AACR Meeting Abstracts.", 2005.
- Ortiz, P. A., and Garvin, J. L. Trafficking and activation of eNOS in epithelial cells. *Acta Physiologica Scandinavica* (2003) 179(2):107-114.
- Orucevic, A., Bechberger, J., Green, A. M., et al. Nitric-oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness. *Int J Cancer* (1999) 81(6):889-96.
- Oubaha, M., and Gratton, J. P. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood* (2009) 114(15):3343-51.
- Ozuyaman, B., Grau, M., Kelm, M., et al. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med* (2008) 14(7):314-22.
- Padera, T. P., Kadambi, A., di Tomaso, E., et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* (2002) 296(5574):1883-6.
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., et al. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* (1997) 100(12):3131-9.
- Pardini, R. S. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem Biol Interact* (2006) 162(2):89-105.
- Parks, S. K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol* (1999) 226(2):299-308.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* (2010) 23(2):75-93.
- Pietras, K., Ostman, A., Sjoquist, M., et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* (2001) 61(7):2929-34.
- Pietras, K., Rubin, K., Sjoblom, T., et al. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* (2002) 62(19):5476-84.
- Pietras, K., Stumm, M., Hubert, M., et al. STI571 Enhances the Therapeutic Index of Etoposide B by a Tumor-selective Increase of Drug Uptake. *Clinical Cancer Research* (2003) 9(10):3779-3787.
- Polytarchou, C., and Papadimitriou, E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* (2005) 510(1-2):31-8.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews. Fibroblast Growth Factors* (2005) 16(2):159-178.
- Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(37):13147-52.
- Robert, J. From conventional chemotherapy to targeted therapies of cancer: mechanisms of oncogenesis at the molecular and cellular levels. *Bulletin Du Cancer* (2006) 93:5-16.
- Robinson, C. J., and Stringer, S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* (2001) 114(Pt 5):853-65.

- Rofstad, E. K., Tunheim, S. H., Mathiesen, B., et al. Pulmonary and Lymph Node Metastasis Is Associated with Primary Tumor Interstitial Fluid Pressure in Human Melanoma Xenografts. *Cancer Research* (2002) 62(3):661-664.
- Rogers, K. R., Kikawa, K. D., Mouradian, M., et al. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis* (2010) 31(9):1523-30.
- Roh, H. D., Boucher, Y., Kalnicki, S., et al. Interstitial hypertension in carcinoma of uterine cervix in patients: possible correlation with tumor oxygenation and radiation response. *Cancer Res* (1991) 51(24):6695-8.
- Rose, D. P., and Connolly, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* (1999) 83(3):217-44.
- Rose, D. P., and Connolly, J. M. Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *International Journal of Oncology* (1999b) 15(5):1011-1015.
- Russo, J., Hu, Y. F., Yang, X., et al. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* (2000) (27):17-37.
- Salnikov, A. V., Roswall, P., Sundberg, C., et al. Inhibition of TGF-[beta] modulates macrophages and vessel maturation in parallel to a lowering of interstitial fluid pressure in experimental carcinoma. (2005) 85(4):512-521.
- Sandau, K. B., Zhou, J., Kietzmann, T., et al. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* (2001) 276(43):39805-11.
- Saulnier-Blache, J. S. L'acide lysophosphatidique : un phospholipide « bioactif ». *Med Sci (Paris)* (2004) 20(8-9):799-803.
- Sauvant, C., Nowak, M., Wirth, C., et al. Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *International Journal of Cancer* (2008) 123(11):2532-2542.
- Sbaa, E., Frérart, F., and Feron, O. The Double Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Caveolae and Caveolin: A Paradox Solved Through the Study of Angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* (2005) 15(5):157-162.
- Schaefer, M. B., Wenzel, A., Fischer, T., et al. Fatty acids differentially influence phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in endothelial cells: impact on adhesion and apoptosis. *Atherosclerosis* (2008) 197(2):630-7.
- Schley, P. D., Brindley, D. N., and Field, C. J. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* (2007) 137(3):548-53.
- Schley, P. D., Jijon, H. B., Robinson, L. E., et al. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* (2005) 92(2):187-95.
- Schmitz, G., and Grandl, M. Update on lipid membrane microdomains. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* (2008) 11(2):106-112 10.1097/MCO.0b013e3282f44c2c.
- Schnell, C. R., Stauffer, F., Allegrini, P. R., et al. Effects of the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 on the tumor vasculature: implications for clinical imaging. *Cancer Res* (2008) 68(16):6598-607.
- Schwartz, E. L. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin Cancer Res* (2009) 15(8):2594-601.

- Semenza, G. L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (2000) 35(2):71-103.
- Semenza, G. L. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest* (2008) 118(12):3835-7.
- Sennequier, N., and Vadon-Le Goff, S. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/sciences* (1998) 14:1185-95.
- Seo, J., Barhoumi, R., Johnson, A. E., et al. Docosahexaenoic acid selectively inhibits plasma membrane targeting of lipidated proteins. *Faseb J* (2006) 20(6):770-2.
- Serfaty, D. *Contraception*. Elsevier Masson, 2011, ISBN 978-2-294-70921-0.
- Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., et al. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* (2004) 73(3-4):155-172.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. (1995) 376(6535):62-66.
- Shang, Z. J., Li, Z. B., and Li, J. R. In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg* (2006) 35(6):539-43.
- Shao, Y., Pardini, L., and Pardini, R. S. Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids* (1995) 30(11):1035-45.
- Shao, Y., Pardini, L., and Pardini, R. S. Intervention of transplantable human mammary carcinoma MX-1 chemotherapy with dietary menhaden oil in athymic mice: increased therapeutic effects and decreased toxicity of cyclophosphamide. *Nutr Cancer* (1997) 28(1):63-73.
- Shibuya, M. Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* (2011) 87(4):167-178.
- Shu, X., Wu, W., Mosteller, R. D., et al. Sphingosine Kinase Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Activation of Ras and Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol. Cell. Biol.* (2002) 22(22):7758-7768.
- Simonsen, N., van't Veer, P., Strain, J. J., et al. Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. *American Journal of Epidemiology* (1998) 147(4):342-352.
- Singh, J., Hamid, R., and Reddy, B. S. Dietary Fat and Colon Cancer: Modulating Effect of Types and Amount of Dietary Fat on ras-p21 Function during Promotion and Progression Stages of Colon Cancer. *Cancer Research* (1997) 57(2):253-258.
- Singh, J., Hamid, R., and Reddy, B. S. Dietary fish oil inhibits the expression of farnesyl protein transferase and colon tumor development in rodents. *Carcinogenesis* (1998) 19(6):985-9.
- Soff, G. A. Angiostatin and Angiostatin-related Proteins. *Cancer and Metastasis Reviews* (2000) 19(1):97-107.
- Song, X., Wang, J. B., Yin, D. L., et al. Down-regulation of lung resistance related protein by RNA interference targeting survivin induces the reversal of chemoresistances in hepatocellular carcinoma. *Chinese Medical Journal* (2009) 122(21):2636-2642.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* (1973) 51(5):1409-16.
- St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* (2000) 289(5482):1197-202.

- Stebbins, C. L., Stice, J. P., Hart, C. M., et al. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* (2008) 13(4):261-8.
- Sterescu, A. E., Rousseau-Harsany, E., Farrell, C., et al. The potential efficacy of omega-3 fatty acids as anti-angiogenic agents in benign vascular tumors of infancy. *Med Hypotheses* (2006) 66(6):1121-4.
- Stillwell, W., Shaikh, S. R., Zerouga, M., et al. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod. Nutr. Dev.* (2005) 45(5):559-579.
- Su, Y., Zharikov, S. I., and Block, E. R. Microtubule-active agents modify nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2002) 282(6):L1183-9.
- Subarsky, P., and Hill, R. P. Graded hypoxia modulates the invasive potential of HT1080 fibrosarcoma and MDA MB231 carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* (2008) 25(3):253-64.
- Sullivan, J. C., and Pollock, J. S. NOS 3 subcellular localization in the regulation of nitric oxide production. *Acta Physiologica Scandinavica* (2003) 179(2):115-122.
- Sullivan, R., and Graham, C. H. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* (2007) 26(2):319-31.
- Sun, H., Hu, Y., Gu, Z., et al. Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis* (2007).
- Sweeney, C. J., Miller, K. D., Sissons, S. E., et al. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Res* (2001) 61(8):3369-72.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., and Harris, A. L. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* (2007) 26(2):299-310.
- Taghian, A. G., Abi-Raad, R., Assaad, S. I., et al. Paclitaxel Decreases the Interstitial Fluid Pressure and Improves Oxygenation in Breast Cancers in Patients Treated With Neoadjuvant Chemotherapy: Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology* (2005) 23(9):1951-1961.
- Takahashi, T., Ueno, H., and Shibuya, M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* (1999) 18(13):2221-2230.
- Tamir, S., and Tannenbaum, S. R. The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* (1996) 1288(2):F31-6.
- Tan, E. Y., Campo, L., Han, C., et al. Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res* (2007) 9(6):R89.
- Tan, E. Y., Yan, M., Campo, L., et al. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Br J Cancer* (2009) 100(2):405-11.
- Taylor, M., Georger, B., Lagodny, J., et al. [Potential role of antiangiogenic treatment in neuroblastoma]. *Arch Pediatr* (2009) 16(5):457-67.
- Tendler, D. S., Bao, C., Wang, T., et al. Intersection of Interferon and Hypoxia Signal Transduction Pathways in Nitric Oxide-induced Tumor Apoptosis. *Cancer Research* (2001) 61(9):3682-3688.
- Teo, S. T., Yung, Y. C., Herr, D. R., et al. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life* (2009) 61(8):791-799.

- Tevar, R., Jho, D., Babcock, T., et al. Omega-3 fatty acid supplementation reduces tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in a model of progressive non-metastasizing malignancy. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* (2002) 26(5):285-289.
- Thews, O., Gassner, B., Kelleher, D. K., et al. Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Neoplasia* (2006) 8(2):143-152.
- Thews, O., Nowak, M., Sauvant, C., et al. Hypoxia-Induced Extracellular Acidosis Increases p-Glycoprotein Activity and Chemoresistance in Tumors in Vivo via p38 Signaling Pathway. In J. C. LaManna, M. A. Puchowicz, K. Xu, et al., eds., *Oxygen Transport to Tissue XXXII, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, 2011.
- Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell* (2010) 39(3):468-76.
- Thiebaut, A. C., Chajes, V., Clavel-Chapelon, F., et al. [Unsaturated fatty acids intake and breast cancer risk: epidemiological data review]. *Bull Cancer* (2005) 92(7):658-69.
- Thompson, H. J., McGinley, J. N., Knott, K. K., et al. Vascular density profile of rat mammary carcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea: implications for the investigation of angiogenesis. *Carcinogenesis* (2002) 23(5):847-54.
- Thomsen, L. L., Miles, D. W., Happerfield, L., et al. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* (1995) 72(1):41-4.
- Tong, R. T., Boucher, Y., Kozin, S. V., et al. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* (2004) 64(11):3731-6.
- Trempe, G. L. Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res.* (1976) 57:33-41.
- Tsai, W. S., Nagawa, H., and Muto, T. Differential effects of polyunsaturated fatty acids on chemosensitivity of NIH3T3 cells and its transformants. *International Journal of Cancer* (1997) 70(3):357-361.
- Tschugguel, W., Knogler, W., Czerwenka, K., et al. Presence of endothelial calcium-dependent nitric oxide synthase in breast apocrine metaplasia. *Br J Cancer* (1996) 74(9):1423-6.
- Tschugguel, W., Schneeberger, C., Unfried, G., et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade. *Breast Cancer Res Treat* (1999) 56(2):145-51.
- Tsuji, M., Murota, S. I., and Morita, I. Docosapentaenoic acid (22:5, n-3) suppressed tube-forming activity in endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2003) 68(5):337-42.
- Tsuzuki, T., Shibata, A., Kawakami, Y., et al. Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the migration of human umbilical vein endothelial cells. *J Nutr* (2007) 137(3):641-6.
- Ueno, N. T., Yu, D., and Hung, M. C. Chemosensitization of HER-2/neu-overexpressing human breast cancer cells to paclitaxel (Taxol) by adenovirus type 5 E1A. *Oncogene* (1997) 15(8):953-60.
- Urbich, C., Reissner, A., Chavakis, E., et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *Faseb J* (2002) 16(7):706-8.
- Vallance, P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol* (2003) 17(1):1-10.

- Van Meter, T. E., Broaddus, W. C., Cash, D., et al. Cotreatment with a novel phosphoinositide analogue inhibitor and carmustine enhances chemotherapeutic efficacy by attenuating AKT activity in gliomas. *Cancer* (2006) 107(10):2446-2454.
- Vandoorne, K., Addadi, Y., and Neeman, M. Visualizing vascular permeability and lymphatic drainage using labeled serum albumin. *Angiogenesis* (2010) 13(2):75-85.
- Vara, J. A. F., Casado, E., de Castro, J., et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* (2004) 30(2):193-204.
- Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* (2004b) 9 Suppl 5:10-7.
- Vaupel, P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* (2008) 13 Suppl 3:21-6.
- Vaupel, P., and Harrison, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* (2004) 9 Suppl 5:4-9.
- Vaupel, P., Kallinowski, F., and Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* (1989) 49(23):6449-65.
- Vaupel, P., Thews, O., and Hoeckel, M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* (2001) 18(4):243-59.
- Vibet, S., Goupille, C., Bougnoux, P., et al. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic Biol Med* (2008) 44(7):1483-91.
- Vibet, S., Maheo, K., Gore, J., et al. Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines. *Drug Metab Dispos* (2007) 35(5):822-8.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011) 12(6):385-92.
- Vlahovic, G., Rabbani, Z. N., Herndon, J. E., 2nd, et al. Treatment with Imatinib in NSCLC is associated with decrease of phosphorylated PDGFR-beta and VEGF expression, decrease in interstitial fluid pressure and improvement of oxygenation. *Br J Cancer* (2006) 95(8):1013-9.
- Von Mehren, M., Adams, G. P., and Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med* (2003) 54:343-69.
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., et al. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews* (2010) 68(5):280-289.
- Wallis, J. G., Watts, J. L., and Browse, J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci* (2002) 27(9):467.
- Wang, D., and Dubois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* (2010) 10(3):181-93.
- Wang, Z., Butt, K., Wang, L., et al. The Effect of Seal Oil on Paclitaxel Induced Cytotoxicity and Apoptosis in Breast Carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Nutrition and Cancer* (2007) 58(2):230-238.
- Watnick, R. S., Cheng, Y. N., Rangarajan, A., et al. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* (2003) 3(3):219-231.
- Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E. M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochemical Journal* (2011) 437(2):199-213.
- Wildiers, H., Guetens, G., De Boeck, G., et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Br J Cancer* (2003) 88(12):1979-86.
- Willett, C. G., Boucher, Y., di Tomaso, E., et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature Medicine* (2004) 10(6):649-649.

- Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* (2004) 6(6):553-563.
- Xue, H., Sawyer, M. B., Field, C. J., et al. Nutritional Modulation of Antitumor Efficacy and Diarrhea Toxicity Related to Irinotecan Chemotherapy in Rats Bearing the Ward Colon Tumor. *Clinical Cancer Research* (2007) 13(23):7146-7154.
- Yamaguchi, S., Bell, H. S., Shinoda, J., et al. Glioma tumourigenicity is decreased by iNOS knockout: experimental studies using the C6 striatal implantation glioma model. *British Journal of Neurosurgery* (2002) 16(6):567-572.
- Yang, S. P., Morita, I., and Murota, S. I. Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cells. *J Cell Physiol* (1998) 176(2):342-9.
- Yee, L. D., Lester, J. L., Cole, R. M., et al. n-3 Fatty acid supplements in women at high risk of breast cancer have dose-dependent effects on breast adipose tissue fatty acid composition. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2010) 91(5):1185-1194.
- Yeh, P. Y., Chuang, S. E., Yeh, K. H., et al. Involvement of nuclear transcription factor-kappa B in low-dose doxorubicin-induced drug resistance of cervical carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* (2003) 66(1):25-33.
- Ying, L., and Hofseth, L. J. An Emerging Role for Endothelial Nitric Oxide Synthase in Chronic Inflammation and Cancer. *Cancer Research* (2007) 67(4):1407-1410.
- Yu, D., Liu, B., Jing, T., et al. Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene* (1998) 16(16):2087-94.
- Zhou, G., and Kuo, M. T. NF-kappaB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* (1997) 272(24):15174-83.
- Zhou, L., and Zhu, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* (2009) 20(4):223-230.
- Ziche, M., and Morbidelli, L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* (2000) 50(1-2):139-48.

## Sites web consultés

<http://www.e-cancer.fr/>. Consulté en juillet 2011

<http://www.eufic.org/article/fr/expid/basics-graisses/> Consulté en juillet 2011

<http://www.iterg.com/IMG/pdf/infogenecorpsgras.pdf>. Consulté en août 2011

<http://globocan.iarc.fr/>. Consulté en août 2011.

<http://www.medespace.com/cancero/doc/sein.html> Consulté en septembre 2011

<http://www.anses.fr/index.htm> Consulté en septembre 2011



**Sophie KORNFELD**



**La vascularisation tumorale : une cible  
thérapeutique des acides gras polyinsaturés  
n-3 pour sensibiliser les tumeurs  
mammaires aux traitements anticancéreux.**



**Résumé**

Les acides gras polyinsaturés n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA et acide eicosapentaénoïque, EPA) sensibilisent les tumeurs mammaires aux agents anticancéreux. Cette sensibilisation implique la régulation de la vascularisation tumorale. En effet, un régime nutritionnel EPA/DHA, associé à une chimiothérapie par le Docétaxel (Taxane) diminue la quantité de vascularisation (effet anti-angiogénique). Une amélioration de la qualité vasculaire est aussi observée par une diminution de la pression du liquide interstitiel, paramètre décrit comme un frein à la délivrance des drogues dans les tumeurs. Cette diminution est associée à une extravasation plus importante du bleu d'Evans, suggérant une meilleure distribution des agents anticancéreux au sein des tumeurs. L'effet antiangiogénique du DHA implique une diminution de la voie de signalisation VEGF/eNOS/NO. Ainsi, l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) est diminuée dans des cellules endothéliales en culture et dans les tumeurs mammaires. Nos résultats suggèrent que l'apport d'acides gras EPA/DHA aux patients au cours de la chimiothérapie pourrait être une nouvelle approche thérapeutique pour normaliser la vascularisation tumorale et améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux.

**Mots clés :** Acides gras polyinsaturés n-3, tumeurs mammaires, vascularisation tumorale, angiogénèse, chimiothérapie, pression interstitielle, VEGF, NO synthase endothéliale, NO

**Abstract**

Polyunsaturated fatty acids n-3 (docosahexaenoic acid, DHA and eicosapentaenoic acid, EPA) sensitize mammary tumors to anticancer drugs. This sensitization involves the regulation of tumor vasculature. Indeed, a nutritional diet with EPA / DHA, in combination with taxane chemotherapy (docetaxel) decreases the vascular quantity (anti-angiogenic effect). An improvement of vascular quality is also observed by a decrease of interstitial fluid pressure, a parameter described as a barrier to drug delivery in tumors. This decrease improves extravasation of Evans blue, suggesting a better distribution of anticancer agents in tumors. The antiangiogenic effect of DHA involves a decrease of signaling pathway VEGF / eNOS / NO. Thus, activation of endothelial NO synthase (eNOS) is decreased in endothelial cells in culture and in mammary tumors. Our results suggest that intake of fatty acids EPA / DHA to patients during chemotherapy could be a new therapeutic approach to normalize tumor vasculature and improve the efficacy of cancer treatments.

**Key words:** n-3 polyunsaturated fatty-acids, mammary tumor, tumor vascularization, angiogenesis, chemotherapy, interstitial fluid pressure, VEGF, endothelial NO synthase, NO